

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

Einfluss von FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin
auf die myokardiale Differenzierung
von murinen embryonalen Stammzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

vorgelegt von Hanna Marie Behr
aus Berlin

Hamburg, September 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit der Genehmigung
der Universität Hamburg am:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

Vorsitzender: Professor Dr. med. W.-H. Zimmermann

2.Gutachter: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

3.Gutachter: PD Dr. S. Baldus

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|--------------|
| 1. | Einleitung | 3-15 |
| 1.1. | Herzentwicklung | 3 |
| 1.2. | Stammzellen | 4 |
| 1.3. | Myokardiale Differenzierung von Stammzellen | 6 |
| 1.3.1. | <i>Fibroblast Growth Factor-2</i> (FGF-2) | 7 |
| 1.3.2. | <i>Bone Morphogenetic Protein-2</i> (BMP-2) | 9 |
| 1.3.3. | Noggin | 11 |
| 1.3.4. | Thrombin | 12 |
| 1.4. | Stammzellen als Myozytenquelle für die Myokardregeneration | 14 |
| 1.5. | Künstliches Herzgewebe | 14 |
| 1.6. | Arbeitsprogramm | 16 |
| | | |
| 2. | Material und Methoden | 17-28 |
| 2.1. | Gewinnung und Kultur muriner embryonaler Fibroblasten (MEF) | 17 |
| 2.1.1. | MEF-Isolation | 17 |
| 2.1.2. | MEF-Kultur | 17 |
| 2.1.3. | MEF-Inaktivierung | 18 |
| 2.2. | Murine embryonale Stammzellen (ESC) | 18 |
| 2.2.1. | ESC-Kultur | 18 |
| 2.2.2. | Differenzierung von ESCs | 19 |
| 2.2.3. | Einfrieren und Auftauen von ESCs | 20 |
| 2.3. | Herstellung von <i>Engineered Heart Tissue</i> (EHT) | 21 |
| 2.4. | RNA-Präparation und quantitative PCR | 23 |
| 2.4.1. | RNA-Isolation | 23 |
| 2.4.2. | Bestimmung der RNA-Konzentration | 23 |
| 2.4.3. | Reverse Transkription | 23 |
| 2.4.4. | Quantitative PCR | 24 |
| 2.5. | Statistik | 26 |
| 2.6. | Substanzen | 26 |
| 2.7. | Hilfsmittel und Geräte | 27 |

| | | |
|------------|--|--------------|
| 3. | Ergebnisse | 29-40 |
| 3.1. | Optimierung der Kulturbedingungen | 29 |
| 3.2. | Kardiogenes Potential von FGF-2, BMP-2 und Noggin | 30 |
| 3.2.1. | Morphologische Analysen | 30 |
| 3.2.2. | Analyse mittels quantitativer PCR | 33 |
| 3.2.3. | Identifikation einer kardio-induktiven Kulturphase | 34 |
| 3.2.4. | Effekte in Abhängigkeit der FGF-2, BMP-2- und Noggin-Konzentration | 34 |
| 3.3. | Thrombin als kardiogener Faktor | 37 |
| 3.4. | Herstellung von EHTs aus Embryoidkörpern | 39 |
| | | |
| 4. | Diskussion | 41-47 |
| 4.1. | Myokardiale Differenzierung von ESCs | 41 |
| 4.2. | Steigerung der kardialen Differenzierung durch Wachstumsfaktoren | 42 |
| 4.3. | FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin als kardiogene Faktoren | 45 |
| 4.3.1. | FGF-2 | 45 |
| 4.3.2. | BMP-2 | 45 |
| 4.3.3. | Noggin | 46 |
| 4.3.4. | Thrombin | 46 |
| 4.3.4. | <i>Tissue Engineering</i> | 47 |
| | | |
| 5. | Ausblick | 48 |
| | | |
| 6. | Zusammenfassung | 49 |
| | | |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 50 |
| | | |
| 8. | Literaturverzeichnis | 52 |
| | | |
| 9. | Danksagung | 65 |
| | | |
| 10. | Lebenslauf | 66 |
| | | |
| 11. | Erklärung | 67 |
| | | |
| 12. | Anhang | 68 |

1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigsten Todesursachen in westlichen Industrieländern dar (Bundesamt 2005; Lopez und Murray 1998). Ursächlich sind in der Regel ein erhöhter Blutdruck sowie arteriosklerotische Gefäßveränderungen. Als Spätfolge manifestiert sich durch den pathophysiologisch bedingten Verlust funktionstüchtiger Kardiomyozyten häufig eine Herzinsuffizienz. Der Herzmuskel ist dann nicht mehr in der Lage, einen Zellverlust durch hypertrophes Wachstum auszugleichen. Da terminal differenzierte Kardiomyozyten weitestgehend post-mitotisch sind, schließt sich ein endogener regenerativer Zellersatz durch Herzmuskelzellproliferation aus. Möglicherweise befinden sich aber im Myokard residente Stammzellen, die eine begrenzte Myokardregeneration vermitteln könnten (Beltrami et al. 2003). Dieses regenerative Potential kann aber bestenfalls nur als minimal eingestuft werden. Ob und wie dieses endogene regenerative Potential dennoch therapeutisch nutzbar gemacht werden kann, wird heute kontrovers diskutiert (Dimmeler et al. 2005; Laflamme und Murry 2005; Murry et al. 2005). Alternativ wird die therapeutische Anwendung exogener adulter und embryonaler Stammzellen erprobt (Caspi et al. 2007; Kehat et al. 2004; Schachinger et al. 2006; Strauer et al. 2001).

1.1 Herzentwicklung

Das Herz ist das erste funktionelle Organ, das während der Embryogenese gebildet wird. Es entsteht aus der Verschmelzung eines paarig angelegten Gefäßsystems im Bereich des kardiogenen Feldes (zwischen Oropharyngealmembran und anteriorem Neuralplattenrand) (Moore et al. 1996). Die Entstehung des „kardiogenen“ Gefäßsystems der Maus beginnt an Tag 7 der Embryonalentwicklung (ED7); beim Menschen in der dritten Woche der Embryonalentwicklung, ausgehend von mesodermalen Angioblasten. Die verschiedenen Stadien der Herzentwicklung sind in Abb. 1 aufgeführt. Diese schematische Darstellung der *in vivo* Entwicklung des Herzens zeigt, dass unterschiedliche Gentranskripte kardiale Entwicklungsstadien markieren und vermutlich an der Kardiogenese direkt beteiligt sind. Fehlt zum Beispiel *Mesp1* während der Herzschlauchbildung, bleibt die Verschmelzung der paarigen Herzanlagen aus, und es bleiben zwei getrennte Herzanlagen bestehen (Saga et al. 1999). Auf der anderen Seite sind die Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5* und *GATA4* für die Bildung der Herzschleife notwendig (Harvey 2002). Schon im Stadium der Herzschlauchbildung fängt das Herz an zu kontrahieren; parallel werden Herzmuskel-spezifische Proteine (u.a. α -Myosin-Schwere-Kette [α MHC], β -Myosin-Schwere-Kette [β MHC], α Actinin, Myosin-Leichte-Kette [MLC]) exprimiert (Lyons et al. 1990). Für die Entwicklung der Herzanlage und deren weitere Differenzierung sind vermutlich eine Reihe von Milieufaktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) notwendig. Hier scheint vor allem die Sekretion von FGF-2, BMP-2

Einleitung

und Noggin eine essentielle Rolle zu spielen. So veranlasst BMP-2 die Expression früher kardialer Marker wie GATA4, Nkx2.5 und Tbx2 (Monzen et al. 1999); FGF-2 führt zu einer kardialen Differenzierung mesodermaler Zellen (Solloway et al. 2003; Rosenblatt-Velin et al. 2005). Noggin kann sowohl als negativer als auch positiver Regulator der Herzentwicklung fungieren (Choi et al. 2007; Taakei et al. 2009; Yuasa et al. 2005).

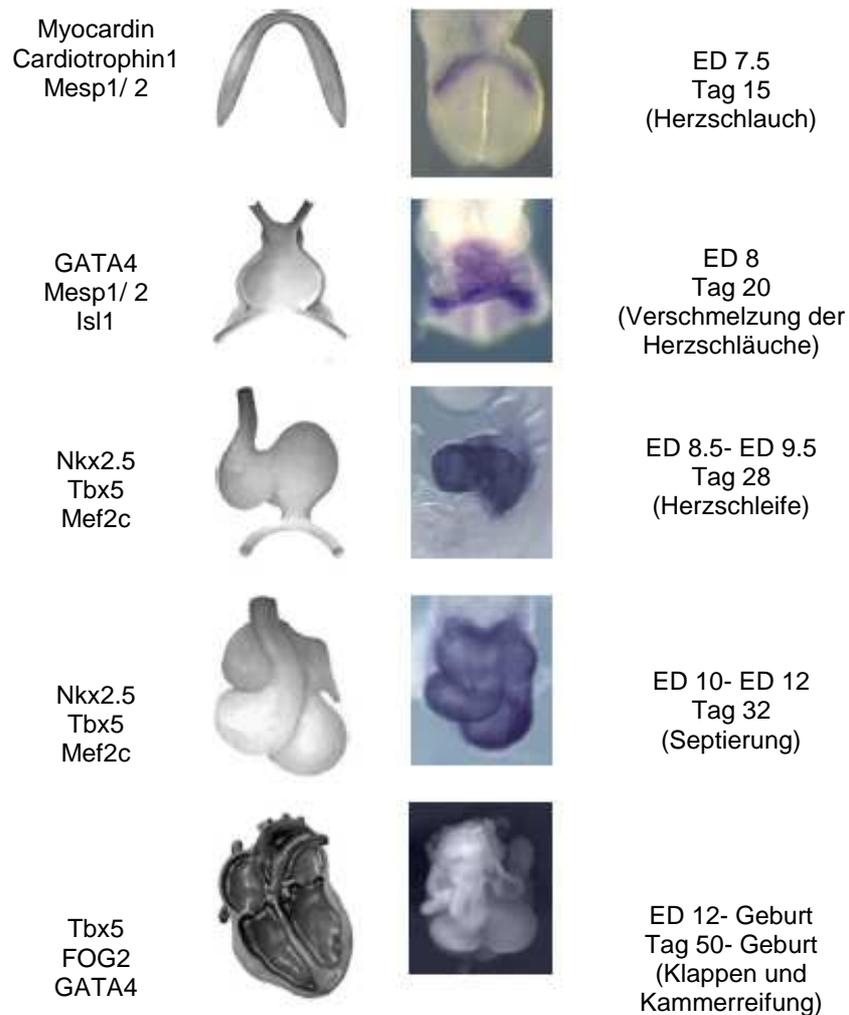


Abbildung 1: Stadien der Herzentwicklung und Angabe der zum entsprechenden Entwicklungszeitpunkt typischerweise exprimierten Faktoren (Bruneau 2002; Epstein et al. 2000).

1.2 Stammzellen

Man unterscheidet zwischen toti-, pluri- und multipotenten Stammzellen. Totipotente (lat. „zu allem fähige“) Stammzellen sind in der Lage, einen kompletten Organismus zu bilden. Sie entstehen nach Verschmelzung von Ei- und Samenzelle und behalten ihre

Einleitung

Differenzierungskapazität bis zum 8-Zell Stadium (Weissmann 2000). Im späteren Blastozysten-Stadium sind bereits mindestens zwei unterschiedliche Zellpopulationen erkennbar: (1) Das Trophektoderm und (2) die Innere Zellmasse. Das Trophektoderm ist für die Bildung des extraembryonalen Gewebes (u.a. Plazenta) verantwortlich. Die Innere Zellmasse besteht aus pluripotenten (lat. „zu vielem fähigen“) Zellen. Diese können sich grundsätzlich in die drei Keimblätter entwickeln (ektoderm, endoderm und mesoderm; Abb. 2).

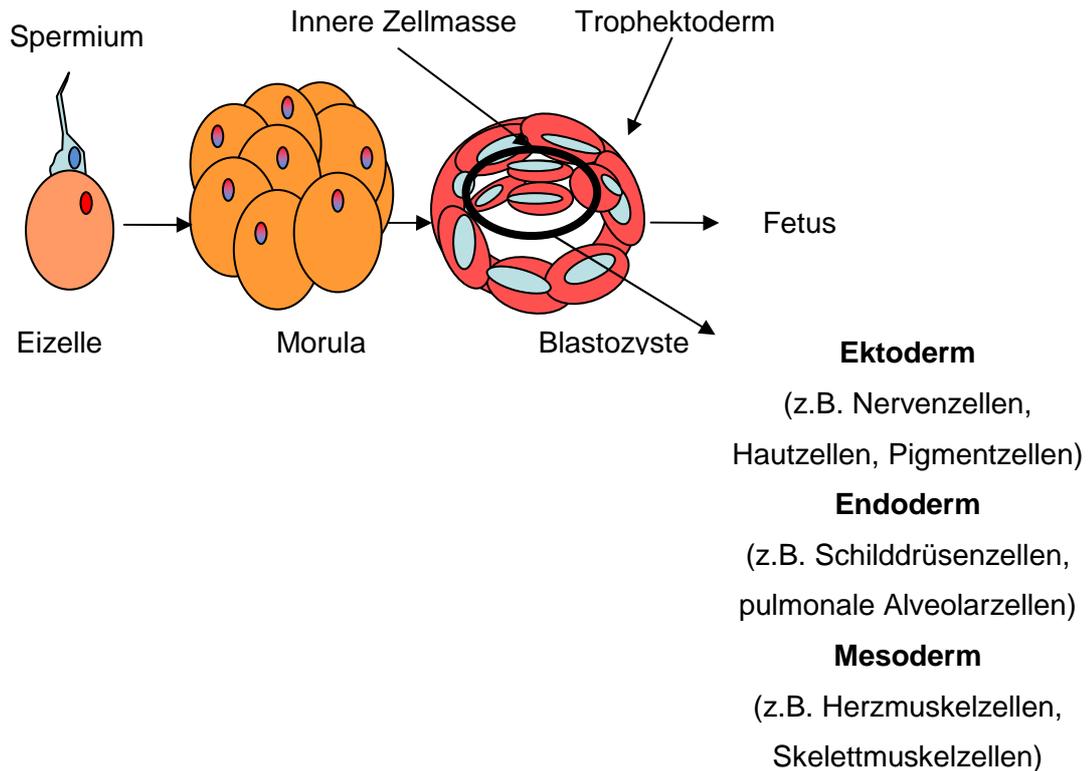


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung.

Zellen aus der Inneren Zellmasse können als pluripotente embryonale Stammzellen kultiviert und in Zellen der drei Keimblätter differenziert werden (Kaufman et al. 1983). Zugleich können sie in undifferenziertem Zustand nahezu unbegrenzt klonal vermehrt werden und zeigen dabei eine so genannte Selbsterneuerung (d.h. die Tochter- und Mutterzelle sind identisch). Typische molekularer Marker für embryonale Stammzellen sind die Transkriptionsfaktoren Oct4 (Scholer et al. 1990) und Nanog (Mitsui et al. 2003). Nach erfolgreicher Inkulturnahme von murinen embryonalen Stammzellen Anfang der achtziger Jahre (Evans und Kaufmann 1981; Kaufman et al. 1983) ist es der Gruppe um Thomson erstmalig gelungen, auch humane embryonale Stammzellen zu züchten (Thomson et al. 1998). Neben toti- und pluripotenten Stammzellen gibt es eine Reihe von multipotenten (adulten) Stammzellen. Diese Zellen weisen ein deutlich

Einleitung

eingeschränktes Differenzierungspotential auf. So können adulte Stammzellen aus dem Knochenmark Blutzellen generieren und werden bereits seit Jahren bei Knochenmarktransplantationen eingesetzt (Dreger et al. 2000). Mesenchymale Stammzellen, ebenfalls aus dem Knochenmark, aber auch aus anderen Geweben (z.B. Fettgewebe) bilden bevorzugt Knochen-, Knorpel- und Fettzellen (Pountos et al. 2006). Es ist davon auszugehen, dass die meisten Organsysteme Nischen mit residenten adulten Stammzellen besitzen. Wie diese Nischen definiert sind, und warum sie in einigen Organen ein starkes Regenerationspotential (z.B. Skelettmuskel) und in anderen Organen ein schwaches oder kein Regenerationspotential (z.B. Herzmuskel) vermitteln, ist bisher unklar.

1.3 Myokardiale Differenzierung von Stammzellen

Diverse Arbeitsgruppen haben sich der Frage angenommen, wie die Differenzierung embryonaler Stammzellen gesteuert werden kann. Während die ektodermale Differenzierung von murinen und humanen embryonalen Stammzellen einfach erscheint (sogenanntes „Default-Programm“; Munoz-Sanjuan und Brivanlou 2002), herrscht Unklarheit über die Regelkreise, die eine Differenzierung in Kardiomyozyten steuern. Das Standardprotokoll hierfür erscheint nach wie vor die Differenzierung in hängenden Tropfen (Zellaggregate aus 200-1000 embryonalen Stammzellen) zu sein (Wobus et al. 1993). Darüber hinaus wurden diverse Faktoren als myokardial Differenzierung-fördernd beschrieben (Tab. 1).

| Kardiogener Stimulus | Publikation |
|-----------------------------|---------------------------------------|
| Retinsäure | Wobus et al. 1997 |
| Oxytoxin | Paquin et al. 2002 |
| FGF-2 | Kawai et al. 2004 |
| BMP-2 | Behfar et al. 2002; Kawai et al. 2004 |
| TGF- β | Behfar et al. 2002 |
| Noggin | Yuasa et al. 2005 |

Tabelle 1: Beispiele für spezifische Stimuli für die kardiiale Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen.

In adulten Stammzellen (z.B. mesenchymalen Stammzellen) ist dagegen die Expression myokardialer Markerproteine nach Behandlung mit 5-Azacytidin (5-Aza) häufig beschrieben worden (Makino et al. 1999). Ein überzeugender Nachweis einer typischen

Einleitung

Herzmuskelzellfunktion und Herzmorphologie ist dabei allerdings bisher nicht erbracht worden, so dass davon auszugehen ist, dass Substanzen wie 5-Aza vermutlich durch unspezifische Demethylierung von Promotorsequenzen im Genom die physiologische Transkriptionskontrolle lockern und zur Entwicklung von „transkriptionellen Chimären“, aber nicht zu wirklich differenzierten Zelltypen führen (Liu et al. 2003).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es ein optimales myokardiales Differenzierungsprotokoll weder in embryonalen noch in adulten Stammzellkulturen gibt. Daher scheint es auch nach wie vor wichtig, Faktoren und Regelkreise zu identifizieren, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine mesodermale Differenzierung und schließlich eine myokardiale Spezifizierung und Maturierung fördern. Dabei ist sicher nicht nur der einzelne Faktor, sondern vielmehr auch die Faktorenkonzentration sowie -kombination und der Zeitpunkt der Stimulation von entscheidender Bedeutung. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde die kardio-induktive Wirkung von *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), *Bone Morphogenic Protein-2* (BMP-2) und Noggin sowie Thrombin systematisch untersucht:

1.3.1 *Fibroblast Growth Factor-2*

FGF-2 (oder auch „*basic FGF*“) gehört der Familie der Fibroblastenwachstumsfördernden Faktoren an, die zurzeit 23 bekannte Polypeptide umfasst (Szebenyi und Fallon 1999). Aufgrund seiner hohen Bindungsfähigkeit an Heparin wird es aber auch teilweise als Mitglied der großen Familie Heparin-bindender Proteine angesehen, die auch VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und EGF (*Endodermal Growth Factor*) umfasst (Detillieux et al. 2003). Die Mitglieder der FGF-Familie spielen im Rahmen der Embryonalentwicklung und auch während der Morphogenese verschiedener Organe eine bedeutende Rolle (Beenken und Mohammadi 2009). Sie sind in bestimmten Zeitabschnitten in allen Gewebetypen des sich entwickelnden Organismus zu finden. Die meisten FGFs werden über das endoplasmatische Retikulum in den Extrazellularraum sezerniert. FGF-1 und FGF-2 besitzen als einzige jedoch keine typische Signalsequenz, die für diesen Vorgang notwendig ist (Bouche et al. 1987; Wright und Huang 1996). Der genaue Ausschleusungsmechanismus ist nicht bekannt (Mignatti et al. 1992).

FGF-2 ist ein Protein mit vielfältigen biologischen Aufgaben und ist zum Beispiel an fast allen Stadien der Embryonalentwicklung mit Zell-Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration, außerdem zusätzlich an Wundheilung und Tumorentwicklung beteiligt (Wright und Huang 1996). Es sind vier Isoformen bekannt, die nach der Molekularmasse in ein kurzes Protein und drei lange Proteine unterschieden werden (Bugler et al. 1991).

Einleitung

Durch eine Bindung an Heparin wird die Struktur von FGF-2 stabilisiert und so vor Inaktivierung durch Hitze oder Abbau durch Proteasen geschützt (Gospodarowicz et al. 1987; Yayon und Klagsbrun 1990; Wright und Huang 1996). Dadurch wird die Halbwertszeit von FGF-2 verlängert und die Affinität, an den FGF-Rezeptor zu binden, erhöht (Vlodavsky et al. 1996).

Die Signaltransduktion von FGF-2 erfolgt über membrangebundene Rezeptoren (Abb. 3). Es sind bis heute vier verschiedene Rezeptoren bekannt, die als FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 bezeichnet werden (Szebenyi und Fallon 1999). Der häufigste Rezeptor im Herzen ist FGFR1. Er spielt sowohl für die Herzentwicklung als auch für das adulte Herz eine wichtige Rolle. FGFR1-4 besitzen alle Tyrosin-Kinase-Aktivitäten, d.h. durch Bindung von FGF-2 werden sie autophosphoryliert und damit aktiviert. Dies führt dann zur Rekrutierung von Grb, SOS und Ras (Dvorak et al. 2006; Katoh 2006). Ras setzt unter dem Einfluss von SOS das gebundenen GPD frei und aktiviert die Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade, die über die MAPKKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase*) und die MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) schließlich die MAPK (oder auch ERK; *extracellular signal-regulated kinase*) aktiviert. MAPKs translozieren in den Zellkern und fungieren dort als Transkriptionsfaktoren. FGFRs aktivieren nach Phosphorylierung neben Serin/Threonin-Kinasen vermutlich auch den PLC- γ /PKC (Phospholipase C-gamma/Protein Kinase C)-Signalweg. Dieser kann über Phosphatidylinositol 3 Phosphat Kinase (PI3K) die Protein Kinase B (PKB) aktivieren, welche unter anderem über Cyclin D die Zell-Proliferation steigert. PI3K selbst hemmt die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), was zur β -Catenin Erhöhung führt. Durch diese β -Catenin Akkumulation werden Wnt-Zielgene nach Komplexbildung mit TCF und LEF aktiviert. Dazu gehören zum Beispiel Cyclin D, PPAR γ und c-myc, die wiederum Zell-Proliferation und Angiogenese induzieren (Dang 1991).

Neben den hier beschriebenen Effekten spielt FGF-2 vermutlich in der mesodermalen Entwicklung und hier auch bei der Herzentwicklung eine Rolle (Solloway und Harvey 2003; Sugi et al. 199). So konnte gezeigt werden, dass FGF-2 *knock-out* Mäuse (keine Bildung von FGF-2) auf Grund einer unter anderem myogenen und kardiovasulären Ätiologie des Phänotyps embryonal letal sind (Lavine et al. 2005; Rosenblatt-Velin et al. 2005).

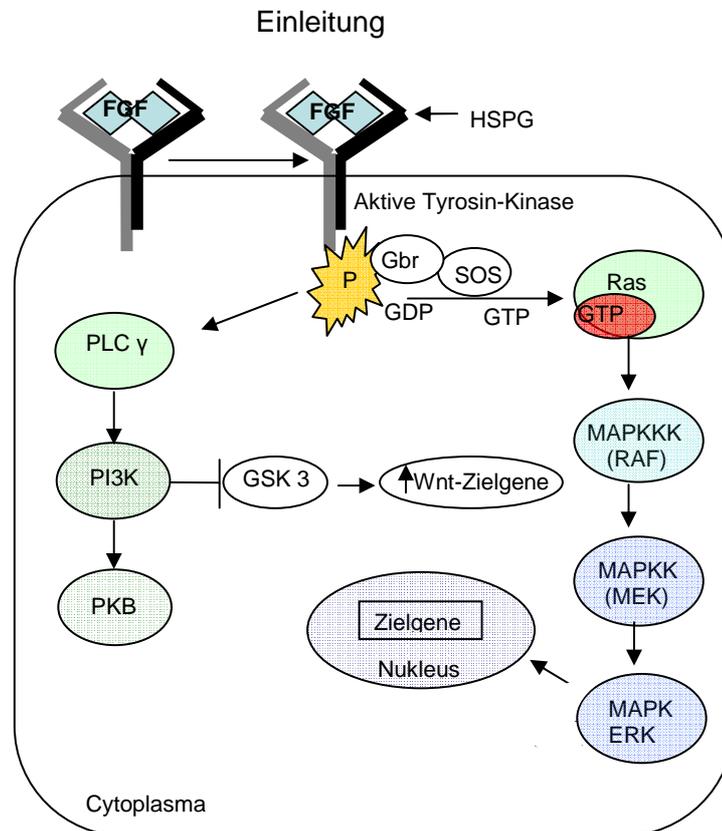


Abbildung 3: Schematische Darstellung der FGFR-Signaltransduktionswege, modifiziert nach Bottcher und Niehrs 2005. Abkürzungen: HSPG= Heparan Sulfat Proteoglycan; SOS= *Son of sevenless*; Ras= *rat sarcoma* Proto-Onkogen; MAPKKK= *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (RAF); MAPKK= *mitogen-activated protein kinase kinase* (MEK); MAPK (ERK)= *mitogen-activated protein kinase*; PLC γ = Phospholipase C-gamma; PI3K= Phosphatidylinositol 3 Phosphat Kinase; PKB= Protein Kinase B

1.3.2 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Die Gruppe der *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) wurde erstmals 1965 von Urist beschrieben und nach ihrer Fähigkeit zur Förderung der Knochenneubildung benannt (Urist et al. 1983). Mittlerweile konnten mit Hilfe rekombinanter DNA-Technologie über 20 BMPs identifiziert werden. Nach Untersuchung ihrer Expressionsmuster wurde deutlich, dass der Name „*Bone Morphogenetic Protein*“ nur noch einem Bruchteil ihrer gesamten Funktionen gerecht wird. Da man BMPs in vielen unterschiedlichen Gewebetypen nachgewiesen hat, so zum Beispiel im Gehirn (BMP-6), in den Nieren (BMP-3, 4 und 7), in der Lunge (BMP-3, 4, 5 und 6) und im Herz (BMP-2 ,4, 6 und 7), liegt die Vermutung nahe, dass sie noch andere Aufgaben bei Wachstum und Differenzierung besitzen als nur die Knocheninduktion (Dudley et al. 1995). Auf Grund der Ähnlichkeit zu dem früher entdeckten *Transforming Growth Factor* (TGF- β) werden abgesehen von BMP-1 sämtliche BMPs der TGF- β -Superfamilie zugeordnet, die durch sieben charakteristische konservierte Cysteine in den carboxy-terminalen Abschnitten gekennzeichnet ist. BMP-2 und BMP-4 sind zu 86% identisch und zu 35% identisch mit

Einleitung

TGF- β . Weitere Mitglieder dieser Familie sind Activine, Inhibine, GDF (*Growth and Differentiation Factor*) und andere heterogene Gruppen, zu denen zum Beispiel MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) zählt (Massagué 1990). Allen Mitgliedern liegt ein gemeinsamer Mechanismus der BMP-Signaltransduktion zu Grunde (Abb. 4). In Säugetieren sind mehrere Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren bekannt, die für die Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilien-Mitglieder verantwortlich sind. Für BMP sind zwei Typ-I (BMPRI-A, BMPRI-B) und ein Typ-II-Rezeptor (BMPRII) bekannt (Nohe et al. 2004). Activine hingegen haben zwei Typ-II-Rezeptoren (AcRII und AcRIIB) und ein Typ-I-Rezeptor (AcRI). BMP-2 aktiviert alle Rezeptoren außer AcRI (Kopp 2000). Nach Bindung von freien BMPs an den Typ-I und Typ-II-Rezeptorkomplex phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor mit seiner Tyrosin-Kinase-Domäne den Typ-I-Rezeptor, der dadurch aktiviert wird. Die darauf durch den Typ-I-Rezeptor phosphorylierten Smad-Proteine (Smad1, 5 und 8) interagieren daraufhin mit Smad4 und anderen Transkriptionsfaktoren und steuern in einem weiteren Schritt nach Translokation in den Nukleus die Expression von unterschiedlichen Zielgenen (Massague 1998). Es gibt aber auch Hinweise dafür, dass an der durch BMP-2 induzierten Signalantwort auch die Protein-Kinase A und die Protein-Kinase C beteiligt sind (Palcy und Goltzman 1999). Weiterer Signaltransduktionsweg laufen über MAPK, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und NF κ B Aktivierung, vermutlich über TAK1 (*TGF- β -activated kinase-1*; Hanafusa et al. 1999; Sakurai et al. 2000). Die BMP-Signalintensität ergibt sich aus der Wechselwirkung zwischen Rezeptor-bindenden Liganden und Antagonisten, die eine Komplexbildung mit dem Rezeptor verhindern. Im extrazellulären Raum aktive Antagonisten sind zum Beispiel Noggin oder Follistatin (Zimmerman et al. 1996; Wan und Cao 2005).

Neben den beschriebenen Effekten wurde gezeigt, dass BMP-2 an der frühen Herz-Bildung, die vom pharyngealen Endoderm ausgeht, beteiligt ist. Als Herz-induzierende Aktivität in der Entwicklung von Hühnern wird BMP-2 anfangs im seitlichen Mesendoderm, später im pharyngealen Endoderm und zuletzt in der sino-atrialen Region exprimiert (Andrée et al. 1998). Darüber hinaus führt eine ektope Expression von BMP-2 zu einer Induktion kardialer Markergene, wie z.B. Nkx2.5 und GATA4 in ektope Lage (Schultheiss et al. 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass BMP-2 aktiv die Expression von herzspezifischen Transkriptionsfaktoren fördert (Behfar et al. 2002). Erwartungsgemäß zeigen BMP-2-defiziente Mäuseembryonen einen Defekt bei der Herzentwicklung, so bleiben z.B. die Herzschrägen paarig angelegt und es bestehen zwei getrennte Herzanlagen, was zur embryonalen Letalität führt (Reddi 1994; Rosen und Thies 1992; Zhang und Bradley 1996).

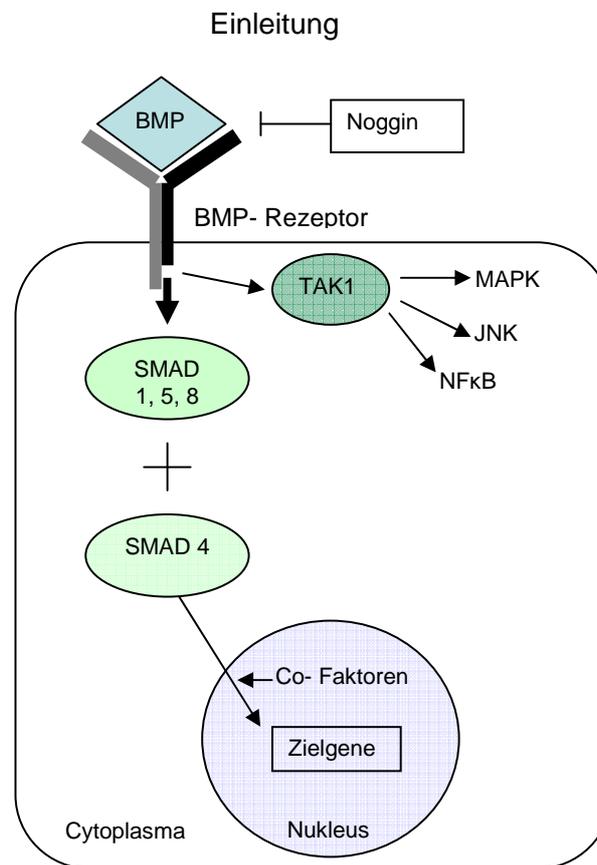


Abbildung 4: Signaltransduktionsweg von BMP, modifiziert nach Hassel et al. 2003. Abkürzungen: TAK= TGF- β -activated kinase; NF κ B= Nukleärer Faktor κ B; SMAD= Homolog des Drosophilaproteins *mothers against decapentaplegic*; MAPK= mitogen-activated protein kinase; JNK= c-Jun N-terminale Kinasen

1.3.3 *Noggin*

Noggin ist ein extrazelluläres Polypeptid, das Mitglieder der TGF- β -Superfamilie bindet, so deren Rezeptorbindung verhindert und sie dadurch inaktiviert (Zimmerman et al. 1996). Noggin ist an der Modulation von TGF-Superfamilie-Proteinfunktion in verschiedenen Stadien der Mausentwicklung wie z.B. der Knochenentwicklung und der Neuralrohrentwicklung beteiligt. Eine Rolle von Noggin bei der Herzentwicklung konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Stottmann et al. 2001). So führte die Implantation von Zellen, die den BMP-2 Antagonisten Noggin exprimieren, zu einem Verlust von kardialen Markergenen (Schlange et al. 2000). Bei *Noggin knock out* Mäusen wurden ernsthafte Entwicklungsschäden an verschiedenen Organen beobachtet (McMahon et al. 1998). So ruft die Abwesenheit von Noggin eine Hyperplasie des Endokardkissens hervor, verursacht eine dickere Herzmuskelwand und führt bei einem geringen Prozentsatz zu Septumdefekten (Choi et al. 2007).

1.3.4 Thrombin

Untersuchungen aus unserer eigenen Arbeitsgruppe legen nahe, dass die Protease Thrombin ebenfalls an der Regulation der Herzmuskelzellentwicklung aus embryonalen Stammzellen beteiligt sein könnte (Rogge 2007). Thrombin ist ein zentraler Regulator der Blutgerinnung und für die natürliche Wundheilung unverzichtbar (Harker et al. 1995). Neben der intravaskulären Wirkung hat Thrombin noch eine Reihe weiterer direkter Wirkungen auf Zellen, die über Thrombin-Rezeptoren vermittelt werden. Die Thrombin-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), die wiederum Mitglieder der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie sind (GPCR; Coughlin 1999). Es sind 4 PARs bekannt, Thrombin aktiviert aber nur PAR-1, PAR-3 und PAR-4. Der heutige Wissensstand über die nachgeschalteten Wege ist vornehmlich durch Studien an PAR-1 entstanden. Die Stimulation von PAR-1 durch Thrombin führt zur Aktivierung von G-Proteinen Gq, Gi und G12/13 (Macfarlane et al. 2001). Als wichtigste Effekte gelten (Abb. 5):

1. Gq abhängige Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die wiederum die Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) aktiviert, die ihrerseits die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöhen und die Protein-Kinase C (PKC) aktivieren (Taylor et al. 1991).
2. Gi vermittelte Aktivierung der MAPK bzw. der PI3-Kinase (Koch et al. 1994; Ellis et al. 1999) und Aktivierung der Phospholipase C (PLC)-/Protein-Kinase C (PKC)-Weges (Hung et al. 1992; Macfarlane et al. 2001).
3. G12/13 abhängige Aktivierung von JNK und von der Rho-assoziierten Kinase (ROK) (Macfarlane et al. 2001).

Einleitung

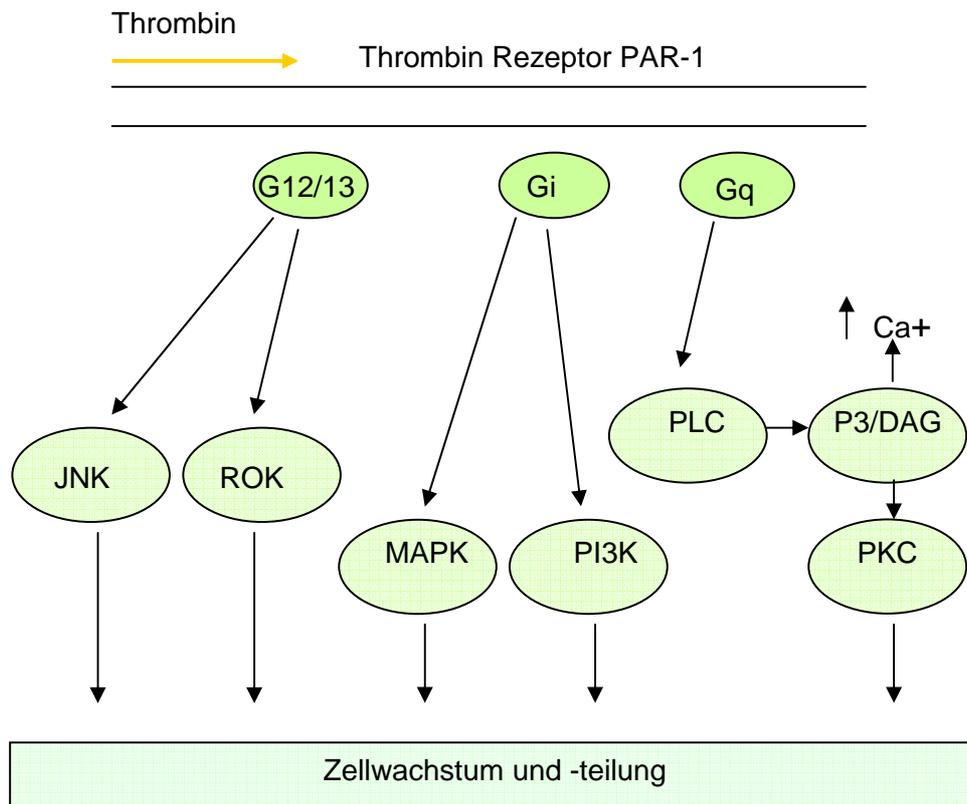


Abbildung 5: Signaltransduktionsweg von Thrombin, modifiziert nach Macfarlane et al. 2001. Abkürzungen: ROK= Rho-assoziierte Kinase; IP3= Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG= Diacylglycerol

Diese Wege sind alle an der Regulation von Zellwachstum und Zellteilung beteiligt. Eine Isoform der PKC - die PKC- ϵ - spielt eine wichtige Rolle in der postnatalen Herzentwicklung (Littler et al. 2003), und die allgemeine Hemmung von PKC blockiert die kardiale Differenzierung (Koyanagi et al. 2005). Eine Reihe der Thrombin-Wirkungen werden indirekt durch eine Stimulation der Freisetzung von Wachstumsfaktoren vermittelt. Nach Thrombin-Stimulation werden vor allem Wachstumsfaktoren wie FGF-2, VEGF und *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) vermehrt freigesetzt (Bassus Set al. 2001; Cucina et al. 2002). Das HB-EGF ist Mitglied der EGF-Superfamilie. Die EGF-Rezeptoren (ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4) spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung vieler Organe. Vor allem der ErbB2-Rezeptor spielt eine große Rolle während der embryonalen Herzentwicklung (Lee et al. 1995). VEGF spielt eine wichtige Rolle bei der Vaskulo- und Angiogenese. Die VEGF-Familie setzt sich aus vielen einzelnen Mitgliedern, wie z.B. VEGF-A, -B, -C und -D oder der Placenta-Wachstumsfaktor PlGF, zusammen (Ferrara und Davis-Smyth 1997). VEGF-BB scheint besonders bei der Herzentwicklung

während der Embryogenese wichtig zu sein, wird aber auch im adulten Herz exprimiert (Olofsson et al. 1996).

1.4 Stammzellen als Myozytenquelle für die Myokardregeneration

Es werden verschiedene Ansätze einer exogenen Stammzelltherapie diskutiert: (1) Myokardregeneration durch systemisch oder lokal applizierte Stammzellsuspensionen (Stamm et al. 2003; Wollert et al. 2004), (2) der Organersatz durch *Tissue-Engineering* (Zimmermann et al. 2002; Zimmermann et al. 2006) oder (3) die Aktivierung endogener Stammzellen (Orlic et al. 2003). Die beiden ersten Therapieverfahren können prinzipiell sowohl mit adulten als auch embryonalen Stammzellen durchgeführt werden. Adulte Stammzellen hätten prinzipiell den Vorteil der Bereitstellung aus körpereigenem Material. Dadurch ließe sich bei einer therapeutischen Applikation möglicherweise eine Immunsuppression vermeiden. Das entscheidende Problem im Rahmen einer kardialen Applikation ist aber das bereits erwähnte eingeschränkte Differenzierungspotential. Embryonale Stammzellen hingegen sind pluripotent und können in eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen differenzieren. Sie können entweder aus überzähligen Embryonen, die bei der künstlichen Befruchtung nicht in den Uterus transferiert wurden (Thomson et al. 1995), oder über therapeutisches Klonen gewonnen werden (Rathjen et al. 1998). Neben ethischen Bedenken bestehen jedoch auch biologische Probleme, wie die Gefahr der Teratom- bzw. Teratokarzinom-Entwicklung (Andrews 1998). Dies könnte vermutlich durch vollständige terminale Differenzierung vor Einbringen in den Organismus oder Abtrennung von undifferenzierten Zellen überkommen werden. Während entsprechende Protokolle für die neuronale Oligodendrozyten-Differenzierung scheinbar bestehen (Yang et al. 1996), gibt es bisher noch kein gut etabliertes Protokoll zur gerichteten Differenzierung von embryonalen Stammzellen in eine kardiovaskuläre Richtung. Ethische Probleme könnten über eine Anwendung nicht-embryonaler pluripotenter Stammzellen z.B. spermatogoniale Stammzellen (Guan et al. 2006), induzierte Stammzellen (Takahashi und Yamanaka 2006) oder parthenogenetische Stammzellen (Cibelli et al. 2002) umgangen werden. Ob jedoch die Gefahr der Teratomentwicklung jemals völlig ausgeschlossen werden kann, bleibt zu klären.

1.5 Künstliche Herzgewebe

Ziel des *Tissue Engineerings* ist es, defektes körpereigenes Gewebe durch im Labor gezüchtetes Gewebe zu ersetzen. „Therapeutische“ bioartifizielle Herzgewebe sollten strukturelle wie auch funktionelle Eigenschaften von nativem Herzgewebe aufweisen und idealerweise biokompatibel sein (Zimmermann et al. 2006). Im Wesentlichen existieren 3 Technologien zur Herstellung bioartifizieller Herzgewebe: (1) Besiedlung präformierter Matrizes mit Herzzellen (Carrier et al. 1999); (2) die *Engineered Heart*

Einleitung

Tissue Technologie (Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann et al. 2000); (3) Zellschicht-Stapelung (Shimizu et al. 2002). Ganz wesentlich für die Herstellung künstlicher Herzgewebe ist die Bereitstellung von ausreichenden Zellmengen. Weil Herzmuskelzellen aus Biopsiematerial nicht vermehrt werden können, bleibt als einzige realistische Option die Anwendung von Stammzellen. Da die spontane kardiale Differenzierungskapazität selbst von embryonalen Stammzellen gering ist, lediglich 1-5% der Zellen in Differenzierungskulturen entwickeln Herzmuskelzeleigenschaften (Klug et al. 1996), erscheint die Entwicklung von Protokollen zur gerichteten kardialen Differenzierung für *Tissue Engineering* Verfahren essentiell zu sein.

1.6 Arbeitsprogramm

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte überprüft werden, ob Wachstumsfaktoren zur Optimierung der kardialen Differenzierung von embryonalen Stammzellen eingesetzt werden können (Abb. 6). Dazu wurden folgende Arbeitshypothesen generiert:

- 1) FGF-2-Stimulation induziert die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen.
- 2) BMP-2-Stimulation induziert die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen.
- 3) Noggin-Stimulation induziert die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen.
- 4) Thrombin-Stimulation induziert die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen.

Neben dem kardiogenen Effekt der einzelnen Faktoren, sollte die optimale Konzentration sowie das optimale Zeitfenster für den entsprechenden Differenzierungsreiz untersucht werden. Als Indikator für eine myokardiale Differenzierung wurde der Anteil kontrahierender Embryoidkörper in Kultur sowie die Transkriptkonzentration des Herzmuskel-spezifischen α -Myosin Schwerketten Proteins analysiert. Es wurde auch die Transkriptmenge von Oct4 bestimmt, in der Annahme, dass eine kardiale Differenzierung (Zunahme von α -MHC) mit einer Abnahme von Oct4 einhergehen müsste. Abschließend sollte das Konzept der Herstellung künstlicher Herzgewebe, basierend auf der EHT-Technologie (Eschenhagen et al. 1997; Zimmermann et al. 2000; Zimmermann et al. 2002), überprüft werden.

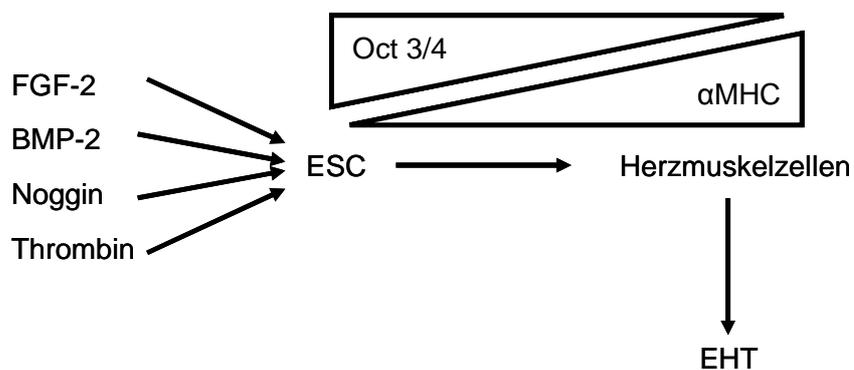


Abbildung 6: Schematische Zusammenfassung der Aufgabenstellung.

2. Material und Methoden

2.1. Gewinnung und Kultur muriner embryonaler Fibroblasten (MEF)

Embryonale Stammzellen wurden auf MEFs in Anwesenheit von *leukemia inhibitory factor* (LIF; ESGRO, Chemicon) kultiviert, um eine spontane Differenzierung zu verhindern. MEFs wurden aus NMRI (*Naval Medical Research Institute*)-Mäusen (ED 13-16) und transgenen C57Bl/6-Mäusen (ED 13; ubiquitäre Expression einer Hygromycin-Resistenz unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase [PGK]-Promotors: PGK-hygroR) isoliert (Genehmigungsnummer: Org #241).

NMRI-Mäuse: Eigenzucht des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf

PGK-hygroR-Mäuse: Freundlicherweise von Frau PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer zur Verfügung gestellt

2.1.1. MEF-Isolation

Die Gewinnung von MEFs erfolgte unter sterilen Bedingungen. Der Kopf, die blutbildenden Organe und das Herz von Mäuseembryonen wurden entfernt. Das restliche Gewebe wurde zunächst mit einer Schere grob zerkleinert. Daraufhin wurden die Gewebefragmente in einen mit Glaskugeln gefüllten Erlenmeyerkolben transferiert und in Trypsinlösung (Difco; 0,2% in w/o PBS [Calcium- und Magnesium-freie Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung]) unter ständigem Rühren enzymatisch verdaut. Im Mittel wurden 10 Embryos in 30 ml Trypsinlösung für 35 min aufgeschlossen. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe des doppelten Volumens an MEF-Medium gestoppt.

MEF-Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 10% fetales Kälberserum (FCS), 1% Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

2.1.2. MEF-Kultur

Die vereinzelt Fibroblasten wurden pelletiert (1.000 g, 4 min, 4 °C), in MEF-Medium resuspendiert und auf mit 0,1%iger Gelatine beschichteten Zellkulturschalen ausplattiert (Fibroblasten aus fünf Embryonen/150 mm Schale). Subkonfluente MEF-Kulturen (nach 2-4 Tagen) wurden insgesamt zweimal im Verhältnis 1:3 bis 1:6 geteilt. Dafür wurden die adhären Zellen zunächst mit w/o-PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsin (0,05%)/EDTA pro 150 mm-Schale für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend mit Serum-haltigem MEF-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden bis zu einer kompletten Vereinzelung trituriert und schließlich erneut pelletiert (1.000 g, 4

min, 4 °C). Das Pellet wurde in MEF-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut ausplattiert.

2.1.3. MEF-Inaktivierung

Subkonfluente kultivierte MEFs (Passage 2) wurden für 2 bis 3 Stunden mit Mitomycin C (MMC; 10 µg/ml Medium) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 7% CO₂-Atmosphäre inaktiviert. Nach einer zweimaligen Waschung mit w/o-PBS wurden die MEFs mit Trypsin (0,05%)/EDTA für 3 bis 5 Minuten inkubiert. Das Trypsin wurde mit MEF-Medium inaktiviert. Die Zellen wurden durch Trituration vereinzelt und zentrifugiert (1.000 g, 4 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in vorgekühltem MEF-Einfriermedium aufgenommen und in 1 ml Aliquots (5x10⁷ Zellen/ml) langsam bei -80 °C eingefroren (kontrollierte Einfrierung mit -1 °C/h durch Anwendung eines mit Isopropanol-gefüllten Einfriergefäßes). Die Lagerung der MEFs erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff. Alternativ wurden die inaktivierten MEFs erneut ausplattiert (50.000 Zellen/cm²). Wachstumsinaktivierte MEFs können bei 37 °C in wasserdampfgesättigter 7% CO₂-Atmosphäre bis zu drei Wochen in Kultur gehalten werden.

MEF-Einfriermedium: 50% MEF-Medium, 40% FCS, 10% DMSO

2.2. Murine embryonale Stammzellen (ESC)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ESCs der Linie R1 (Nagy et al. 1993) und die Zelllinie A6 (αMHC-neoR; Rogge 2007) verwendet.

2.2.1. ESC-Kultur

MEFs wurden auf mit 0,1%iger Gelatine beschichteten Kulturschalen ausplattiert (50.000 MEF/cm²) und nach 24 h mit ca. 2x10⁶ ESC pro 10 cm Schale besiedelt. Das Kulturmedium (ESC-Medium) wurde täglich gewechselt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen je nach Zelldichte im Verhältnis 1:2 bis 1:4 geteilt und neu ausplattiert. Zum Teilen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C in Trypsin (0,25%)/EDTA inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde mindestens das doppelte Volumen ESC-Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Vereinzelnung mit einer Pasteurpipette trituriert und zentrifugiert (1.000 g, 4 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in ESC-Medium resuspendiert und neu ausplattiert. Die Kultur der mES-Zellen erfolgt bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten 7%igen CO₂-Atmosphäre.

Medium: DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 2 mM L-Glutamin, 15% FCS, 1% NEAA, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1% Nucleosidmix, 10 ng/ml LIF

Nucleosidmix: 80 mg Adenosin, 85 mg Guanosin, 73 mg Cytidin, 73 mg Uridin, 24 mg Thymidin in 100 ml PBS

2.2.2 Differenzierung von ESCs

ESC wurden aufgetaut und zwei oder vier Tage in ESC-Medium auf MEFs kultiviert. Nach Inkubation mit Trypsin (0,25%)/EDTA für 3 bis 5 Minuten bei 37 °C in einer 7%igen CO₂-Atmosphäre wurde das Trypsin durch Zugabe von ESC-Medium inaktiviert. Nach Zentrifugation (1.000 g, 4 min, 4 °C) wurden die ESCs in Differenzierungsmedium 1 resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Casy-Zellzähler analysiert und in einer Konzentration von 25.000 Zellen/ml Differenzierungsmedium 2 aufgenommen. Zur Herstellung „hängender Tropfen“, wurden 20 µl (enthalten 500 ESC) von dem Zell-Medium-Gemisch auf die Innenseite eines Petri-Schalendeckels pipettiert. Der Deckel wurde vorsichtig herumgedreht und wieder auf den Petri-Schalenboden platziert. Damit die Tropfen nicht austrocknen, wurde der Boden der Kulturschale mit D-PBS (enthält Calcium und Magnesium) bedeckt. In hängenden Tropfen bilden ESCs Embryoidkörper (*embryoid bodies*: EBs). Nach 2 Kulturtagen wurden die EBs vorsichtig in Zellkulturschalen transferiert und für weitere fünf Tage in Suspensionskultur, danach für weitere 10-12 Tage in Adhäsionskultur mit dem Differenzierungsmedium 2 kultiviert. In diesem Zeitraum entwickelten sich spontan kontrahierende Kardiomyozyten aus den EBs (50 EBs pro 10 cm Kulturschale). Im Mittel zeigten aber unter diesen Standarddifferenzierungsbedingungen (Maltsev et al. 1993) nur 22% der EBs pro Kulturschale Kontraktionen. Durch Weglassen des Suspensionskulturschritts konnte der sonst beim Transfer in Adhäsionskultur übliche Verlust kontrahierender EBs vermieden werden (siehe auch 3.1). In Abb. 7 ist das modifizierte ESC-Kulturprotokoll schematisch dargestellt.

Differenzierungsmedium 1: DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose, 20% FCS, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin, 100 µM 2-Mercaptoethanol, 1% Nucleosidmix, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Differenzierungsmedium 2: Iscove-Medium mit 20% FCS, 1% NEAA, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µM 2-Mercaptoethanol

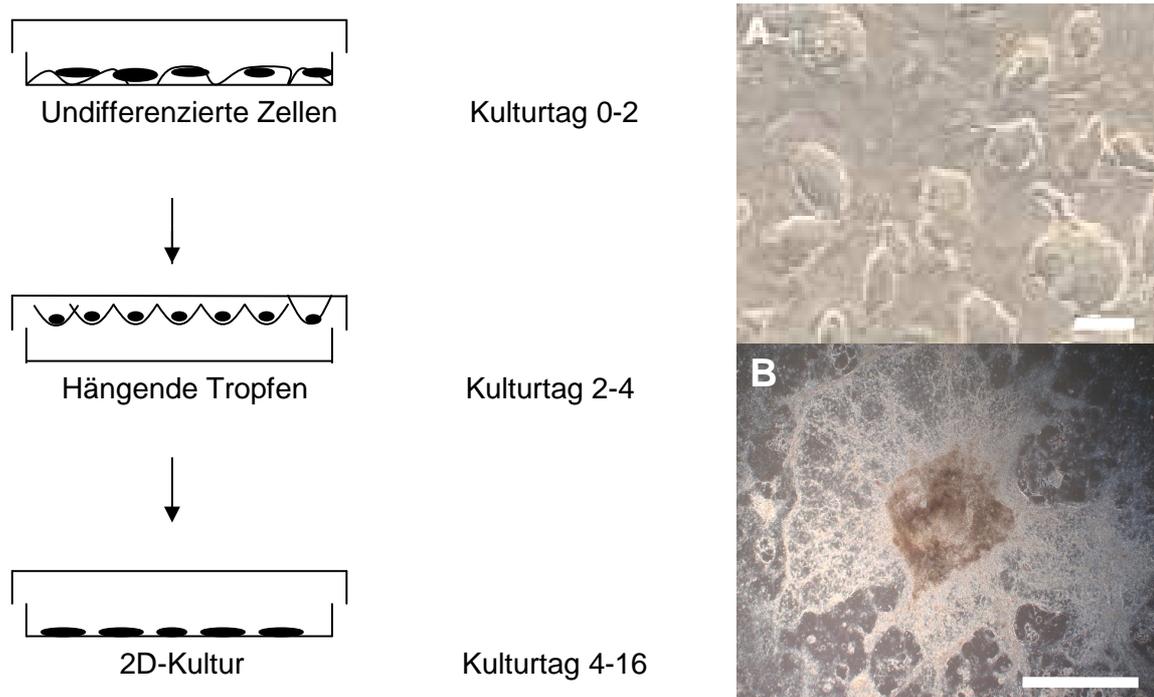


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Differenzierung von ESCs *in vitro*. (A) Undifferenzierte ESCs auf MEFs, (B) adhärenter EB mit Zellauswüchsen. Maßstäbe:(A): 100 µm, (B): 250 µm

2.2.3. Einfrieren und Auftauen von ESCs

Das Einfrieren undifferenzierter ESCs erfolgte nach Vereinzelung, Zentrifugation und Aufnahme des Zell-Pellets in eisgekühltem ESC-Einfriermedium in Kryogefäßen (5×10^7 Zellen in 1 ml Einfriermedium). Die Kryogefäße wurden in mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäßen bei -80 °C eingefroren (Senkung der Temperatur um 1 °C/h).

Das Auftauen von ESC erfolgte schnell bei 37 °C in einem Wasserbad. Nach Zugabe von ESC-Medium und Zentrifugation (1.000 g , 4 min , 4 °C) wurde das Pellet in ESC-Medium aufgenommen und auf mit MEF bewachsenen Zellkulturschalen ausplattiert.

ESC-Einfriermedium: 50% ESC-Medium, 40% FCS, 10% DMSO

2.3 Herstellung von *Engineered Heart Tissues* (EHT)

Vier Silikonschläuche wurden senkrecht in eine Glaskulturschale (\varnothing 6 cm) eingeklebt und jeweils mit einer Teflonscheibe überstülpt (\varnothing 10,6 mm). Danach wurde die Schale 5 mm hoch mit Silikon ausgegossen. Nach Aushärtung des Silikons und Entfernung der Teflonscheiben entstanden vier Vertiefungen (\varnothing 10,6 mm) mit einem zentralen Docht. Die Silikondochte wurden mit Teflonzylindern (\varnothing 4 mm) bestückt, sodass pro Glaskulturschale vier ringförmige Gussformen mit einem Fassungsvermögen von je \sim 450 μ l entstanden (Abb. 8). Diese Kulturschalen wurden ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

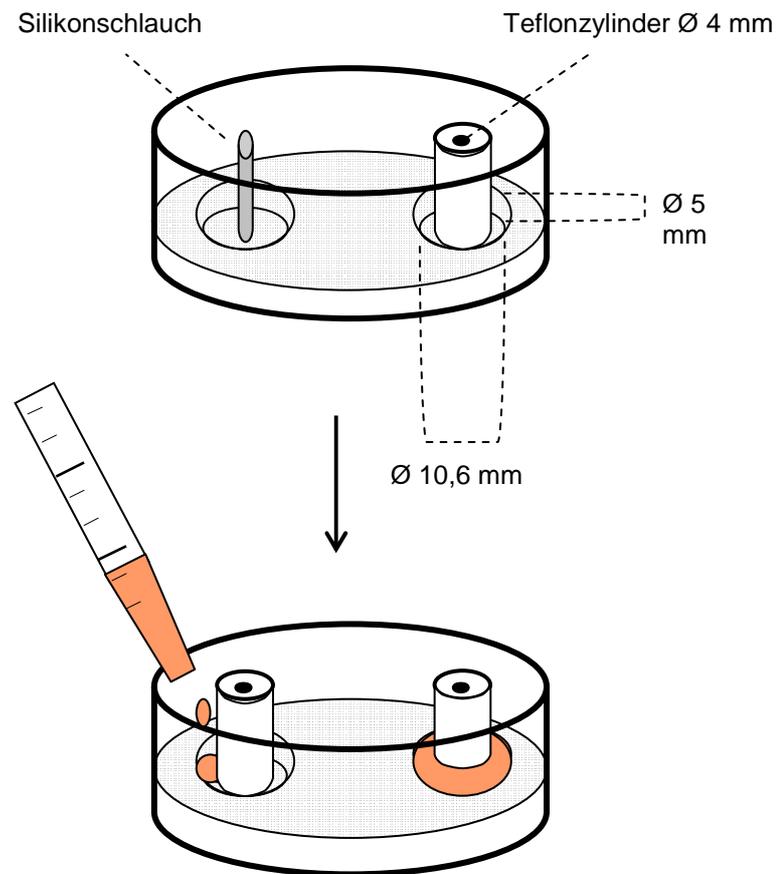


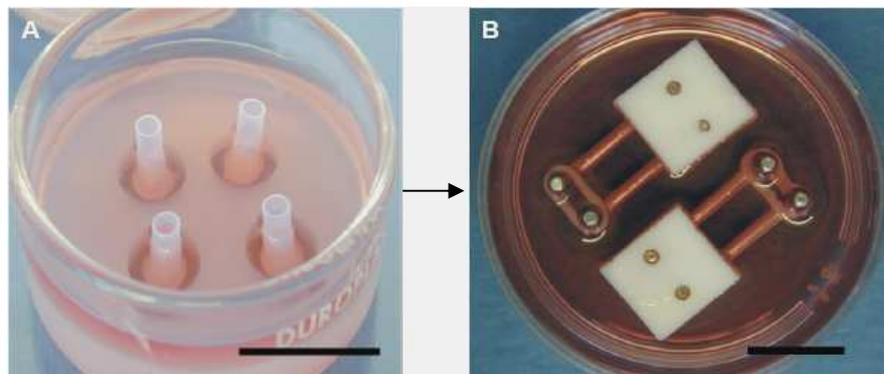
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer Kulturschale und des Gießens der flüssigen Rekonstruktionsmischung zur Herstellung von EHT.

Alle Schritte zur Herstellung von EHT wurden auf Eis durchgeführt, um ein frühes Aushärten der Rekonstitutionsmischung zu verhindern. Kollagen Typ I wurde zunächst vorgelegt, und volumengleich mit konzentriertem Kulturmedium (2x Medium) vermennt. Zur pH-Neutralisierung wurde NaOH (0,1 N) hinzu gegeben. Nach Zugabe extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Matrigel[®]) erfolgte anschließend die Zugabe der EB-Suspension. Zur Herstellung der EB-Suspensionen wurden spontan kontrahierende EBs mit einem Zellschaber vorsichtig von der

Material und Methoden

Kulturschale heruntergeschabt, zentrifugiert (500 g, 4 min, 4 °C), der Überstand des alten Mediums abpipettiert und die EBs volumenangepasst in frischem Medium aufgenommen. Für die Herstellung eines EHT wurden ca. 50 EBs verwendet.

Die EHT-Rekonstitutionsmischung (450 µl) wurde zügig in jede Vertiefung der Gussform pipettiert und für 2 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 40% O₂ inkubiert. Nach Aushärtung des Gemisches erfolgte die Zugabe von 10 ml Differenzierungsmedium 2 pro Kulturschale. Nach dreitägiger Kultur wurden die um den Teflonzylinder kondensierten EHTs vorsichtig aus den Gussformen herausgehoben und auf statische Dehnvorrichtungen gehängt (Abb. 9). Um eine Überwucherung mit Nicht-Myozyten zu verhindern, wurden die Kulturen in Anwesenheit von 200 µg/ml G418 fortgeführt. Die zur EHT-Herstellung verwendete αMHC-NIGIL-Zelllinie exprimiert eine Neomycin-Resistenz nach kardialer Differenzierung (Rogge, Dissertation 2007), so dass Herzmuskelzellen unter der zytotoxischen G418-Behandlung nicht zugrunde gehen konnten.



Maßstäbe: (A): 2 cm, (B): 1 cm

Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der EHT-Kultur in Gußformen (A) und nach Transfer auf statische „Dehner“; Dehnung auf 110% von der Ausgangslage (B).

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs aus mES-Zellen:

| | | |
|----------------------------|--------|--------------|
| Kollagen Typ I (4,5 mg/ml) | 392 µl | → 0,4 mg/EHT |
| 2x Medium | 78 µl | |
| NaOH (0,1 N) | 86 µl | |
| Matrigel | 200 µl | → 10 % v/v |
| EB-Suspension | 844 µl | |

2x Medium: 5 ml 10x DMEM, 5 ml Pferdeserum, 1 ml Hühnerembryonenextrakt, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; auffüllen mit *Aqua ad injectabilia* auf 25 ml.

2.4. RNA-Präparation und quantitative PCR

2.4.1. RNA-Isolation

Zellen wurden zweimal mit eiskaltem D-PBS gewaschen (50 EBs/10 cm Kulturschale), nach Zugabe von 600 µl Trizol/10 cm Schale mit einem Zellschaber von den Kulturschalen abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 120 µl Chloroform/600µl Trizol dazugegeben und das Gemisch ca. 15 sek lang gemischt (Vortex). Nach einer 3-minütigen Inkubationsphase bei RT wurde das Gemisch zur Beschleunigung der Phasentrennung zentrifugiert (12.000 g, 15 min, 4 °C). Dabei entstanden eine phenolische Phase mit Proteinen und DNA sowie eine wässrige RNA-enhaltende Phase. Die wässrige Phase wurde komplett abgenommen, mit 300 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mit 75%igem Ethanol (1,2 ml) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (7.500 g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und das zumeist sichtbare RNA-Pellet 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 10 µl sterilem mit DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Nach 10 min Inkubation bei 58 °C wurde die Probe sofort für 5 min auf Eis gestellt, danach in N₂-schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.4.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Um gleiche RNA-Mengen später in die Reverse Transkription einsetzen zu können, musste die Konzentration der RNA festgestellt werden. Dies erfolgte mit Hilfe photometrischer Messung bei definierten Wellenlängen (260 und 280 nm). Einer Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Die zugleich bestimmte Extinktion bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) wird herangezogen, um die Reinheit der RNA-Proben zu bestimmen. Die Ratio der Extinktionen bei 260 und 280 nm sollte bei aufgereinigten RNA-Proben zwischen 1,8 und 2 liegen.

2.4.3. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die vorhandene RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase unter Zugabe von Nukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *SuperScript First-Strand Synthesis* System (Invitrogen) durchgeführt. Dafür wurden 2 µg RNA mit 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) Primern und 1 µl 10 mM dNTP-Mix in einem Gesamtvolumen von 10 µl (aufgefüllt mit DEPC-behandeltem Wasser) vermengt. Dieses

Material und Methoden

Reaktionsgemisch wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Währenddessen wurde der folgende Mastermix (1x) vorbereitet:

10x RT-Puffer 2 µl
25 mM MgCl₂ 4 µl
0,1 M DTT 2 µl
RNase Out 1 µl

Der Mastermix wurde zu der Probe dazugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig geschüttelt und danach kurz zentrifugiert. Schließlich wurde 1 µl (50 Units) *SuperScript II RT* dazugegeben und der Gesamtansatz bei 42 °C für 50 min inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 min bei 70 °C inkubiert, um die Reaktion zu stoppen und danach sofort auf Eis gestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die hergestellte cDNA bei -20 °C gelagert.

2.4.4. Quantitative PCR

Die Bestimmung von Transkriptmengen wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) in einem ABI PRISM 7900 System (TaqMan) durchgeführt. Neben spezifischen Primern wurden sequenzspezifische, fluorogene Hybridisierungssonden (5'-Ende: 6-Carboxyfluorescein, FAM; 3'-Ende: 6-Carboxy-tetramethylrhodamin; TAMRA) verwendet:

5'Primer

GAPDH 5'-AAC TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'
Oct4 5'-CTT GCA GCT CAG CCT TAA GAA CA-3'
αMHC 5'-ACA GAG TGC TTC GTG CCT GAT-3'

3'Primer

GAPDH 5'-CAG TCT TCT GAG TGG CAG TGA TG-3'
Oct4 5'-GCA TAT CTC CTG AAG GTT CTC ATT GT-3'
αMHC 5'-CGA ATT TCG GAG GGT TCT GC-3'

Sonde mit 5'-FAM und 3'-TAMRA

GAPDH 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG CCC TTC A-3'
Oct4 5'-TAA GCT GCG GCC CCT GCT GGA-3'
αMHC 5'-ACA GTC ACC GTC TTG CCG TTT TCA GT-3'

Material und Methoden

Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1x Reaktionsansatz:

| | | |
|-----------|---|---|
| Mastermix | { | 4,45 μl H ₂ O dest. |
| | | 1,0 μl 10 x Reaktionspuffer |
| | | 1,2 μl MgCl ₂ (Stammlösung: 25 mM) |
| | | 0,2 μl Forward Primer (Stammlösung: 20 μM) |
| | | 0,2 μl Reverse Primer (Stammlösung: 20 μM) |
| | | 0,05 μl TaqMan-Sonde (Stammlösung: 100 μM) |
| | | 0,8 μl dNTP-Mix (jeweils 0,2 μl von 10 mM ATP, CTP, GTP, TTP) |
| | | 0,1 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl AmpliTaq-Gold) |
| cDNA-Mix | { | 0,5 μl cDNA (~ 0,05 μg cDNA Ansatz) |
| | | 1,5 μl H ₂ O |

Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt:

| Temperatur | Zeit | Anzahl der Zyklen |
|------------|--------|-------------------|
| 50°C | 30 sek | 1 |
| 95°C | 10 min | 1 |
| 95°C | 30 sek | 45 |
| 58°C | 1 min | |

Zur Kontrolle der Linearität und Effizienz der PCR wurde für jedes Primer-Sonden-Paar im jeweiligen Lauf eine Verdünnungsreihe aus einer cDNA-Mischung aus gleichen Anteilen aller Proben in Doppelbestimmung mitgeführt. Ebenso wurden immer zwei Wasserkontrollen (NTC = *no template control*) analysiert. Ct-Werte wurden manuell definiert und per $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode von Livak und Schmittgen berechnet (Livak und Schmittgen 2001).

2.5. Statistik

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetische Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und *post hoc* Bonferroni-Test mit der Software Prism4 ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

2.6 Substanzen

- [2-Hydroxyethyl]piperazin-N-[2-ethanesulfonsäure]] (HEPES), Sigma Chemical Co., USA
- 10x Reaktionspuffer für qRT-PCR, Applied Biosystem, Weiterstadt, Deutschland
- Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei), Pharmacia & Upjohn GmbH, Deutschland
- Bone morphogenic protein 2 (BMP2), Peprotech Inc., Deutschland
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma Chemical Co., USA
- Chloroform, Merck, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma, Deutschland
- DMEM, Gibco-BRL, Eggenstein, Deutschland
- dNTPs (Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate), Applied Biosystem, Weiterstadt, Deutschland
- Ethanol, Apotheke Roth, Deutschland
- Fetales Kälberserum (FCS), steril filtriert (0,1 μ m), Gibco
- Fibroblast growth factor-2 (FGF-2), Peprotech Inc., Deutschland
- Gelatine, Sigma, Deutschland
- Geneticinsulfat (G418), Gibco, Deutschland
- Glucose, Merck, Deutschland
- L-Glutamin (100x=200 mM), Gibco-BRL, Deutschland
- Hühnerembryonenextrakt (*chick embryo extract*: CEE), eigene Herstellung
- Hydrogenchlorid (HCl), Merck, Deutschland
- Leukemia Inhibitory Factor (LIF), 10^7 U/ml, Esgro, Chemicon, Deutschland
- Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Merck, Deutschland
- Magnesiumchlorid ($MgCl_2$), Applied Biosystem, Karlsruhe, Deutschland
- Magnesiumsulfat ($MgSO_4$), Merck, Deutschland
- MEM, non-essential amino acids (NEAA), Gibco, Deutschland
- 2- β -Mercaptoethanol, Gibco, Deutschland
- Minimal Essential Medium (MEM), Gibco BRL, Life Technologies LTD, Schottland
- Mitomycin C, Sigma, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Merck, Deutschland

Material und Methoden

- Natriumhydroxid (NaOH), Merck, Deutschland
- Natriumpyruvat, Gibco, Deutschland
- Noggin, Peprotech Inc., Deutschland
- PBS (w/o-PBS und D-PBS), Gibco, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (100x; P/S), Gibco-BRL, Deutschland
- Pferdeserum, Gibco-BRL, Deutschland
- Thrombin, Peprotech Inc., Deutschland
- TRIzol[®] Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Trypsin (0,25%)/EDTA (für ESC-Vereinzelung), Invitrogen, Deutschland
- Trypsin (0,05%)/EDTA (für MEF-Vereinzelung), Invitrogen, Deutschland

Alle verwendeten Substanzen hatten den höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad.

2.7 Hilfsmittel und Geräte

- ABI prism 7900 HT (384-well-Format)
- Autoklav, Wesarg, Medizintechnik, Deutschland
- Brutschrank, Hera cell 240, Heraeus Instruments, Deutschland
- Brutschrank, BBD 6220 Heraeus Instruments, Deutschland
- Cell Counter CASY, Schärfe System, Deutschland
- Einfriergefäße 1,8 ml, Nunc, Deutschland
- Einwegspritzen, Injekt 10 ml, 20 ml, B.Braun Melsungen AG, Deutschland
- Elektroporationsküvette, BioRad Laboratories, USA
- Eppendorf Safe Lock Reaktionsgefäße, Deutschland
- Feinanalysewaage, Mettner H51, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera, Carl Zeiss, Deutschland
- Kühlzentrifuge Modell J-6B mit Schwenkbecherrotor 5200, Beckman Instruments Inc., USA
- Kulturschalen, Nunc, Deutschland
- Kulturschalen (Polymethylpenten), Nalge Co, Nalgene Labware Div., USA
- Mikroskop, Labovert, Leitz, Deutschland
- Mikroskop, Axioplan, Carl Zeiss, Deutschland
- Mikrowelle, SHARP, Deutschland
- Multikanalpipetten, 8 und 12 Kanäle, Eppendorf, Deutschland
- Pasteur Pipetten, Brand GmbH, Deutschland
- pH-Meter, Knick GmbH, Deutschland
- Pipetten 10 µl, 100 µl und 1000 µl, Sarstedt, Deutschland

Material und Methoden

- Pipetten, 10 ml, wide tip with plug, Becton Dickinson Labware, USA
- Pipetten (serologisch), 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Sarstedt, Deutschland
- Pipettenspitzen, Sarstedt, Deutschland
- Pipettierhilfe, pipettus-akku, Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
- Polypropylenröhrchen (steril; 15 ml, 50 ml), Sarstedt, Deutschland
- Präparationsbesteck, Hammacher Instrumente, Deutschland
- Silikon, Dow Corning GmbH, Deutschland
- Skalpell, sterile Skalpellklinge, Bayha, Deutschland
- Sterilbank, Lamin Air HB 2448, Heraeus Instruments, Deutschland
- Sterilfilter (0,2 μm), einmal Filterhalter, Schleicher & Schuell, Deutschland
- Sterilfilter (0,22 μm), Steritop, Vakuumfilter, Millipore, USA
- Thermomixer, Eppendorf, Deutschland
- Vortex Typ REAX 1, Heidolph, Deutschland
- Waage, OHAUS GT410, Florham Peak, USA
- Waage, PM 480 Delta Range, Mettler Instruments, Deutschland
- Wasserbad, GfL m.b.H., Deutschland
- Wasserbad, Medax Nagel GmbH, Deutschland
- Zellsieb, 60 mesh (250 μm), CD-1 Sieb, Sigma Chemical Co, USA

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass Wachstumsfaktoren (FGF-2, BMP-2 bzw. Noggin) sowie Thrombin das Differenzierungsverhalten von embryonalen Stammzellen beeinflussen können. Dabei stellte sich auch die Frage, ob die myokardiale Differenzierung von der jeweiligen Faktorenkonzentration und/oder vom Zeitpunkt der Stimulation abhängig ist. Schließlich sollte überprüft werden, ob ESC-abgeleitete Herzmuskelzellen zur Herstellung von EHT geeignet sind. Im Ergebnisteil werden die Kernbefunde dargestellt. Im Anhang sind alle Rohdaten zusammen gefasst.

3.1. Optimierung der Kulturbedingungen

Unter Standard-ESC-Kulturbedingungen (Maltsev et al. 1993; Abb. 10) konnten in lediglich $20 \pm 5\%$ der kultivierten EBs spontane Kontraktionen beobachtet werden (Auswertung von 10 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs). Diese niedrige „Differenzierungseffizienz“ war technisch bedingt, da vor allem kontrahierende EBs bereits während der Suspensionskultur auf dem Kulturschalenboden anhafteten (trotz Verwendung von Kulturschalen mit hydrophiler Beschichtung) und dann beim Transfer in die Adhäsionskultur verloren gingen.

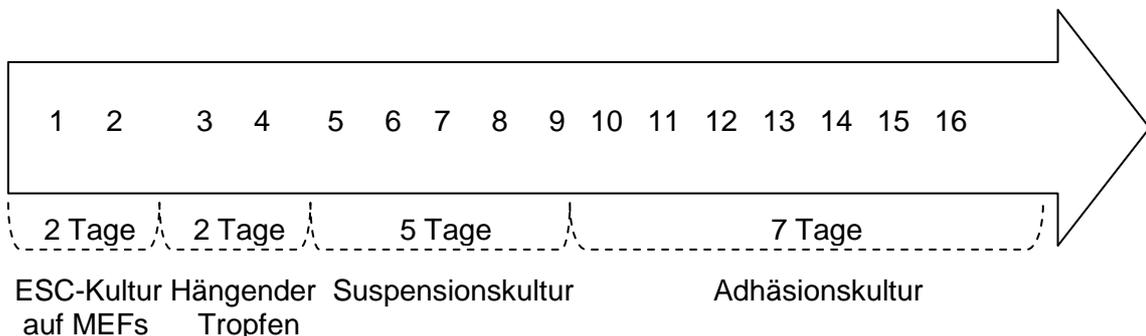


Abbildung 10: Standardprotokoll zur myokardialen Differenzierung von ESCs (Maltsev et al. 1993).

Um den Verlust kontrahierender EBs zu vermeiden, wurde die Phase der Suspensionskultur ausgelassen und EBs aus hängenden Tropfen gleich in Adhäsionskultur überführt (Abb. 11). Bei diesem Vorgehen zeigte sich zu jedem Beobachtungszeitpunkt eine große Anzahl spontan schlagender EBs (Tabelle 2). Da nach 12 Tagen Adhäsionskultur ein Maximalwert von $64 \pm 4\%$ kontrahierenden EBs beobachtet wurde, wurde dieser Zeitpunkt als Referenz für die Analyse der Effekte von Wachstumsfaktoren und Thrombin auf die kardiale Differenzierung von ESC definiert.

Ergebnisse

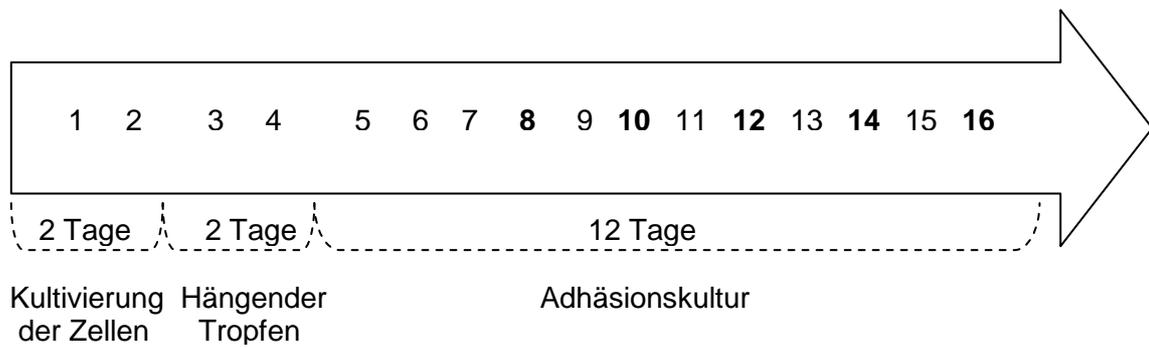


Abbildung 11: Modifiziertes ESC-Differenzierungsprotokoll (**Analysezeitpunkte**).

| Tage in Adhäsionskultur | Anzahl kontrahierender EBs in Prozent |
|-------------------------|---------------------------------------|
| 8 Tage | 53±3% |
| 10 Tage | 57±4% |
| 12 Tage | 64±4% |
| 14 Tage | 54±5% |
| 16 Tage | 52±3% |

Tabelle 2: Prozentualer Anteil kontrahierender EBs an den angegebenen Kulturtagen (Auswertung von jeweils 8 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs).

3.2. Kardiogenes Potential von FGF-2, BMP-2 und Noggin

3.2.1. Morphologische Analysen

Um das kardiogene Potential und den dafür geeigneten Zeitpunkt der Zugabe der Faktoren zu testen, wurden zunächst FGF-2-, BMP-2- und Noggin-Konzentrationen in Anlehnung an Literaturquellen gewählt:

FGF-2: 1 ng/ml (Kawai et al. 2004)

BMP-2: 0,3 ng/ml (Yuasa et al. 2005)

Noggin: 150 ng/ml (Yuasa et al. 2005)

Das modifizierte ESC-Differenzierungsprotokoll ohne Dazugabe von Faktoren wurde als Kontrollgruppe bestimmt, parallel wurden sieben verschiedene Kulturphasen gewählt an denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Faktoren dazugegeben wurden, um den geeigneten Stimulationszeitpunkt zu finden.

Ergebnisse

Beginn und Dauer der Stimulation wurden wie folgt gewählt (Abb. 12):

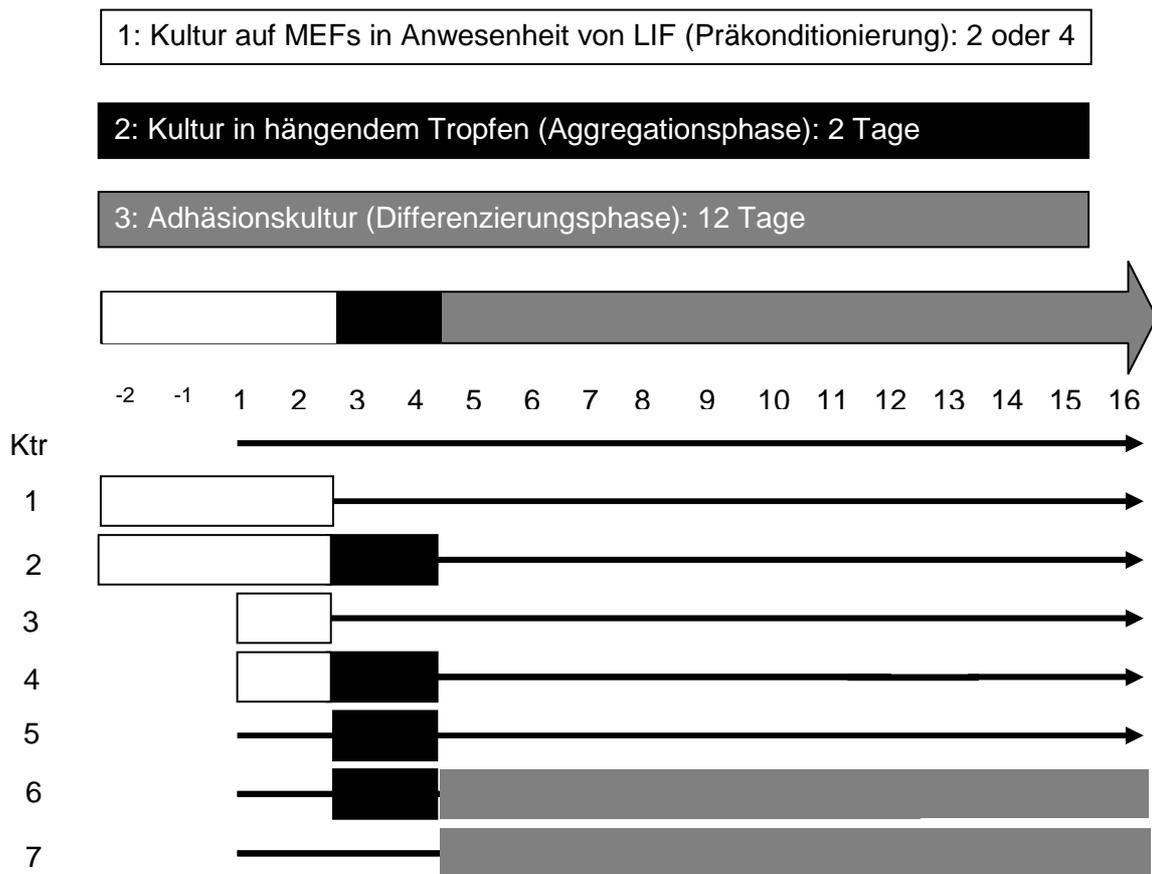


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Kulturformen und des Stimulationszeitpunktes. Die Balken zeigen den Zeitpunkt der Stimulation, die Farben stehen für die Kulturphase.

Als Erweiterung zu dem zuvor dargelegten Protokoll wurde eine Präkonditionierungsphase auf MEFs und in Anwesenheit von LIF für bis zu 4 Tagen gewählt. Dieses erfolgte in der Annahme, dass sich eine mesodermale Differenzierung bereits zu einer frühen Kulturphase (entspricht ca. Tag 4-8 der Embryonalentwicklung *in vitro*) determiniert. Ausgewertet wurde schließlich der Anteil kontrahierender EBs nach 12 Tagen Adhäsionskultur (dies entspricht dem 16. oder 18. Tag des Versuchs, je nachdem ob die Kultur auf MEFs 2 oder 4 Tage gewählt wurde). Die Kardiomyozytendifferenzierung wurde durch Zählung der kontrahierenden Areale bestimmt. Parallel wurden Adhäsionskulturen für 8 Tage durchgeführt. Die Ergebnisse waren grundsätzlich mit den 12 Tage Adhäsionskulturdaten vergleichbar, wenn gleich auf einem niedrigeren Niveau (Darstellung im Anhang). Es zeigte sich eine Zunahme der kontrahierenden EBs bei früher Stimulation (Kulturphase 1 und 2) im Sinne einer „Vorkonditionierung“ unabhängig vom gewählten Stimulus (Abb. 13). Der Anteil kontrahierender EBs war in den FGF-2- und Noggin-Gruppen jeweils am höchsten.

Ergebnisse

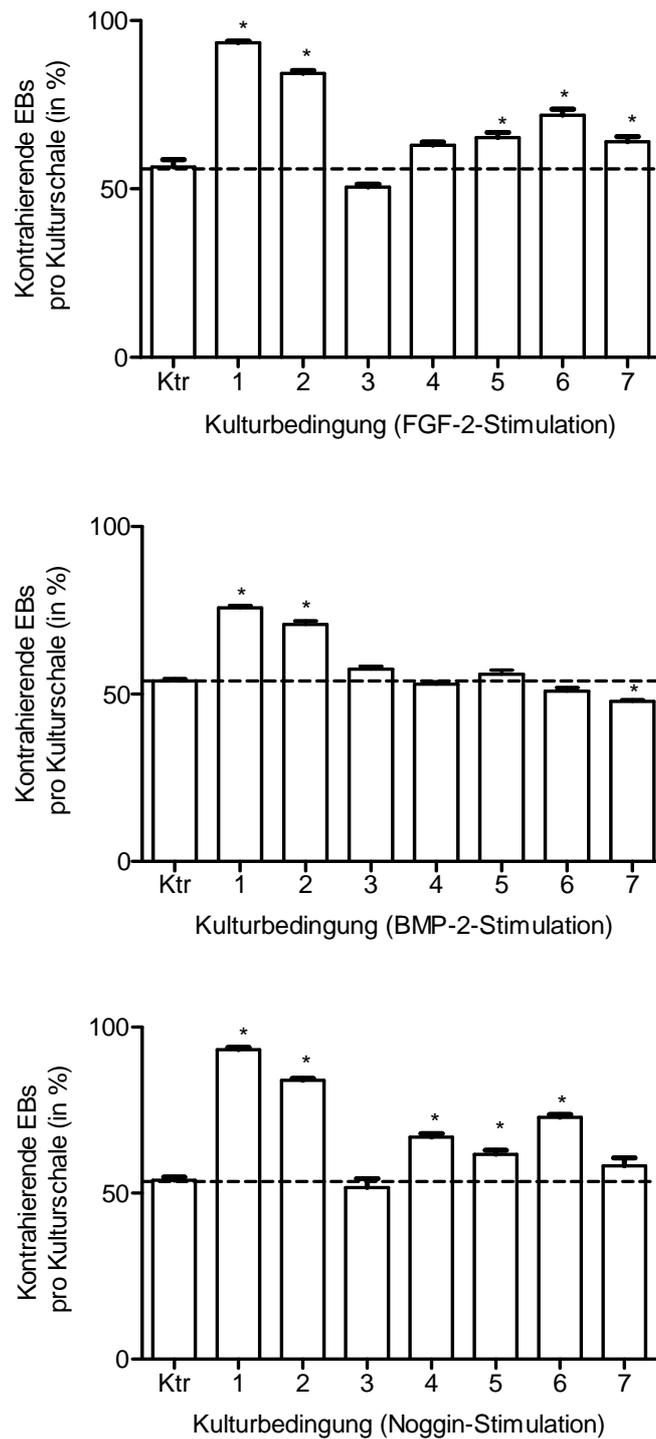


Abbildung 13: Darstellung des prozentualen Anteils kontrahierender EBs nach 12 Tagen Adhäsionskultur (Auswertung von 4 Kulturschalen/Gruppe mit jeweils 50 EBs). Die Stimulationszeitpunkte in Kultur wurden wie in Abb.12 definiert gewählt. Folgende Wachstumsfaktorkonzentrationen wurden eingesetzt: FGF-2 (1 ng/ml), BMP-2 (0,3 ng/ml) und Noggin (150 ng/ml). Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Wert der Kontrollgruppe (Ktr). * $p < 0,05$ vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test)

Ergebnisse

3.2.2. Analysen mittels quantitativer PCR

Die reine Beurteilung von kontrahierenden EBs sagt wenig über die tatsächliche Kardiomyozyten Anzahl oder die tatsächliche Induktion eines spezifischen kardialen Expressionsprogramms aus. Um letzteres besser bestimmen zu können, wurde die Transkriptmenge eines Surrogatmarkers für eine Herzmuskeldifferenzierung (α -MHC) und eines Stammzellmarkers (Oct3/4) per quantitativer PCR bestimmt. Dabei wurde beobachtet, dass bei einer frühen Stimulation mit FGF-2, BMP-2 und Noggin (Kulturphase 1 und 2) höhere α MHC Transkriptmengen als in der Kontrollbedingung und den anderen Versuchsgruppen zu beobachten waren (Abb. 14). Dieser Effekt war in der FGF-2 Gruppe am deutlichsten ausgeprägt.

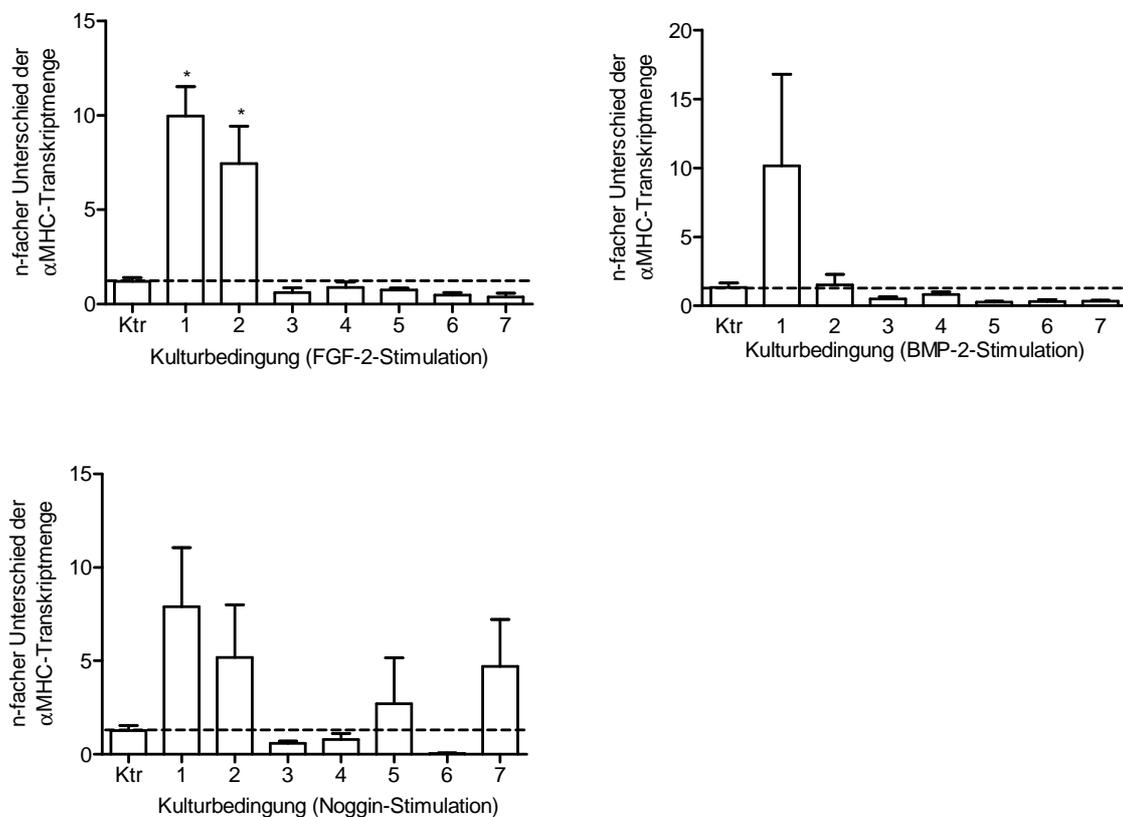


Abbildung 14: Darstellung des Unterschieds der α MHC-Transkriptmenge in den einzelnen Versuchsgruppen (siehe Abb. 12) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auswertung von 6 Kulturschalen/Gruppe mit jeweils 50 EBs. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Wert der Kontrollgruppe (Ktr). * $p < 0,05$ vs. Ktr (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test)

Ergebnisse

Zur Kontrolle wurde eine cDNA-Verdünnungsreihe aus adultem Mausherz und undifferenzierten mES-Zellen mitgeführt. Es fand sich, wie erwartet, keine Oct3/4 Expression im Myokard adulter Mäuse und keine α MHC-Expression in undifferenzierten Stammzellen. Während in Adhäsionskultur α MHC-Transkripte eindeutig nachweisbar waren, konnte keine relevante Menge an Oct3/4 nach Differenzierung detektiert werden.

3.2.3. Identifikation einer kardio-induktiven Kulturphase

Auffallend und zunächst überraschend war, dass es eine „sensible Phase“ für die Stimulation mit Wachstumsfaktoren scheinbar schon vor Herstellung von EBs gab. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte der Kulturphase 1 und 2 nicht alleine durch die längere Vorkulturphase aufgetreten sein könnten, wurde in einer neuen Versuchsserie auch in der Kontrollgruppe eine 4-tägige Vorkulturphase auf MEFs mit LIF ohne Passagierung durchgeführt. Auch in dieser exemplarisch durchgeführten Versuchsserie (Abb. 15) zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Trend (nicht signifikant) zu einer höheren α MHC-Transkriptmenge nach 4 tägiger FGF-2 bzw. Noggin-Stimulation während der „Vorkulturphase“. Die BMP-2 Stimulationsbedingungen zeigten dagegen keinen Unterschied zur Kontrolle.

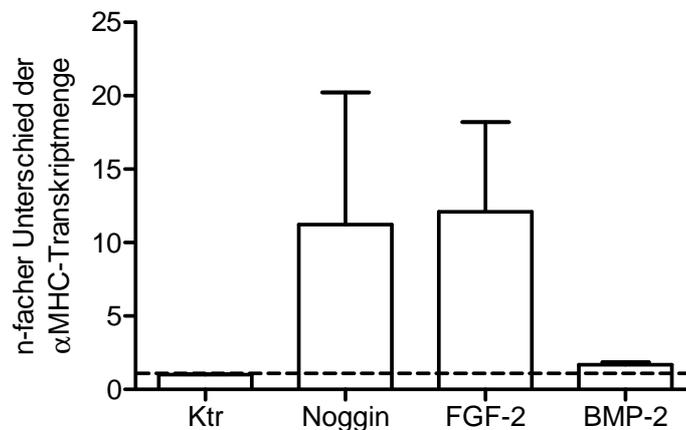


Abbildung 15: Darstellung des Unterschieds der α MHC-Transkriptmenge in den unterschiedlich behandelten Versuchgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktr). Es wurden in jeder Gruppe 3-4 Kulturschalen/Gruppe, mit jeweils 50 EBs ausgewertet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Wert der Kontrollgruppe.

3.2.4. Effekte in Abhängigkeit der FGF-2-, BMP-2- und Noggin-Konzentration

Nachdem eine kardio-induktive Kulturphase definiert werden konnte, wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte konzentrationsabhängig sind. Als Surrogatmarker für eine kardiale Differenzierung wurde erneut die α MHC-Transkriptmenge bestimmt. Die Kulturen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt (Abb. 16).

Ergebnisse

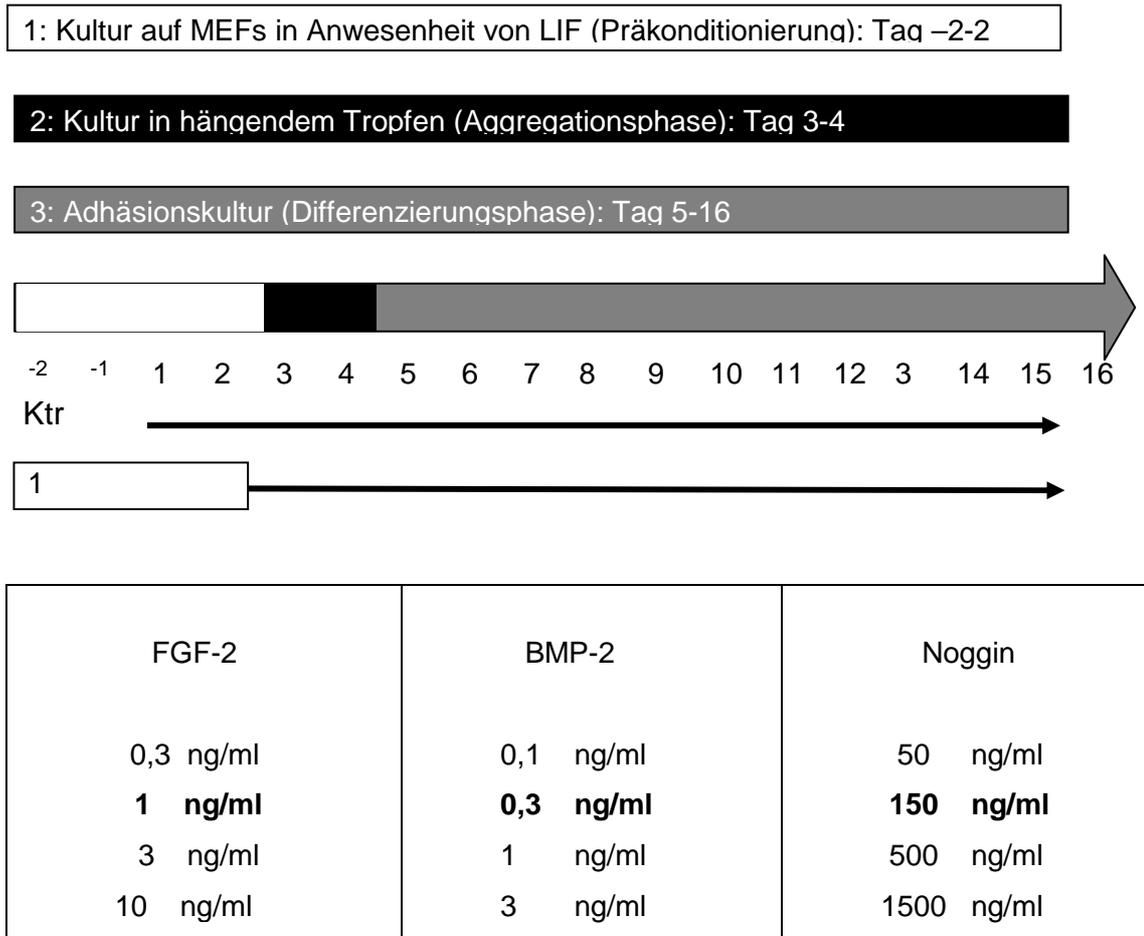


Abbildung 16: Stimulationsprotokoll und tabellarische Auflistung der untersuchten Wachstumsfaktorkonzentrationen (**Standardkonzentration aus den vorangegangenen Experimenten**).

In dieser Versuchsserie zeigte sich eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit in der FGF-2 Versuchsserie (Abb. 17) mit einem Maximaleffekt bei 3ng/ml. Dagegen war in der BMP-2 Serie nur eine leichte, nicht konzentrationsabhängige Erhöhung der α MHC-Transkriptmenge zu beobachten. Noggin zeigte dagegen ausschließlich bei 150 ng/ml einen ausgeprägten Differenzierungsfördernden Effekt.

Ergebnisse

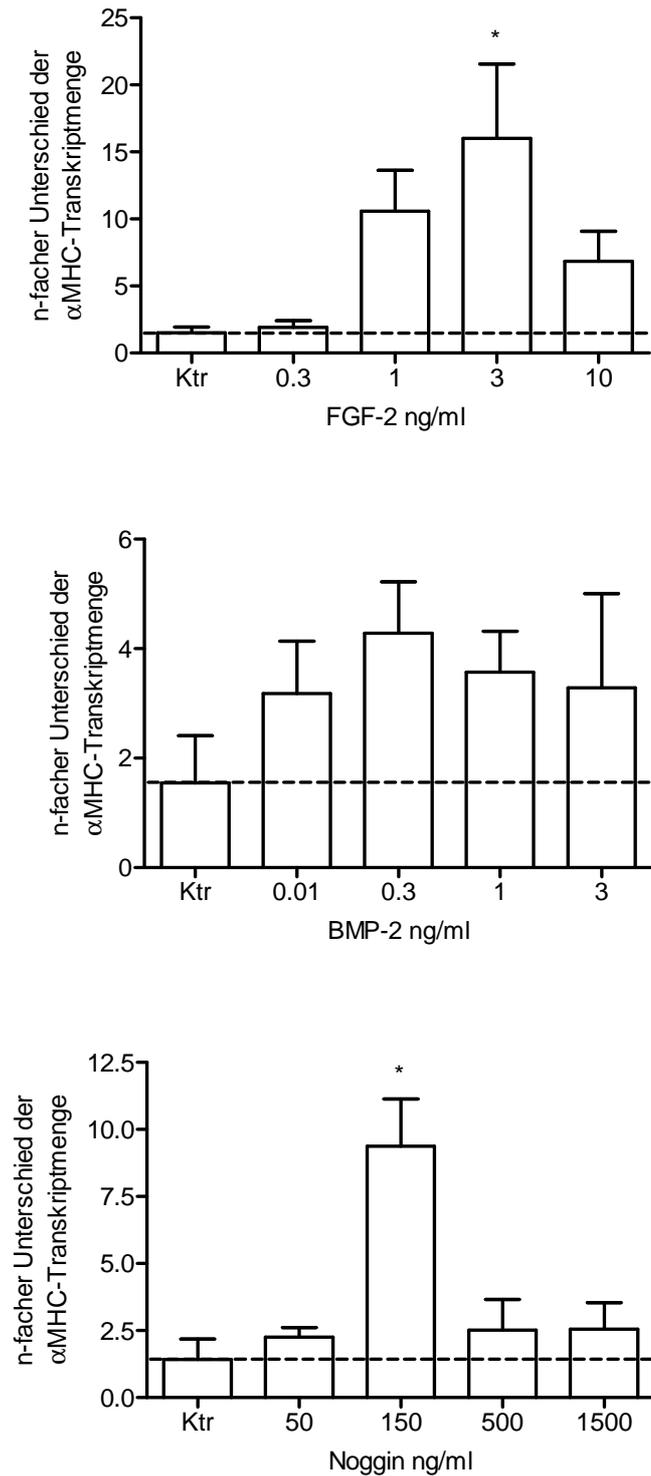


Abbildung 17: Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur in Abhängigkeit von der Wachstumsfaktorkonzentration. Es wurden 8-10 (FGF-2) bzw. 4-6 (BMP-2 und Noggin) Kulturschalen/Gruppe mit jeweils 50 EBs ausgewertet. Die gestrichelte Linie verdeutlicht das Expressionsniveau der Kontrollgruppe. * $p < 0,05$ vs. Ktr (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

3.3. Thrombin als kardiogener Faktor

Die bisherigen Experimente deuteten darauf hin, dass ESCs zu einem frühen Zeitpunkt ihrer Differenzierung besonders empfindlich auf kardiogene Stimuli reagieren. Dieser Befund deckt sich mit unseren Beobachtungen, dass von unserer Arbeitsgruppe rekombinant hergestelltes LIF-Protein im Vergleich zu „kommerziellem“ LIF-Protein (ESGRO) ein scheinbares kardiogenes Potential aufweist. Dieses scheinbare kardiogene Potential „unseres“ LIF-Proteins war vermutlich auf differenzierungsfördernde Kontaminationen zurück zu führen. Als biologisch aktive Kontamination in „unserem“ LIF kam die Protease Thrombin in Frage, mit der wir nach in vitro Synthese eines GST-LIF Fusionsprotein den GST-Anhang abgetrennt hatten (Rogge 2007, Dissertation). Aufbauend auf dieser Hypothese berechneten wir den „kontaminierenden“ Thrombin Anteil: In 2,5 ml LIF-Suspension setzten wir 10 U Thrombin ein (4 U/ml); davon wurden wiederum 140 µl pro l ESC-Medium verwendet. Dementsprechend enthielt 1 ml ESC-Medium 0,0006 U Thrombin während der 4-tägigen Vorkultur (0,6 U/l). Als Kontrollgruppe wurden ESC unter gleichen Bedingungen, aber ohne Zugabe von Thrombin kultiviert. Schließlich wurde der Anteil kontrahierender EBs nach 12 Tagen Adhäsionskultur bestimmt und direkt mit FGF-2, BMP-2 und Noggin stimulierten Kulturen verglichen. Die Thrombin-stimulierten Kulturen zeigten dabei den größten Anteil kontrahierender Areale (98±1% der EBs zeigten Kontraktionen; Abb. 18).

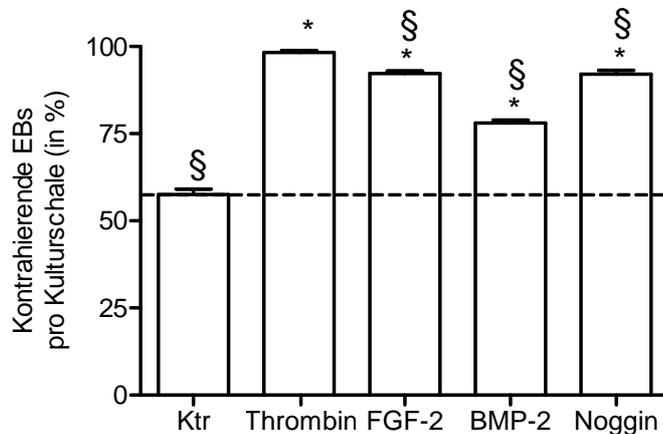


Abbildung 18: Darstellung des prozentualen Anteils kontrahierender EBs nach 4 Tagen Vorkultur, 2 Tagen „Hängendem Tropfen“ und 12 Tagen Adhäsionskultur. Die Stimulation mit den angegebenen Faktoren wurde während der Vorkulturphase durchgeführt: Thrombin (0,6 U/l), FGF-2 (1 ng/ml), BMP-2 (0,3 ng/ml) und Noggin (150 ng/ml). Es wurden pro Versuchsgruppe 8 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Wert der nicht stimulierten Kontrollgruppe. * $p < 0,05$ vs. Ktr. § $p < 0,05$ vs. Thrombin (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

Ergebnisse

Analog zu den Experimenten mit FGF-2, BMP-2 und Noggin wurde auch in der Thrombin-Versuchsserie die α MHC-Konzentration nach 12 Tagen Adhäsionskultur im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen untersucht. Hier zeigte sich eine massive Hochregulation der α MHC-Transkriptmenge unter 0,6 U/l Thrombin (Abb. 19).

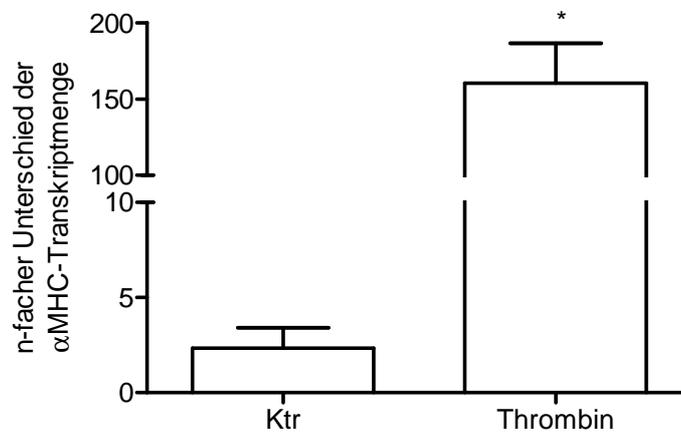


Abbildung 19: Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur ohne und mit Thrombinstimulation (0,6 U/l) in der Vorkulturphase. Es wurden 5 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. * $p < 0,05$ vs. Ktr. (zweiseitiger ungepaarter t-Test).

Zusätzlich wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Thrombineffekts ermittelt. Dabei zeigte sich bei 0,6 U/l Thrombin die höchste α MHC-Konzentration (Abb. 20).

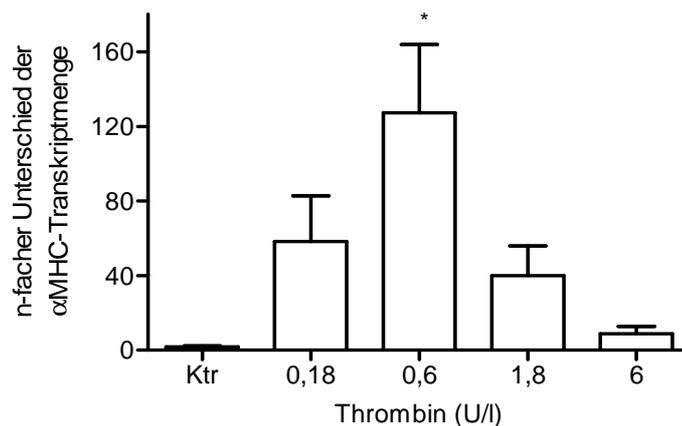
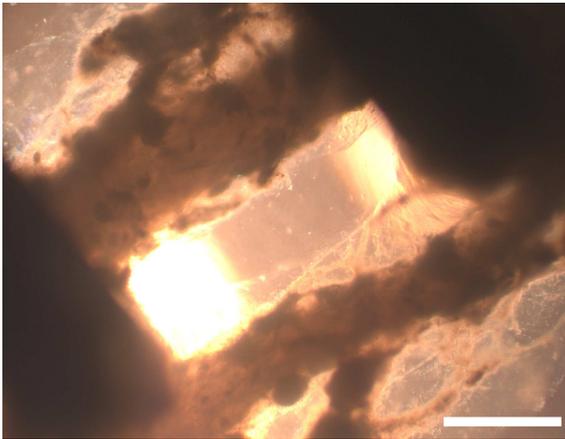


Abbildung 20: Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur ohne und mit Thrombinstimulation in der Vorkulturphase. Es wurden 11 Kulturschalen/Gruppe mit jeweils 50 EBs ausgewertet. * $p < 0,05$ vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

3.5. Herstellung von EHTs aus Embryoidkörpern

Die bisherigen Befunde zeigen eine gesteigerte kardiale Differenzierung von embryonalen Stammzellen unter FGF-2-, BMP-2-, Noggin-, und Thrombin-Stimulation. Dabei war der Effekt mit Bezug auf den prozentualen Anteil kontrahierender EBs (98%; Abb. 18) und auf die α MHC-Transkriptmenge (150-fach mehr als in der Kontrollgruppe; Abb. 19) unter Thrombin am stärksten ausgeprägt. Ausgehend von diesen Befunden wurden EHTs aus mit FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin kardio-induzierten EB-Kulturen generiert. Dafür wurden zunächst EHTs mit einer unterschiedlichen Anzahl schlagender EBs gegossen (50, 100 und 150 EBs/EHT; Abb. 21). EHTs aus 50 EBs zerrissen zu über 50%, während EHTs aus 150 EBs keine Kontraktionen entwickelten. EHTs aus 100 EBs kondensierten dagegen gut, waren reißfest und fingen an spontan zu kontrahieren.

(A)



(B)

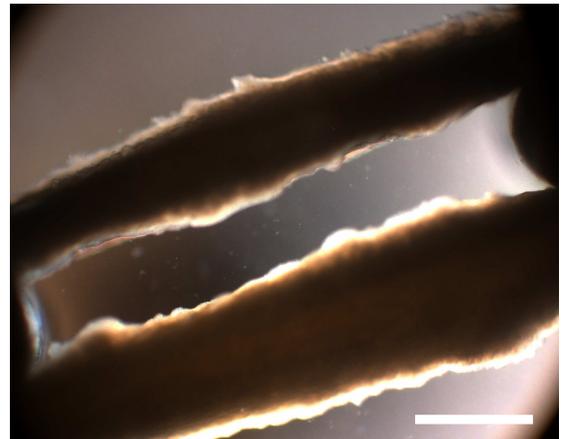


Abbildung 21: EHTs aus differenzierten EB-Kulturen: (A) EHT aus 50 EBs; (B) EHT aus 100 EBs. Maßstab: 1 mm

Ergebnisse

An Kulturtag 6 (Zeitpunkt erster sichtbarer Kontraktionen) wurde eine Zellselektion mit G418 durchgeführt. Bei Anwendung der selektionierbaren Zelllinie A6 (α MHC-neoR; Rogge 2007) konnte so eine Überwucherung mit Nicht-Kardiomyozyten verhindert werden. Die Funktionalität der EHTs wurde im Kulturverlauf anhand der Größe spontan kontrahierender Areale (Tab. 5) sowie der spontanen Kontraktionsfrequenz der EHTs (Abb. 22) bestimmt.

| | Ktr n=7 EHTs | FGF-2 n=8 EHTs | BMP-2 n=8 EHTs | Noggin n=8 EHTs | Thrombin n=8 EHTs |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------|---|---|-----------------------------|
| Lokal begrenzte Kontraktionen | Kulturtag 3+8 | Kulturtag 3+10 | Kulturtag 3+8 | Kulturtag 3+10 | Kulturtag 3+6 |
| Koherente Kontraktionen | Kulturtag 3+18 | Kulturtag 3+18 | Kulturtag 3+19 (nur 4 EHTs schlugen) | Kulturtag 3+19 (nur 4 EHTs schlugen) | Kulturtag 3+17 |

Tabelle 5: Ausbildung kontrahierender Areale in EHTs. Die EHT-Kulturen wurden für 3 Tage in Gußformen und anschließend auf statischen Haltern durchgeführt. Dargestellt ist der Kulturtag, an dem entweder lokal begrenzt oder koherente EHT-Kontraktionen zu beobachten waren.

Auffällig war, dass die EHTs, die aus mit FGF-2, Noggin und Thrombin behandelten Zellen hergestellt wurden, eine höhere Kontraktionsfrequenz als unbehandelte Kontroll-EHTs zeigten, während BMP-2 behandelte EHTs eine niedrigere Kontraktionsfrequenz als die Kontrollen aufwiesen (Abb. 22).

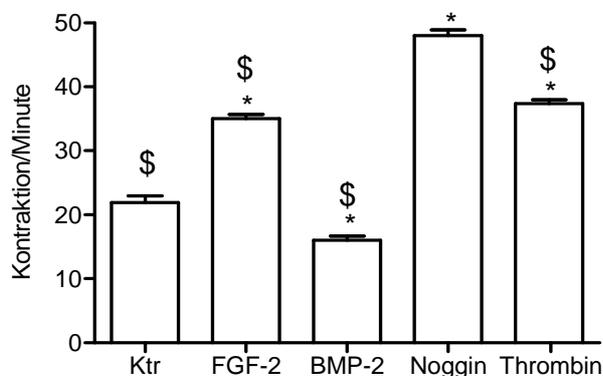


Abbildung 22: Darstellung der Kontraktionsfrequenz pro Minute in den unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen. Es wurden jeweils 8 EHTs ausgewertet. * $p < 0,05$ vs. Ktr. § $p < 0,05$ vs. Thrombin (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

4. Diskussion

Künstliches Herzgewebe könnte sich zur Reparatur von schweren Herzmuskeldefekten eignen (Zimmermann et al. 2006). Für eine Anwendung am Patienten ist die Identifikation einer zuverlässigen Kardiomyozytenquelle für das kardiale Tissue Engineering entscheidend. Stammzellen bieten sich hier an. Während die spontane Differenzierungskapazität von adulten Stammzellen vernachlässigbar ist, zeigen embryonale Stammzellenkulturen in 1-10% der Zellen eine myokardiale Differenzierung (Klug et al. 1996, Kehat et al. 2001). Um Tissue Engineering Verfahren realistisch in einem klinischen Maßstab umsetzen zu können, muss die Myozytenausbeute aus Stammzellkulturen deutlich verbessert werden. Entsprechend dieser Vorgabe war es das Ziel dieser Promotionsarbeit, die kardioinduktive Wirkung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren (FGF-2, BMP-2, Noggin) und von Thrombin zu testen. Als Modellsystem wurden ES-Zellen der Maus verwendet.

Folgende Arbeitshypothesen wurden überprüft:

- 1) FGF-2 induziert eine kardiale Differenzierung in ES-Zellen.
- 2) BMP-2 induziert eine kardiale Differenzierung in ES-Zellen.
- 3) Noggin induziert eine kardiale Differenzierung in ES-Zellen.
- 4) Thrombin induziert eine kardiale Differenzierung in ES-Zellen.

Darüber hinaus stellten sich folgende Fragen:

- 1) Gibt es Kulturphasen, die für einen kardiogenen Reiz besonders empfänglich sind?
- 2) Lassen sich kardial differenzierte ES-Zellen zur Herstellung von EHT verwenden?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

- 1) FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin fördern die Kardiogenese in ES-Zellkulturen.
- 2) Thrombin zeigte dabei den stärksten Kardiogenese-induzierenden Effekt.
- 3) Undifferenzierte ES-Zellen sind besonders empfänglich für kardiogene Stimuli.
- 4) EHTs können aus kardioinduktiv vorbehandelten ES-Zellen hergestellt werden.

4.1. Myokardiale Differenzierung von ESCs

Die myokardiale Differenzierung von ES-Zellen ist erstmalig von Doetschman et al. und Wobus et al. Anfang der 90er Jahre systematisch untersucht worden (Wobus et al. 1992; Doetschman et al. 1993). Im Rahmen dieser Studien wurden ES-Zellen in hängenden Tropfen aggregiert (2 Tage), darauf für 5 Tage in Suspensionskultur gehalten und

anschließend in Adhäsionskultur differenziert. Dieses Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls initial verwendet. Dabei zeigte sich jedoch nur ein sehr geringes kardiales Differenzierungspotential der kultivierten Embryoidkörper (EBs). Ursächlich dafür war vermutlich die schwierige Handhabung der Zellen in Suspensionskultur beim Wechseln des Mediums. Nach Weglassen der Suspensionskulturphase zeigte sich ein deutlich größerer Anteil kontrahierender EBs (64 vs. 20%) nach 16 Kulturtagen (2 Tage Kultur auf MEF in Anwesenheit von LIF gefolgt von 2 Tagen Kultur im hängenden Tropfen und 12 Tagen Adhäsionskultur in Differenzierungsmedium). Demzufolge wurden alle weiteren Experimente ohne eine Suspensionsphase durchgeführt.

4.2. Steigerung der kardialen Differenzierung durch Wachstumsfaktoren

Analysen der Embryonalentwicklung der Maus deuten auf eine Rolle von FGF-2, BMP-2 und Noggin im Rahmen der Herzentwicklung hin (Kawai et al. 2004; Reddi 1994; Stottmann et al. 2001; Solloway und Harvey 2003; Yuasa et al. 2005). Ob diese Faktoren auch *in vitro* die kardiale Differenzierung von ES-Zellen steigern, war unklar, und sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden. Dabei war wichtig zu berücksichtigen, dass Wachstumsfaktoren abhängig vom Zeitpunkt und von der verwendeten Mengen auch gegensätzliche Effekte zeigen können. Khezri et al. z.B. sprechen von der Zunahme der kardialen Differenzierung unter Stimulation mit 10 ng/ml FGF-2; gemessen wurde dieses anhand der Expression von α MHC als Marker für die frühe kardiale Differenzierung (Khezri et al. 2007). Detillieux et al. und Hampton et al. postulieren ein kardioprotektives Potential von 1.000 ng und 10.000 ng FGF-2 durch Förderung der Angiogenese (Detillieux et al. 2003; Hampton et al. 2000). Kruithof et al. hingegen beschreiben bei der Zugabe von 50 ng/ml FGF-2 sogar eine Hemmung der myokardialen Differenzierung, während 50 ng/ml BMP-2 die Herzmuskelzellentwicklung förderte (Kruithof et al. 2006). Barron et al. gehen davon aus, dass FGF und BMP zusammen die höchste Kardiomyozytendifferenzierung bewirken und suchten nach der optimalen BMP Konzentration, während 50 ng FGF/ml konstant blieben. Auch hier waren 50 ng/ml BMP-2 maximal effektiv in Bezug auf die Herzmuskelzell-Differenzierung (Barron et al. 2000). In der Literatur stößt man auch auf widersprüchliche Befunde, wenn es um die Förderung der Kardiogenese durch BMP-2 und Noggin, einem endogenen BMP-Antagonist, geht. So wird berichtet, dass die Herzentwicklung von dem BMP-Signal abhängig ist, und Noggin als BMP-Antagonist die Kardiogenese hemmt (Andrée et al. 1998; Schlange et al. 2000; Schultheiss et al. 1997). Neuste Erkenntnisse besagen jedoch, dass sowohl die Zugabe von BMP-2 als auch von Noggin die Kardiogenese positiv beeinflusst (Kawai et al. 2004; Yuasa et al. 2005). Yuasa et al. postulieren sogar, dass BMP-2 für zwei Schritte der Herz Entstehung unabdingbar ist: die mesodermale Entwicklung und Differenzierung zu Kardiomyozyten, dass aber zwischen diesen zwei

Diskussion

Stufen die Hemmung von BMP durch z.B. Noggin ein Schlüsselfaktor für die Herzmuskelzellentwicklung ist. Um einen optimalen Zeitpunkt für die Kardiomyozytendifferenzierung in ES-Zellkulturen zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit 7 verschiedene Zeitfenster für eine Stimulation mit FGF-2, BMP-2 und Noggin gewählt. Interessanterweise zeigte sich, ebenso wie in der Arbeit von Yuasa et al., dass die höchste α MHC-Konzentration (herzspezifisches Transkript) in den Zellen zu finden war, die bereits sehr früh, d.h. in undifferenziertem Zustand, mit den Wachstumsfaktoren behandelt wurden (Abb.14; Yuasa et al. 2005). Dies deutet darauf hin, dass mesodermale/kardiomyozytäre Differenzierungsentscheidungen schon in undifferenzierten ES-Zellkulturen angestoßen werden. Analog zu dieser Hypothese stellten Kawai et al. fest, dass FGF-2 und BMP-2 während der Formation der drei Keimblätter die frühe Herzentwicklung beeinflussen (Kawai et al. 2004). Dieser Zeitpunkt stimmt in etwa mit dem Zeitpunkt des Blastozystenstadiums überein, aus dem ES-Zellen isoliert werden.

Es galt nun zu klären, ob die Zugabe von den Faktoren zu den undifferenzierten ES-Zellen der richtige Anreiz für die Differenzierung zu Kardiomyozyten ist oder die Tatsache, dass die Zellen für eine maximal myozytäre Differenzierung über einen längeren Zeitraum unpassagiert (2 vs. 4 Tage) gehalten wurden. In parallelen Kulturansätzen konnte exemplarisch gezeigt werden, dass nicht die Kulturdauer, sondern die Zugabe der Wachstumsfaktoren für die Differenzierungsentscheidung bedeutsam war (Abb.15). Das BMP-2 in diesem Versuch keine induktiven Effekt aufwies, könnte der Beobachtung von Yuasa et al. entsprechen; d.h. der gewählte Kulturzeitpunkt könnte im Gegensatz zu anderen Phasen der Entwicklung eher von einer BMP-Signal Repression (z.B. durch Noggin) als BMP-Rezeptor Aktivierung abhängen.

Um eine optimale Konzentration der kardiinduktiven Faktoren zu definieren, wurden Konzentrations-Wirkungsbeziehungen untersucht. Dabei zeigte sich unter 0,3 ng/ml BMP-2 und 150 ng/ml Noggin sowie 3 ng/ml FGF-2 eine maximale kardiinduktive Wirkung (indirekt gemessen an einer Erhöhung der α MHC-Transkriptmenge). Andere Gruppen beschrieben 5 ng/ml BMP-2 für 24 h in ES-Kultur (Behfar et al. 2002) und 10 ng/ml FGF-2 für 2 Tage in Suspensionskultur (Khezri et al. 2007) als maximal kardiinduktiv. Barron et al. zeigten, dass FGF-2 (50 ng/ml) nur zusammen mit BMP-2 (50 ng/ml) für 48 h eine Kardiomyozytendifferenzierung fördert (Barron et al. 2000). Während die Konzentrationsangaben und Faktoren in der Zusammenschau der publizierten Daten nicht definiert scheinen, zeigen die meisten Arbeiten in Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunden, dass ein

Diskussion

früher Stimulationszeitpunkt wesentlich ist. Tabelle 6 fasst weitere potentielle kardiogene Stimuli zusammen.

| Kardiogener Stimulus | Publikation |
|---|--|
| Retinsäure | Wobus et al. 1997 |
| DMSO | Skerjanc 1999 |
| Oxytocin | Paquin et al. 2002 |
| NO | Kanno et al. 2004 |
| Dysmorphin B | Ventura et al. 2003 |
| Cardiogenol | Wu et al. 2004 |
| Dimethylsulfoxid | Paquin et al. 2002 |
| FGF-2 (<i>Fibroblast Growth Factor</i>) | Kawai et al. 2004 |
| BMP-2 (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>) | Behfar et al. 2002; Kawai et al. 2004 |
| TGF- β (<i>Transforming Growth Factor</i>) | Behfar et al. 2002; |
| Noggin | Yuasa et al. 2005; Schluetera et al. 2006 |

Tabelle 6: Zusammenfassung bisher bekannter Stimuli für die kardiale Differenzierung von murinen ES-Zellen.

Während murine ES-Zellen durch die Zugabe von z.B. Cardiogenol C (Wu et al. 2004), Dimethylsulfoxid (Paquin et al. 2002), Retinsäure (Rohwedel et al. 1999; Wobus et al. 1997) oder Oxytocin (Paquin et al. 2002) kardial differenzieren, zeigen humane ES-Zellen weder einen entsprechenden Effekt auf Dimethylsulfoxid (DMSO) noch auf Retinsäure-Stimulation. Dagegen kann die Myozytenzahl in humane ES-Zellkulturen aber scheinbar durch Zugabe von 5-Aza-2'-deoxycytidin gesteigert werden (Xu et al. 2002). Es wird vermutet, dass die durch Retinsäure induzierte Differenzierung von

murinen ES-Zellen auf der Aktivierung des Oxytocin-Rezeptors beruht. Kardiale Oxytocin-Rezeptoren stimulieren die Freisetzung des atrialen natriuretischen Peptids (ANP), welches in der Regulation des Blutdrucks und des Zellwachstums involviert ist. Bei der durch DMSO induzierten Herzmuskellzellendifferenzierung spielt vermutlich die Ca^{2+} -Freisetzung eine Rolle. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die Differenzierungsinduktion Spezies-abhängig ist und dabei auch in den biologischen Signalwegen scheinbar wenige Gemeinsamkeiten zwischen Frosch, Huhn, Maus und Mensch bestehen.

4.3. FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin als kardiogene Faktoren

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit mit direktem Bezug auf die untersuchten Faktoren diskutiert:

4.3.1. FGF-2

Im Vergleich mit BMP-2 und Noggin zeigten FGF-2 behandelten ES-Zellen die stärkste kardiogene Induktion. Andere Arbeiten zeigten ebenso, dass FGF-2 eine wesentliche Rolle bei der Kardiomyozytendifferenzierung von ES-Zellen spielt (Dell'Era et al. 2003; Mima et al. 1995), hypertrophische Effekte in Kardiomyozyten bewirkt und das normale Herzzellwachstum reguliert (Corda et al. 2000). Es wurde aber auch gezeigt, dass FGF innerhalb der kardiogenen Induktion eine synergistische Interaktion mit den BMP-Signalwegen erfordert (Barron et al. 2000; Lough et al. 1996). Experimente in Hühner- und Mausembryonen zeigten, dass bestimmte FGFs wie FGF-1, -2, -4, und -8, wenn sie mit BMP-2 kooperieren, die Kardiogenese erhöhen (Lough et al. 1996). Es sieht so aus, als benötigen mesodermale Zellen BMPs für die Induktion der kardiogenen Vorläuferzellen und FGFs für den Erhalt der Proliferations- und Überlebensfähigkeit der differenzierten Kardiomyozyten. Diese Promotionsarbeit zeigt jedoch deutlich, dass auch die alleinige Stimulation undifferenzierten ES-Zellen mit FGF-2 zu einer stark erhöhten kardialen Differenzierung führt.

4.3.2. BMP-2

BMP-2 zeigte den geringsten Kardiogenese fördernden Effekt der untersuchten Faktoren. Die mit BMP-2 behandelten ES-Zellen exprimierten sogar, bis auf die 2 und 4 Tage präkonditionierten Zellen, weniger α MHC als die unbehandelte Kontrollgruppe (Abb. 14). Auch bei Betrachtung der Ausbildung kontrahierender Areale in EHTs und deren Kontraktionsfrequenz fiel auf, dass die mit BMP-2 behandelten Zellen einen „suboptimalen“ kardialen Phenotyp entwickelten (Tab. 5, Abb. 22). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass BMP-2 wohl nur einen geringen Einfluss auf die kardiale Differenzierung in dem verwendeten ES-Zellmodell hatte. Allerdings konnte auch keine

signifikant negative Wirkung von BMP-2 auf die Kardiomyozytendifferenzierung festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu Taha et al., die bei Behandlung von ES-Zellen mit BMP-2 einer Abnahme von schlagenden EBs und einer Abnahme an differenzierten Kardiomyozyten beobachteten (Taha et al. 2007). Auch Yuasa et al. zeigten, dass die Hemmung von BMP-2 (z.B. durch Noggin) während der undifferenzierten oder frühen Phase der ES-Zelldifferenzierung für die Kardiomyozytendifferenzierung ausschlaggebend ist (Yuasa et al. 2005). Im Gegensatz dazu stehen Aussagen über die Wichtigkeit von BMP-2 für die frühe Herzentwicklung, vermittelt z.B. über den MAPK-Weg (Monzen et al. 1999) und die höhere Expression von GATA4 und Nkx2.5 (die ersten Marker der frühen Herzentwicklung) bei zuvor mit BMP-2 behandelten Zellen (Schlange et al. 2000). Diese unterschiedlichen Feststellungen über BMP-2 lassen sich möglicherweise durch die bereits oben angesprochenen unterschiedlich BMP-sensitiven Differenzierungsphasen erklären. Durch MAPK-Hemmung verhindert BMP-2 eine ES-Zelldifferenzierung. Eine transiente BMP-2-Hemmung, z.B. durch Noggin, bewirkt die Differenzierung in eine mesodermale/kardiogene Vorläuferzelle. Im Anschluss daran stimuliert BMP frühe Herztranskriptionsfaktoren (z.B. Nkx2.5); dies kann als Anzeichen einer frühen myokardialen Differenzierung interpretiert werden (van Wijk et al. 2007). Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden undifferenzierte ES-Zellen mit BMP-2 stimuliert. Dass es in diesem Fall zu keiner verlässlichen Erhöhung der α MHC-Expression, also zu einer gesteigerten Kardiomyozytendifferenzierung, gekommen war, ist im Einklang mit der Hypothese der BMP/Noggin-sensitiven Phasen.

4.3.3. Noggin

Undifferenzierte ES-Zellen zeigten nach transientser Noggin-Stimulation (150 ng/ml) eine signifikante Erhöhung der α MHC-Transkriptkonzentration (Abb. 17). Analog zu dem oben beschriebenen Mechanismus wurde hier vermutlich durch BMP-Signalinaktivierung eine mesodermale/myokardiale Differenzierungsentscheidung angeregt. Auch Yuasa et al. postulierten, dass Noggin, wenn es vor oder nach Bildung von EBs zur Stimulation angewendet wird, eine Steigerung der Kardiomyozytendifferenzierung in murinen ES-Zellen Kulturen hervorruft (Yuasa et al. 2005). Auffällig ist das kleine Wirkfenster, in dem es durch eine Noggin-vermittelten BMP-Antagonismus zu einer kardialen Induktion kommt (Choi et al. 2007; Monzen et al. 1999).

4.3.4. Thrombin

Thrombin wurde erst während der laufenden Arbeit als Kardiogenese fördernder Faktor erkannt (Rogge 2007). In der Annahme, dass auch Thrombin in dem zuvor identifizierten Zeitfenster effektiv ist, wurden undifferenzierte ES-Zellen für 4 Tage mit 0,6 U/l Thrombin

behandelt. Diese Konzentration wurde in Anlehnung an unsere Vorarbeiten gewählt (siehe Absatz 3.3.). Entsprechend der Ausgangshypothese induzierte Thrombin einen deutlich stärkeren Anstieg der α MHC-Transkriptmenge als alle zuvor getesteten Faktoren (Abb. 19). Thrombin aktiviert vor allem über PAR1 (Protease-aktivierter Rezeptor 1) Zellwachstum und Zellteilung. Dabei spielen unter anderem JNK, ROK und über PLC die PKC und DAG eine Rolle. Diese Kinasen werden allesamt ebenso über den non-canonical Wnt Signalweg aktiviert. Und der Wnt-Signalweg ist dafür bekannt, dass er Kardiomyozytendifferenzierung in murinen Stammzelllinien bewirkt und frühe kardiale Marker reguliert (Nakamura et al. 2003; Pandur et al. 2002; Poleskaya et al. 2003; Terami et al. 2004). Ebenso aktiviert Thrombin noch die MAP-Kinase ERK, PKB und PI3K, welche auch durch bFGF (auch FGF-2) aktiviert werden. Somit könnte Thrombin auch über diesen Weg Kardiogenese fördernd wirken. Nach der Identifikation von Thrombin als neuen Kardiogenese-induzierenden Faktor sollen nun Folgeexperimente die Mechanismen der Thrombin-induzierten Differenzierung in ES-Zellen untersuchen.

4.3.5. Tissue Engineering

Im Rahmen dieser Arbeit wurde künstliches Herzgewebe aus murinen ES-Zellen in Anlehnung an ein bereits etabliertes Protokoll hergestellt (Rogge 2007). Das Ziel bei der Herstellung künstlicher Herzgewebe ist die Entwicklung von Gewebekonstrukten mit einer adäquaten kontraktile Funktion sowie einer differenzierten Muskelstruktur. Durch Anwendung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Kardiogenese-Induktionsprotokolle sollte die Herstellung von EHTs optimiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten murinen ES-Zell-EHTs kontrahierten spontan und kohärent, jedoch waren deutliche Unterschiede in der EHT-Entwicklung und Kontraktionsfrequenz in Abhängigkeit von der Zellstimulation zu beobachten. So zeigte sich, dass EHTs, die aus mit Thrombin behandelten ES-Zellen gefertigt wurden, sowohl früher anfangen kontrahierende Areale aufzuzeigen (Tab. 5), als auch, ebenso wie die mit FGF-2 behandelten EHTs, eine höhere Kontraktionsfrequenz als die Kontroll-Gruppe aufwiesen (Abb. 22). Die mit BMP-2 und Noggin behandelten EHTs zeigten, entsprechend der Hypothese einer gegensätzlichen Beeinflussung der BMP-Signalkaskade, eine langsamere (BMP-2) oder schneller (Noggin) spontane Kontraktionsfrequenz. Folgeuntersuchungen müssen klären, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen Kontraktionsfrequenz und Muskelbildungseffizienz in EHTs gibt.

5. Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass FGF-2, BMP-2, Noggin und Thrombin unterschiedlich stark die kardiale Differenzierung von murinen Stammzellen fördern. Dabei waren der Zeitpunkt der Stimulation (vor Aggregation zu hängenden Tropfen) und die eingesetzte Faktorenkonzentration entscheidend. Thrombin zeigte den stärksten kardiogenen Effekt. Ob eine Kombination der getesteten Faktoren die kardiale Differenzierung in ES-Zellkulturen weiter steigern kann, bleibt zu klären. Abschließend wurden Wachstumsfaktoren-konditionierte EBs zur Herstellung von EHTs eingesetzt. Diese zeigten spontane Kontraktionen und sollen in Folgeuntersuchungen einerseits zur kardialen Reparatur und andererseits als myokardiales Testsystem *in vitro* verwendet werden. Ob die Behandlung muriner und schließlich humaner ES-Zellen mit den getesteten Wachstumsfaktoren als Grundlage für eine Herstellung von EHTs im klinischen Maßstab ausreicht, bleibt in weiteren Arbeiten zu klären.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) könnten möglicherweise zur Reparatur von defektem Myokard eingesetzt werden. Um das therapeutische Potential von ES-Zellen auszunutzen, müssen Verfahren zur gezielten myokardialen Differenzierung entwickelt werden. Diese Promotionsarbeit untersuchte, ob *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2), Noggin oder Thrombin einen Kardiogenese-fördernden Effekt in murinen ES-Zellkulturen zeigen.

Methoden: Murine ES-Zellen wurden auf Wachstums-inhibierten murinen Fibroblasten (MEF) und in Anwesenheit von Leukämie-inhibierendem Faktor (LIF) kultiviert, in hängenden Tropfen zu Embryoidkörpern (EBs) aggregiert und in Adhäsionskultur differenziert. Dabei entstehen typischerweise kontrahierende, Kardiomyozyten-haltige Zellareale. Zur Förderung der myokardialen Differenzierung wurden FGF-2, BMP-2, Noggin oder Thrombin eingesetzt. Stimulationszeitpunkt und Konzentration der Stimuli wurden variiert. Die Effektivität der kardialen Differenzierung wurde anhand optischer Auszählung kontrahierender EBs und mittels Echtzeit-PCR-Quantifizierung herzspezifischer α MHC-Transkripte bewertet. Abschließend wurden EHTs (*Engineered Heart Tissue*) aus kardiogen-induzierten ES-Zellen hergestellt.

Ergebnisse: Alle getesteten Faktoren zeigten einen fördernden Effekt auf die kardiale Differenzierung von ES-Zellen. Unter Thrombin zeigte sich allerdings die stärkste Erhöhung der α MHC-Expression (100-fach im Vergleich mit unbehandelten Kontrollen). FGF-2 zeigte eine 10fach höhere α MHC-Expression als die Kontrollgruppe. Das Ausmaß der myokardialen Differenzierung war konzentrations- und zeitpunktabhängig. Besonders auffällig war, dass der Kardiogenese-induzierende Effekt nur bei transienter Stimulation undifferenzierter ES-Zellen maximal war. EHTs konnten in allen Versuchsgruppe hergestellt werden. Dabei fiel auf, dass Noggin-induzierte ES-Zell-EHTs die höchste und BMP-2 behandelte EHTs die niedrigste Kontraktionsfrequenz zeigten. Thrombin und FGF-2 induzierte ES-Zell-EHTs zeigten eine höhere Frequenz als die Kontrollgruppe und erschienen am stabilsten.

Schlussfolgerung: Es besteht die Möglichkeit, mittels Wachstumsfaktoren die kardiale Differenzierung von murinen ES-Zellen zu fördern. Ob eine 100%ige myokardiale Differenzierung zu erreichen ist, bleibt zu klären. Ebenso ist unklar, ob dies tatsächlich anzustreben ist, da sich „ideale“ Herzgewebe aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellspezies zusammen setzen. Folgeuntersuchungen werden die Arbeiten zur myokardialen Induktion von ES-Zellen sowie zur EHT-Herstellung vertiefen.

Abkürzungsverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| Aqua bidest. | Aqua bidestilata |
| BMP | Bone Morphogenetic Protein |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| CEE | chick embryo extract, Hühnerembryonenextrakt |
| d | Tag |
| DAG | Diacylglycerol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DMEM | Dulbecco´s Minimal Essential Medium |
| EB | Embryoid body; Embryoidkörper |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EHT | Engineered Heart Tissue |
| ESC | embryonale Stammzellen |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FGF | Fibroblastenwachstumsfaktor |
| g | Gramm |
| GSK3 | Glykogen Synthase Kinase 3 |
| h | Stunde |
| HB-EGF | heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| hES-Zellen | humane embryonale Stammzellen |
| HS | horse serum, Pferdeserum |
| IP3 | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| Iso | Isoprenalin |
| JNK | C-Jun-N-terminalen Kinase |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| l | Liter |
| LIF | leukemia inhibitory factor |
| M | Mol/Liter |
| MAPKK | mitogen-activated protein kinase kinase |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µmol/l | Mikromol/l |
| µm | Mikrometer |
| MEF | Mouse Embryonic Fibroblasts (murine embryonale Fibroblasten) |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| mES-Zellen | murine embryonale Stammzellen |
| mg | Milligramm |
| α MHC | α Myosin Heavy Chain |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mmol/l | Millimol/l |
| mN | Millinewton (1 mN=100 g cm/s ² =100 Dyn) |
| ms | Millisekunden |
| n | Anzahl |
| p | Wahrscheinlichkeit |
| PBS | Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung |
| PGK | Phosphoglyceratkinase |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration |
| P/S | Penicillin/Streptomycin |
| PLC- γ /PKC | Phospholipase C-gamma/Protein KinaseC |
| ROK | Rho assoziierten Kinase |
| RT | Raumtemperatur |
| sec | Sekunden |
| SEM | Standardfehler |
| TBS | tris buffered saline |
| Tris | twitch tension; Kontraktionskraft |
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| V | Volt |
| v/v | volume/volume |
| w/v | weight/volume |

8. Literatur

Andree B, Duprez D, Vorbusch B, Arnold HH, Brand T (1998) BMP-2 induces ectopic expression of cardiac lineage markers and interferes with somite formation in chicken embryos. *Mech Dev* 70: 119-131.

Andrews PW (1998) Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *Apms* 106: 158-167; discussion 167-158.

Barron M, Gao M, Lough J (2000) Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev Dyn* 218: 383-393.

Bassus S, Herkert O, Kronemann N, Gorlach A, Bremerich D, Kirchmaier CM, Busse R, Schini-Kerth VB (2001) Thrombin causes vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1550-1555.

Beenken A, Mohammadi M (2009) The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 8: 235-253.

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M (2002) Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *Faseb J* 16: 1558-1566.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F et al. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114: 763-776.

Bouche G, Gas N, Prats H, Baldin V, Tauber JP, Teissie J, Amalric F (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0---G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6770-6774.

Braga LM, Rosa K, Rodrigues B, Malfitano C, Camassola M, Chagastelles P, Lacchini S, Fiorino P, De Angelis K, Schaan BD, Irigoyen MC, Nardi NB (2008) Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 113-119.

Literatur

Bruneau BG (2002) Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* 90: 509-519.

Bugler B, Amalric F, Prats H (1991) Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol* 11: 573-577.

Bundesamt S (2005) Amtlich gemeldete Sterbefälle nach den häufigsten Todesursachen. Fortbeschreibung des Bevölkerungsstandes und Todesursachenstatistik.

Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G (1999) Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64: 580-589.

Chassagne C, Wisnewsky C, Schwartz K (1993) Antithetical accumulation of myosin heavy chain but not alpha-actin mRNA isoforms during early stages of pressure-overload-induced rat cardiac hypertrophy. *Circ Res* 72: 857-864.

Choi M, Stottmann RW, Yang YP, Meyers EN, Klingensmith J (2007) The bone morphogenetic protein antagonist noggin regulates mammalian cardiac morphogenesis. *Circ Res* 100: 220-228.

Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green, HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295: 819.

Coughlin, S. R. (1999). "How the protease thrombin talks to cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11023-7.

Corda S, Samuel JL, Rappaport L (2000) Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev* 5: 119-130.

Cucina A, Borrelli V, Lucarelli M, Sterpetti AV, Cavallaro A, Strom R, Santoro-D'Ángelo L, Scarpa S (2002) Autocrine production of basic fibroblast growth factor translated from novel synthesized mRNA mediates thrombin-induced mitogenesis in smooth muscle cells. *Cell Biochem Funct* 20: 39-46.

Literatur

Dang CV (1991) C-myc oncoprotein function. *Biochim Biophys Acta* 1072: 103-113.

Dell'Era P RR, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M. (2003) Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development. *Circ Res* 93: 414-420.

Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA (2003) Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 57: 8-19.

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD (2005) Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115: 572-583.

Doetschman T, Shull M, Kier A, Coffin JD (1993) Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 22: 618-629.

Dono R, Texido G, Dussel R, Ehmke H, Zeller R (1998) Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *Embo J* 17: 4213-4225.

Dreger P, Glass B, Seyfarth B, Humpe A, Claviez A, von Neuhoff N, Suttorp M, Schoch R, Schmitz N (2000) Reduced-intensity allogeneic stem cell transplantation as salvage treatment for patients with indolent lymphoma or CLL after failure of autologous SCT. *Bone Marrow Transplant* 26: 1361-1362.

Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995) A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9: 2795-2807.

Dvorak P, Dvorakova D, Hampl A (2006) Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett* 580: 2869-2874.

Ellis CA, Malik AB, Gilchrist A, Hamm H, Sandoval R, Voyno-Yasenetskaya T, Tiruppathi C (1999) Thrombin induces proteinase-activated receptor-1 gene expression in endothelial cells via activation of Gi-linked Ras/mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 274: 13718-13727.

Epstein JA, Buck CA (2000) Transcriptional regulation of cardiac development: implications for congenital heart disease and DiGeorge syndrome. *Pediatr Res* 48: 717-724.

Literatur

Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wawatsuki T, Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J* 11: 683-694.

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

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

Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8: 95-114.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee LH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 44: 1199-1203.

Hampton TG, Amende I, Fong J, Laubach VE, Li J, Metais C, Simons M (2000) Basic FGF reduces stunning via a NOS2-dependent pathway in coronary-perfused mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H260-268.

Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E (1999) Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274: 27161-27167.

Hung DT, Wong YH, Vu TK, Coughlin SR (1992) The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 267: 20831-20834.

Kanno S, Kim PK, Sallam K, Lei J, Billiar TR, Shears LL (2004) Nitric oxide facilitates cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 12277-12281.

Katoh M (2006) FGF signaling network in the gastrointestinal tract (review). *Int J Oncol* 29: 163-168.

Literatur

Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ (1983) Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 73: 249-261.

Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K (2004) Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J* 68: 691-702.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M et al. (2001) Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108: 407-414.

Khezri S, Valojerdi MR, Sepehri H, Baharvand H (2007) Effect of basic fibroblast growth factor on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells. *Saudi Med J* 28: 181-186.

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

Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994) Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12706-12710.

Kopp JB (2000) BMP receptors in kidney. *Kidney Int* 58: 2237-2238.

Koyanagi M, Haendeler J, Badorff C, Brandes RP, Hoffmann J, Pandur P, Zeiher AM, Kuhl M, Dimmeler S (2005) Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells. *J Biol Chem* 280: 16838-16842.

Kruithof BP vWB, Somi S, Kruithof-de Julio M, Pérez Pomares JM, Weesie F, Wessels A, Moorman AF, van den Hoff MJ (2006) BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* 295: 507-522.

Laflamme MA, Murry CE (2005) Regenerating the heart. *Nat Biotechnol* 23: 845-856.

Literatur

Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, Ornitz DM (2005) Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* 8: 85-95.

Lee KF, Simon H, Chen H, Bates B, Hung MC, Hauser C (1995) Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development. *Nature* 378: 394-398.

Li RK YT, Weisel RD, Mickle DA, Sakai T, Choi A, Jia ZQ (2000) Construction of a bioengineered cardiac graft. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119: 368-375.

Littler CM, Morris KG, Jr., Fagan KA, McMurtry IF, Messing RO (2003) Protein kinase C-epsilon-null mice have decreased hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1321-1331.

Liu Y, Song J, Liu W, Wan Y, Chen X (2003) Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovasc Res* 58: 460-468.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.

Lopez AD, Murray CC (1998) The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 4: 1241-1243.

Lough J, Barron M, Brogley M, Sugi Y, Bolender DL (1996) Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Dev Biol* 178: 198-202.

Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M (1990) Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* 111: 2427-2436.

Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R (2001) Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-282.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 103: 697-705.

Literatur

Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993) Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44: 41-50.

Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6: 597-641.

Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67: 753-791.

McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM (1998) Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev* 12: 1438-1452.

Menasche P, Hagege AA, Desnos M (2005) Myoblast transplantation for heart failure: where are we heading. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 649-654.

Menasche P, Hagege A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M (2001) Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 94: 180-182.

Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol* 151: 81-93.

Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T (1995) Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(2): 467-471.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-642.

Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T (1999) Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* 19: 7096-7105.

Literatur

Moore KL (1996) Embryologie; Lehrbuch und Atlas der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Schattauer Stuttgart.

Murry CE, Field LJ, Menasche P (2005) Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 112: 3174-3183.

Nakamura T, Sano M, Songyang Z, Schneider MD (2003) A Wnt- and beta -catenin-dependent pathway for mammalian cardiac myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5834-5839.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24: 372-376.

Niwa H, Masui S, Chambers I, Smith AG, Miyazaki J (2002) Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 22: 1526-1536.

Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16: 291-299.

Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V et al. (1996) Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2576-2581.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A (2003) Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 7 Suppl 3: 86-88.

Ornitz DM, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: 3005.

Palcy S, Goltzman D (1999) Protein kinase signalling pathways involved in the up-regulation of the rat alpha1(I) collagen gene by transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2 in osteoblastic cells. *Biochem J* 343: 21-27.

Pandur P, Lasche M, Eisenberg LM, Kuhl M (2002) Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418: 636-641.

Literatur

Paquin J, Danalache BA, Jankowski M, McCann SM, Gutkowska J (2002) Oxytocin induces differentiation of P19 embryonic stem cells to cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9550-9555.

Polesskaya A, Seale P, Rudnicki MA (2003) Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113: 841-852.

Pountos I, Jones E, Tzioupis C, McGonagle D, Giannoudis PV (2006) Growing bone and cartilage. The role of mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br* 88: 421-426.

Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM, Bettess MD, Rathjen J (1998) Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev* 10: 31-47.

Reddi AH (1994) Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 4: 737-744.

Rogge C (2007) Entwicklung und Charakterisierung einer neuen in vitro-Herzmuskelmodells aus embryonalen Stammzellen. *Med Dissertation Universität Hamburg*.

Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999) Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165: 190-202.

Rosen V, Thies RS (1992) The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet* 8: 97-102.

Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni C, Beermann F, Pedrazzini T (2005) FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 115: 1724-1733.

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

Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T (2000) Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by Tab1. *Febs Lett* 474: 141-145.

Literatur

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 355: 1210-1221.

Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T (2000) BMP2 is required for early heart development during a distinct time period. *Mech Dev* 91: 259-270.

Schlueter J, Manner J, Brand T (2006) BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol* 295: 546-558.

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

Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB (1997) A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11: 451-462.

Shimizu H, Zhang X, Zhang J, Leontovich A, Fei K (2002) Epithelial morphogenesis in hydra requires de novo expression of extracellular matrix components and matrix metalloproteinases. *Development* 129: 1521-1532.

Skerjanc IS (1999) Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 9: 139-143.

Solloway MJ, Harvey RP (2003) Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 58: 264-277.

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-46.

Stottmann RW, Anderson RM, Klingensmith J (2001) The BMP antagonists Chordin and Noggin have essential but redundant roles in mouse mandibular outgrowth. *Dev Biol* 240: 457-473.

Sugi Y, Sasse J, Lough J (1993) Inhibition of precardiac mesoderm cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotide complementary to fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Dev Biol* 157: 28-37.

Literatur

Taha MF, Valojerdi MR, Mowla SJ (2007) Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cell. *Int J Cardiol* 120: 92-101.

Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS, Gullans SR, Lee RT (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107: 1912-1916.

Takei S, Ichikawa H, Johkura K, Mogi A, No H, Yoshie S, Tomotsune D, Sasaki K (2009) Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic stem cells in serum-based embryoid body development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H1793-1803.

Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 350: 516-518.

Terami H, Hidaka K, Katsumata T, Iio A, Morisaki T (2004) Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 968-975.

Urist MR, Sato K, Brownell AG, Malinin TI, Lietze A, Huo YK, Prolo DJ, Oklund S, Finerman GA, DeLange RJ (1983) Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med* 173: 194-199.

Van Wijk B, Moorman AF, van den Hoff MJ (2007) Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res* 74: 244-255.

Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M (2003) Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res* 92: 623-629.

Vlodavsky I, Miao HQ, Medalion B, Danagher P, Ron D (1996) Involvement of heparan sulfate and related molecules in sequestration and growth promoting activity of fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* 15: 177-186.

Wan M, Cao X (2005) BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 651-657.

Literatur

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

Wobus AM, Hescheler J (1992) Development of an in vitro cardiomyocytes cell model for embryotoxicological and pharmacological studies. *Altex* 9: 29-42.

Wobus AM, Maurer R (1993) Grundung der Arbeitsgruppe "In vitro-Pharmakotoxikologie" im Rahmen der GZG. *Altex* 10: 72.

Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM (1997) Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1525-1539.

Wright JA, Huang A (1996) Growth factors in mechanisms of malignancy: roles for TGF-beta and FGF. *Histol Histopathol* 11: 521-536.

Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG (2004) Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J Am Chem Soc* 126: 1590-1591.

Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK (2002) Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 91: 501-508.

Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, Kiso M, Hasegawa A, Shapiro RE, Schnaar RL (1996) Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 814-818.

Yayon A, Klagsbrun M (1990) Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metastasis Rev* 9: 191-202.

Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K (2005) Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23: 607-611.

Zhang H, Bradley A (1996) Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122: 2977-2986.

Literatur

Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606.

Zimmermann WH, Eschenhagen T (2007) Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. *Trends Cardiovasc Med* 17: 134-140.

Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J, Eschenhagen T (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68: 106-114.

Zimmermann WH, Didie M, Doker S, Melnychenko I, Naito H, Rogge C, Tiburcy M, Eschenhagen T (2006a) Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res* 71: 419-429.

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL, Eschenhagen T (2002a) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90: 223-230.

Zimmermann WH, Didie M, Wasmeier GH, Nixdorff U, Hess A, Melnychenko I, Boy O, Neuhuber WL, Weyand M, Eschenhagen T (2002b) Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106: 151-157.

Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G, Didie M, Naito H, Nixdorff U, Hess A, Budinsky L, Brune K, Michaelis B, Dhein S, Schwoerer A, Ehmke H, Eschenhagen T (2006b) Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 12: 452-458.

Danksagung

9. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Anleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann für das Überlassen meines Promotionsthemas und für die geduldige Betreuung meiner experimentellen Arbeit und auch der schriftlichen Anfertigung dieser Arbeit

Mein besonderer Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die kollegiale Zusammenarbeit. Besonders danke ich Dr. Christina Rogge, Stephan Döker, Dr. Olaf Friese, Dr. Michael Didié, Daniel Biermann, Peter Christalla, Niklas Schofer und Monika Nose für ihre freundschaftliche und fachliche Unterstützung.

Vor allem möchte ich Herrn Till Orla Klatte danken, der mir während der nicht immer ganz einfachen Zeit der Dissertation und darüber hinaus liebevoll, aufmunternd und mit fachlichen Ratschlägen zur Seite gestanden hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester, die mich zu jeder Zeit mit alle Kräften sowohl emotional als auch finanziell unterstützt haben und denen ich dafür unendlich dankbar bin.

Lebenslauf

10. Lebenslauf

Hanna Marie Behr

Geburtsdatum: 12.08.1983

Geburtsort: Berlin

Schulische Ausbildung

| | |
|------------|---|
| 1988- 1993 | Grundschule am Rüdeshheimer Platz |
| 1999- 2000 | Highschool Jahr in Boston, Massachusetts (USA) |
| 1993- 2002 | Evangelisches Gymnasium zum Grauen Kloster (Abitur) |

Studium

| | |
|---------|---|
| 10/2002 | Medizinstudiums, Universität Leipzig |
| 08/2004 | Ärztliche Vorprüfung, Universität Leipzig |
| 10/2004 | Medizinstudium, Universität Hamburg |
| 12/2008 | 2.Staatsexamen, Universität Hamburg |

Beruf

| | |
|------------|---|
| 01.04.2009 | Assistenzärztin Albertinen Krankenhaus, Hamburg Fachabteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Dr. von Leffern |
|------------|---|

Erklärung

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss von BMP-2, Noggin, FGF-2 und Thrombin auf die myokardiale Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen und der Anleitung von Prof. Dr. med. Wolfram-Hubertus Zimmermann ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, den

Hanna Marie Behr

12. Anhang

12.1. Morphologische Analysen (siehe 3.2.1., Abb. 13)

Mikroskopisch ausgezählte Anzahl schlagender EBs nach 8 und 12 Tagen Adhäsionskultur unter Zugabe von FGF-2, BMP-2 oder Noggin zu den in Abb. 12 definierten Zeitpunkten, im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe (Ktr). Es wurden jeweils 50 EBs pro Kulturschale ausgewertet. Die Anzahl der Kulturschalen ist als „n“ angegeben. Statistischen Signifikanzen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni Test errechnet. ★ p <0,05 vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni post hoc Test)

Werte nach 8 Tagen Adhäsionskultur

FGF-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| N (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 43 | 84 | 76 | 41 | 53 | 55 | 58 | 52 |
| SEM | 3,5 | 2,1 | 3,0 | 4,2 | 3,2 | 3,1 | 3,2 | 4,0 |
| p < 0,05 | | ★ | ★ | | ★ | ★ | ★ | ★ |

BMP-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| N (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 46 | 70 | 69 | 42 | 35 | 54 | 40 | 35 |
| SEM | 1,9 | 0,7 | 1,6 | 1,7 | 1,4 | 1,5 | 2,0 | 1,7 |
| p < 0,05 | | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ | ★ |

Anhang

Noggin

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 48 | 74 | 68 | 41 | 55 | 47 | 52 | 41 |
| SEM | 2,6 | 2,3 | 2,9 | 1,1 | 1,5 | 2,4 | 2,0 | 0,8 |
| p< 0,05 | | ★ | ★ | ★ | ★ | | | ★ |

Werte nach 12 Tagen Adhäsionskultur

FGF-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 57 | 93 | 84 | 51 | 63 | 65 | 72 | 64 |
| SEM | 4,4 | 1,1 | 1,7 | 1,6 | 1,8 | 3,0 | 3,6 | 3,1 |
| p< 0,05 | | ★ | ★ | | | ★ | ★ | ★ |

Anhang

BMP-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 54 | 76 | 71 | 57 | 53 | 56 | 51 | 48 |
| SEM | 1,2 | 1,2 | 2,2 | 1,7 | 1,4 | 2,4 | 1,9 | 1,1 |
| p< 0,05 | | ★ | ★ | | | | | ★ |

Noggin

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) | 4 (200) |
| Mittelwert | 54 | 93 | 84 | 52 | 67 | 62 | 73 | 58 |
| SEM | 1,9 | 1,3 | 1,3 | 5,4 | 1,9 | 2,3 | 1,8 | 4,8 |
| p< 0,05 | | ★ | ★ | | ★ | ★ | ★ | |

12.2. Analysen mittels quantitativer RT-PCR (siehe 3.2.2., Abb. 14)**12.2.1. α MHC**

Darstellung des Unterschieds der α MHC-Transkriptmenge in den Versuchsgruppen (siehe Abb. 13) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktr); Auswertung von 9-16 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs. ★ $p < 0,05$ vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test)

FGF-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 16 (800) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (200) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) |
| Mittelwert | 1 | 10 | 7 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| SEM | 0,2 | 1,6 | 2,0 | 0,2 | 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| $p < 0,05$ | | ★ | ★ | | | ★ | ★ | ★ |

BMP-2

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 16(800) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) |
| Mittelwert | 1 | 10 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| SEM | 0,3 | 3,4 | 0,4 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| $p < 0,05$ | | ★ | ★ | | | | | ★ |

Noggin

| Zeitpunkte | Ktr | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| N (EBs) | 16(800) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) | 9 (450) |
| Mittelwert | 1 | 8 | 5 | 1 | 1 | 3 | 0 | 5 |
| SEM | 0,3 | 2,1 | 1,5 | 0,2 | 1,2 | 1,2 | 1,4 | 2,5 |
| P< 0,05 | | ★ | ★ | | | ★ | ★ | |

12.3. Identifikation einer kardio-induktiven Kulturphase (siehe 3.2.3., Abb.15)**12.3.1. α MHC**

Darstellung des Unterschieds der α MHC-Transkriptmenge in den unterschiedlich behandelten Versuchsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Ktr.). Es wurden in jeder Gruppe 6-9 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. ★ $p < 0,05$ vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test)

| Wachstumsfaktoren | Ktr | FGF-2 | BMP-2 | Noggin |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 9 (450) | 6 (300) | 6 (300) | 6 (300) |
| Mittelwert | 1 | 12 | 11 | 2 |
| SEM | 0,2 | 6,1 | 9,0 | 0,2 |

12.4. Effekte in Abhängigkeit der FGF-2-, BMP-2- und Noggin-Konzentration (siehe 3.3., Abb.17)

12.4.1. α MHC

Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur in Abhängigkeit von der Wachstumsfaktorkonzentration. Es wurden 9-11 (FGF-2) bzw. 5-9 (BMP-2 und Noggin) Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. ★ <0,05 vs. Ktr (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

FGF-2

| ng/ml | Ktr | 0.3 | 1 | 3 | 10 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 9 (450) | 11(550) | 11(550) | 11(550) | 11(550) |
| Mittelwert | 1 | 2 | 9 | 12 | 6 |
| SEM | 0,2 | 0,5 | 2,8 | 4,5 | 2,1 |
| p<0,05 | | | | ★ | |

BMP-2

| ng/ml | Ktr | 0.01 | 0.3 | 1 | 3 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 9 (450) | 6 (300) | 5 (250) | 6 (300) | 6 (300) |
| Mittelwert | 1 | 3 | 4 | 4 | 3 |
| SEM | 0,2 | 1,0 | 0,9 | 0,7 | 1,7 |
| p<0,05 | | | | | |

Noggin

| ng/ml | Ktr | 50 | 150 | 500 | 1500 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 9 (450) | 6 (300) | 6 (300) | 6 (300) | 6 (300) |
| Mittelwert | 1 | 2 | 9 | 3 | 3 |
| SEM | 0,2 | 0,3 | 1,8 | 1,1 | 1,0 |
| p<0,05 | | | ★ | | |

12.5. Thrombin als kardiogener Faktor (siehe 3.4., Abb. 18)

Darstellung des prozentualen Anteils kontrahierender EBs nach 4 Tagen Vorkultur, 2 Tagen „Hängendem Tropfen“ und 12 Tagen Adhäsionskultur. Die Stimulation mit den angegebenen Faktoren wurde während der Vorkulturphase durchgeführt: Thrombin (0,6 U/l), FGF-2 (1 ng/ml), BMP-2 (0,3 ng/ml) und Noggin (150 ng/ml). Es wurden pro Versuchsgruppe 8 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. ★ p<0,05 vs. Ktr.; § p<0,05 vs. Thrombin (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

| ng/ml | Ktr | Thromb. | FGF-2 | BMP-2 | Noggin |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 8 (400) | 8 (400) | 8 (400) | 8 (400) | 8 (400) |
| Mittelwert | 58 | 98 | 92 | 78 | 92 |
| SEM | 1,6 | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 1,1 |
| p<0,05 | § | ★ | ★ § | ★ § | ★ § |

12.6. Thrombin als kardiogener Faktor (siehe 3.4., Abb. 19)

12.6.1.

Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur ohne und mit Thrombinstimulation (0,6 U/l) in der Vorkulturphase. Es wurden 5 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet. ★ $p < 0,05$ vs. Ktr. (zweiseitiger ungepaarter t-Test).

| ng/ml | Ktr | Thrombin |
|------------|---------|----------|
| n (EBs) | 5 (300) | 5 (300) |
| Mittelwert | 2 | 160 |
| SEM | 1,1 | 2 |
| t- Test | | ★ |

12.7. Thrombin als kardiogener Faktor (siehe 3.4., Abb. 20)

12.7.1. α MHC

Darstellung der α MHC-Transkriptmenge in EB-Kultur ohne und mit Thrombinstimulation in der Vorkulturphase. Es wurden 11 Kulturschalen mit jeweils 50 EBs ausgewertet.

★ $p < 0,05$ vs. Ktr. (ANOVA mit Bonferroni *post hoc* Test).

| U/ml | Ktr | 0,00015 | 0,0005 | 0,0015 | 0,005 |
|------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| n (EBs) | 11(550) | 11(550) | 11(550) | 11(550) | 11(550) |
| Mittelwert | 2 | 58 | 127 | 40 | 9 |
| SEM | 0,6 | 24,4 | 36,7 | 15,9 | 4,0 |
| $p < 0,05$ | | | ★ | | |