

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik C

Kardiologie und Angiologie

- Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger -

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
Beeinflussung von Differenzierung und
Proliferation kardiovaskulärer Zellen durch den
Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor
(G-CSF)**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Paprottka, Felix Julian

aus Dortmund

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Sigrid Nikol

2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Steffen Koschmieder

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik und Poliklinik C

Kardiologie und Angiologie

- Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Waltenberger -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Sigrid Nikol

Koreferent: Priv. Doz. Dr. med. Steffen Koschmieder

ZUSAMMENFASSUNG

Molekularbiologische Untersuchungen zur Beeinflussung von Differenzierung und Proliferation kardiovaskulärer Zellen durch den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF)

Paprottka, Felix Julian

Wissenschaftliche Vorarbeiten zeigten, dass nach einem Myokardinfarkt die G-CSF und G-CSF Rezeptor Expression in der Infarkttrandzone deutlich ansteigt. Der G-CSF Rezeptor wird dabei vermutlich auch auf regenerationsvermittelnden (Stamm-)Zellen exprimiert, so dass aktuell postuliert wird, dass G-CSF eine Rolle bei der Myokardregeneration spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob G-CSF die Differenzierung von unreifen Zellen in Richtung kardiovaskulärer Zelltypen und / oder deren Proliferation beeinflusst. Dazu wurden embryonale Stammzellen und daraus abgeleitete „embryoid bodies“ als in-vitro Modelle verwendet, da in letzteren vielfach kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse nachgewiesen wurden. Von daher ist dieses Zellsystem ein anerkanntes in-vitro System für die Analyse solcher Vorgänge. Die durchgeführten Genexpressionsanalysen bei embryonalen Stammzellen zeigten, dass G-CSF, unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen, offenbar weder kardiale noch vaskuläre Differenzierungsprozesse steigerte. Weiterhin wurden Versuche mit neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt, um auch Zellen eines weitergehenden Differenzierungsgrades einzuschließen. Bei den mit G-CSF behandelten neonatalen Kardiomyozyten konnte sowohl auf Protein- als auf mRNA-Ebene eine signifikant verringerte Expression des Connexin43-Proteins nach G-CSF Applikation beobachtet werden. Außerdem wurde eine gesteigerte Expression des PCNA-Proteins detektiert. Beide Befunde sprechen für eine Stimulation der Proliferation der Zellen durch G-CSF.

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Molekularbiologische Untersuchungen zur Beeinflussung von Differenzierung und Proliferation kardiovaskulärer Zellen durch den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF)

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Medizinische Klinik und Poliklinik C für Kardiologie und Angiologie des Universitätsklinikums Münster der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

unter Anleitung von:

Frau Prof. Dr. med. S. Nikol

-
1. selbstständig angefertigt,
 2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
 3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
 4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 01.04.2011

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	_____	
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	_____	
<i>Tabellenverzeichnis</i>	_____	
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	_____	
1. Einleitung	_____	1
1.1 Myokardinfarkt	_____	1
1.2 Spontane kardiale Regeneration	_____	2
1.3 Rolle von Granulozyten-Kolonien stimulierendem Faktor (G-CSF) im kardiovaskulären System	_____	3
1.3.1 Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (G-CSF)	_____	3
1.3.2 G-CSF Rezeptor (G-CSF-R)	_____	9
1.3.3 G-CSF vermittelte Signaltransduktion	_____	10
1.4 Pluripotente embryonale Stammzellen: ein in-vitro Modellsystem für die Charakterisierung kardiovaskulärer Differenzierungsprozesse	_____	13
1.5 Ein Ausblick - mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten für kardiovaskuläre Zellen	_____	14
1.6 Zielsetzung	_____	15
2. Material	_____	17
2.1 Anorganische Materialien	_____	17
2.1.1 Chemikalien	_____	17
2.2 Organische Materialien	_____	18
2.2.1 Zytokine	_____	18
Hersteller	_____	18
2.2.3 Aminosäuren	_____	18
2.3 Biologische Materialien	_____	19
2.3.1 Enzyme	_____	19
2.4 Nährmedien und Antibiotika	_____	19
2.4.1 Nährmedien	_____	19
2.4.1.1 Seren	_____	19
2.4.1.2 Medien	_____	20
2.4.1.3 Kulturmedien	_____	20
2.4.2 Antibiotika	_____	22
2.5 Lösungen und Puffer	_____	22
2.5.1 Gekaufte Lösungen und Puffer	_____	22
2.5.2 Angesetzte Lösungen und Puffer	_____	23
2.6 Kits und Reagenzsysteme	_____	25
2.6.1 RNA-Extraktion	_____	25
2.6.2 Reverse Transkription	_____	25
2.6.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	_____	25

Inhaltsverzeichnis

2.6.4 „Real-time“qRT-PCR	25
2.6.5 Agarosegelelektrophorese	25
2.6.6 Proteinextraktion	25
2.6.7 Western Blot Analysen	25
2.7 Generierung der PCR-„primer“	26
2.8 Antikörper	28
2.8.1 Primäre Antikörper	28
2.8.2 Sekundäre Antikörper	28
2.9 DNA- und Protein-Marker	28
2.9.1 DNA-Marker	28
2.9.2 Protein-Marker	29
2.10 Versuchstiere und Zelllinien	29
2.10.1 Versuchstiere	29
2.10.2 Zelllinien	29
2.10.2.1 Murine embryonale Stammzellen	29
2.10.2.2 Neonatale Kardiomyozyten	29
2.10.3 Versuchstierhaltung	30
2.11 Geräte	30
3. Methoden	32
3.1 Molekularbiologische Methoden	32
3.1.1 Genexpressionsanalysen	32
3.1.2 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung	32
3.1.3 Agarosegelelektrophorese	32
3.1.3.1 Auftrennung von DNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese	33
3.1.3.2 RNA-Gelelektrophorese	34
3.1.3.3 Automatisierte Gelelektrophorese-Systeme	35
3.1.4 Reverse Transkription	35
3.1.5 „Polymerase chain reaction“ (PCR)	36
3.1.5.1 Konventionelle PCR	37
3.1.5.2 „Real-time“qRT-PCR	38
3.1.5.2.1 Quantitative „real-time“qRT-PCR	38
3.1.5.2.2 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff – SYBR® Green	39
3.1.5.2.3 Relative Quantifizierung	40
3.1.5.2.4 CT -Wert	41
3.1.5.2.5 Berechnung nach der $\Delta\Delta CT$ -Methode	42
3.1.5.2.6 Pipettierschema	43
3.1.5.2.7 „Real-time“qRT-PCR Ablauf	44
3.2 Proteinbiochemische Methoden	44
3.2.1 Proteinextraktion aus kultivierten Zellen	44
3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	44
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.4 Western-Blot	45
3.3 Zellbiologische Methoden	46
3.3.1 Eukaryontische Zellen	46
3.3.2 Kryokonservierung und erneute Kultivierung der Zellen	46
3.3.3 Zellpassage	47
3.3.4 Zellzahlbestimmung	47
3.3.5 Kultivierung von murinen E14 Zellen	48
3.3.6 Generierung der „embryoid bodies“ aus E14-Zellen	48
3.3.6.1 Herstellung der „hanging drops“	48

Inhaltsverzeichnis

3.3.6.2 Ernten der „embryoid bodies“	49
3.3.7 Isolation der neonatalen Kardiomyozyten aus Mäuseherzen	49
3.3.8 Isolation der neonatalen Kardiomyozyten aus Rattenherzen	50
3.4 Statistik	51
4. Ergebnisse	52
4.1 Nachweis der G-CSF-Rezeptor und G-CSF mRNAs in murinen embryonalen Stammzellen	52
4.2 Molekulare Charakterisierung von G-CSF Effekten auf kardiovaskuläre Differenzierung in murinen embryonalen Stammzellen	56
4.3 G-CSF-Effekte auf neonatale Kardiomyozyten	58
4.3.1 Molekularbiologische Analysen von G-CSF Effekten auf neonatale Mauskardiomyozyten	58
4.3.2 Proteinbiochemische Analysen von G-CSF Effekten auf neonatale Rattenkardiomyozyten	66
5. Diskussion	69
5.1 G-CSF-Rezeptor und G-CSF Expression in embryonalen Stammzellen und daraus abgeleiteten „embryoid bodies“	69
5.2 Keine durch G-CSF induzierten differenzierungsfördernden Effekte auf „embryoid bodies“ nachweisbar	70
5.3 G-CSF-Effekte auf neonatale Kardiomyozyten	72
6. Zusammenfassung	77
7. Literaturverzeichnis	79
Curriculum vitae	87
Danksagungen	89
8. Anhang	I
8.1 Marker	I
8.1.1 DNA-Marker	I
8.1.2 Protein-Marker	II
8.2 Genehmigungen der tierexperimentellen Arbeit	III

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Modell-Darstellung des G-CSF Hetero-Trimers</i>	5
<i>Abb. 2: Schematische Darstellung der durch G-CSF aktivierten Signalkaskaden</i>	12
<i>Abb. 3: Aufbau einer klassischen PCR</i>	38
<i>Abb. 4: Schmelzkurvenanalyse bei einer „real-time“qRT-PCR</i>	40
<i>Abb. 5: Amplifikationskurve einer „real-time“qRT-PCR</i>	42
<i>Abb. 6: G-CSF-R-mRNA-Expression in Rosa, HM1, C3H und E14 embryonalen Stammzellen</i>	53
<i>Abb. 7: Aus E14 ES-Zellen gebildete „embryoid bodies“ („EBs“)</i>	55
<i>Abb. 8: G-CSF-R, G-CSF und beta-Aktin Expression in „embryoid bodies“</i>	56
<i>Abb. 9: CD34-Genexpression in „EBs“ über einen Zeitraum von 20 Tagen</i>	58
<i>Abb. 10: G-CSF-Rezeptor mRNA Nachweis in murinen neonatalen Kardiomyozyten</i>	59
<i>Abb. 11: Vergleichende Quantifizierung der ANP, BNP und C/EBP-alpha mRNAs</i>	62
<i>Abb. 12: Vergleichende Quantifizierung der Connexin43, MEF2c und MesP1 mRNAs</i>	63
<i>Abb. 13: Vergleichende Quantifizierung der Mlc2v, MHC alpha und MHC beta mRNAs</i>	64
<i>Abb. 14: Vergleichende Quantifizierung der Nestin, Nkx 2.5 und YY1 mRNAs</i>	65
<i>Abb. 15: Westernblot Nachweis von phosphoryliertem Cx43 und nicht-phosphoryliertem Cx43</i>	67
<i>Abb. 16: Westernblot Nachweis von PCNA</i>	68
<i>Abb. 17: peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter I, PaqLab</i>	I
<i>Abb. 18: MassRuler DNA Ladder, Low Range, Fermentas GmbH</i>	II
<i>Abb. 19: Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad Laboratories</i>	II

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1: Chemikalienliste</i>	17
<i>Tab. 2: Zytokine</i>	18
<i>Tab. 3: Aminosäuren</i>	18
<i>Tab. 4: Enzyme</i>	19
<i>Tab. 5: Seren</i>	19
<i>Tab. 6: Medien</i>	20
<i>Tab. 7: Antibiotika</i>	22
<i>Tab. 8: Fertige Lösungen und Puffer</i>	22
<i>Tab. 9: Übersicht über die verwendeten „primer“ (bp=Basenpaare)</i>	26
<i>Tab. 10: Zusammenstellung der verwendeten primären Antikörper</i>	28
<i>Tab. 11: Zusammenstellung der verwendeten sekundären Antikörper</i>	28
<i>Tab. 12: DNA-Marker</i>	28
<i>Tab. 13: Protein-Marker</i>	29
<i>Tab. 14: Embryonale Stammzellen aus Mus musculus</i>	29
<i>Tab. 15: Geräteliste</i>	30
<i>Tab. 16: Pipettierschema</i>	43
<i>Tab. 17: Behandlung der neonatalen Kardiomyozyten für 24 h mit verschiedenen Medien</i>	60

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ø	Durchmesser
A.bidest	Aqua bidest
AG	Arbeitsgruppe
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
„beating areas“	schlagende Areale
BNP	„Brain-type natriuretic peptide“
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
c-Cbl	„Casitas B-lineage Lymphoma“
CD	„cluster of differentiation“
cDNA	copyDNA
C/EBP-alpha	„CCAAT-enhancer-binding protein alpha“
cm	Zentimeter
CNTF	„ciliary neurotrophic factor“
CRH	Zytokin-Rezeptor-homologes-Modul
CSF	koloniestimulierende Faktoren
Cx43	Connexin43
d	Tag
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E	Extinktion
„EBs“	„embryoid bodies“
„EB“	„embryoid body“
EC	„Enzyme Commission“
EGFP	„enhanced green fluorescent protein“
engl.	englisch
ENOS	endotheliale NO Synthase
ESC	embryonale Stammzellen (Englisch für „embryonic stem cells“)
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
ERK	„extracellular signal-related kinase“
ET1	Endothelin 1
FACS	Durchflusszytometrie (Englisch für Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	„Fibroblast Growth Factor“
FN III	Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domäne
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (engl.: „granulocyte-colony stimulating factor“)
G-CSF-R	G-CSF-Rezeptor
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure

Abkürzungsverzeichnis

HRP	Meerrettich-Peroxidase
IMDM	Iscove' s Modified Dulbecco' s Medium
Ig	Immunglobulin-ähnliche Domäne
„iPSCs“	„induced pluripotent stem cells“
Jak	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
kDa	Kilodalton
KO	„knock out“
LIF	Leukämie-Inhibierender-Faktor (engl.: „leukemia inhibitory factor“)
M	Molmasse
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MEF2c	„Myocyte-specific enhancer factor 2C“
MEM	Minimal-essentielle Aminosäuren
MesP1	„mesoderm posterior 1“
MHC	„Myosin-Heavy-Chain“
Mlc2v	„myosin light chain 2V“
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
mA	Milliampere
ml	Milliliter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
min.	Minute
mind.	Mindestens
M-MLV	„moloney murine leukemia virus“
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	messengerRNA
n	Anzahl der durchgeführten Versuche
neg.	Negativ
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NEA	Nicht-essentielle Aminosäuren
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzwert
PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCNA	„proliferating cell nuclear antigen“
PCR	„polymerase chain reaction“
pos.	positiv
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxyl-X-Rhodamine
RQ	Regulationsquotient
rpm	Runden pro Minute (engl.: „rounds per minute“)
RT	Reverse Transkription
sek.	Sekunde
SCID	„Severe Combined Immunodeficiency“
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHIP	SH2-containing inositol phosphatase
SOCS3	„suppressor of cytokine signaling-3“
STATs	„signal transducers and activators of transcription“
Tab.	Tabelle
TBE	Tris / Borsäure / EDTA
TNF- α	Tumor Nekrose Factor alpha
U	Unit
UV	Ultraviolett

Abkürzungsverzeichnis

V	Volt
VEGF	„vascular endothelial growth factor“
WB	Western Blot
x	mal
YY1	Yin Yang 1

1. Einleitung

1.1 Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt ist eine akute Erkrankung des Herzens mit einem lebensbedrohlichen oder sogar tödlichen Krankheitsverlauf und zählt zu den Haupttodesursachen in den Industrienationen (85). Dabei verursachen der Myokardinfarkt und die sich anschließenden Therapieversuche jedes Jahr erhebliche Kosten im Gesundheitswesen. In den Vereinigten Staaten von Amerika erleiden ca. 1 Millionen Menschen pro Jahr einen Myokardinfarkt mit einer anschließenden 25%-Mortalitätsrate binnen der nachfolgenden 3 Jahre (13). In Deutschland liegt die Inzidenz im Jahr bei 300 Myokardinfarkten pro 100.000 Menschen (36).

Ein Myokardinfarkt entsteht durch eine akute Koronarthrombose, welche sich auf dem Boden einer atherosklerotischen Gefäßerkrankung entwickelt hat. Dieser thrombotische Verschluss der Koronararterien hat eine Minderperfusion der Herzmuskulatur zur Folge. Klinische Zeichen des akuten Myokardinfarktes sind lang anhaltende Angina pectoris Beschwerden, welche in Ruhe und durch die Gabe von Nitroglyzerin kaum beeinflussbar sind (36). Dabei kommt es drei Stunden nach dem Myokardinfarkt im Blut zu einem laborchemischen Anstieg von Troponin I und T (36). Das Maximum des Troponinanstiegs ist 20 Stunden post infarctum erreicht und eine Normalisierung stellt sich erst wieder nach 1-2 Wochen ein (36). Des Weiteren können die Kreatinkinase, die Laktatdehydrogenase und weitere Laborparameter im Blut erhöht sein (36). Neben den laborchemischen Untersuchungen ist das Elektrokardiogramm (EKG) ein äußerst wichtiges Diagnosemittel zur Feststellung eines Herzinfarktes (36). Dabei verändern sich je nach Größe und Lokalisation des ischämischen Areals die elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens, so dass man durch das Ableiten der Herzströme Rückschlüsse auf die Schwere des Infarktes ziehen kann (36).

Obwohl die medizinische Forschung zu einer stetigen Verbesserung der pharmakologischen und chirurgischen Therapien geführt hat, werden mit den bestehenden Verfahren die Folgen des Myokardinfarktes, z. B. ein fortbestehender negativer inotroper Effekt, nur teilweise behoben. Der ischämiebedingte abgestorbene

Teil des Herzens wird dabei nicht erneuert, so dass Narbengewebe zurückbleibt (18, 74). In den letzten Jahren sind Regenerationsvorgänge in der Infarkttrandzone nachgewiesen worden, die vermutlich auf kardiale Stammzellen zurückzuführen sind (55). Diese Entdeckungen bieten somit Hoffnung für neue Therapieansätze.

1.2 Spontane kardiale Regeneration

Während der vergangenen Jahre konnte gezeigt werden, dass das Herz über ein bestimmtes Reservoir an kardialen Progenitor- und Stammzellen verfügt (6). Dabei sind diese Zellen positiv für zahlreiche Progenitor- und Stammzellmarker wie z.B. c-kit, Sca-1, Isl-1, ABCG2 und können durch diese identifiziert werden (6, 26, 59). Post infarctum kann ein Anstieg der genannten Marker molekularbiologisch festgestellt werden, so dass postuliert wird, dass diese Progenitor- und Stammzellen eine bedeutende Aufgabe bei Regenerationsvorgängen in der Infarkttrandzone spielen (6).

Zahlreiche Veröffentlichungen aus neuester Zeit beschäftigen sich mit der wichtigen Bedeutung jener residenten kardialen Stammzellen für den Alterungsprozess des Herzens und die postinfarktöse Regenerationsphase (2, 6, 59). Anversa et al. (2005) vermuten, dass der Alterungsprozess des Herzens auf einer Schädigung der residenten kardialen Stammzellen beruht (2). Demnach sind diese Stammzellen wichtig für die ablaufende kardiale Regeneration (2).

Die im Jahre 2008 veröffentlichten Ergebnisse von Scobioala et al. (88) sprechen dafür, dass eine spontane Regeneration des infarzierten Herzgewebes erfolgt. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der Differenzierung von residenten kardialen Stammzellen und eher nicht auf aus dem Knochenmark eingewanderte Zellen (88). Für die Versuche wurden Zellen aus dem Knochenmark von „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) transgenen Mäusen in das Infarktareal von genetisch unmodifizierten Mäusen injiziert (88). Eine deutliche Hochregulation von Nestin in der Infarkttrandzone konnte dabei nur in weniger als 1% der EGFP positiven Zellen beobachtet werden, obwohl nach der Injektion reichlich EGFP positive Knochenmarkszellen im Infarktareal vorhanden waren (88). Daraufhin wurde der Schluss gezogen, dass die spontan ablaufenden Regenerationsprozesse im Infarktareal von residenten kardialen

Stammzellen ausgehen müssen (88). Diese residenten kardialen Stammzellen entwickeln sich weiter zu Progenitorzellen, die sich wiederum in verschiedene Arten kardialer Zellen differenzieren und somit eine strukturelle Reparatur des Herzgewebes einleiten (88).

Barile et al. (6) konnten im Jahre 2007 Ergebnisse publizieren, die belegen, dass die Transplantation von aus Herzbiopsien stammenden autolog gewonnenen kardialen Stammzellen in murines Postinfarkt-Herz von „Severe Combined Immunodeficiency“ (SCID) Mäusen zu einer Integration dieser Zellen in das Infarktareal führte. Zudem konnte anschließend eine Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion beobachtet werden (6).

Die Zelldifferenzierungsprozesse der kardialen Stammzellen werden dabei durch zahlreiche Zytokine / Faktoren reguliert. Das Erforschen jener Faktoren befindet sich aktuell noch in einem Anfangsstadium und könnte in Zukunft zu neuen Therapieoptionen führen. Einer dieser Faktoren könnte der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) sein, zumal Kuhlmann et al. bereits zeigen konnten, dass der G-CSF Rezeptor auf zahlreichen regenerationsrelevanten Zellen exprimiert wird (55).

1.3 Rolle von Granulozyten-Kolonien stimulierendem Faktor (G-CSF) im kardiovaskulären System

1.3.1 Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor (G-CSF)

Zytokine sind Glykoproteine, die regulierend auf die Differenzierung und das Wachstum von Zellen wirken (39, 53). Es werden fünf Hauptgruppen von Zytokinen unterschieden: koloniestimulierende Faktoren (CSF), Interferone, Interleukine, Tumornekrosefaktoren und Chemokine (39, 53). Im menschlichen Körper werden die koloniestimulierenden Faktoren von den verschiedensten Organen, wie zum Beispiel Knochenmark, Leber, Niere und Muskeln durch die sich unter anderem darin befindlichen T-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen, produziert (39, 51). Die Kolonie-stimulierenden Faktoren werden in Granulozyten-Kolonie stimulierenden

Faktor (G-CSF), in Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF) und in Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) unterteilt (39).

Für diese Arbeit ist das G-CSF (s. **Abb.1**) von besonderem Interesse. Das humane G-CSF besteht aus 178 Aminosäuren, die in vier Helices gefaltet sind, und besitzt ein Molekülmasse von 19,6 kDa (38). Im menschlichen Körper produzieren hauptsächlich Makrophagen G-CSF, welches neutrophile Granulozyten zur Proliferation von Immunzellen anregt und die Differenzierung von Vorläuferzellen in Richtung neutrophile Granulozyten steigert (38). Des Weiteren fördert das Zytokin das Überleben und die funktionelle Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (50, 51). Neutrophile Granulozyten sind Zellen, welche als Teil der unspezifischen Immunabwehr vor allem Bakterien und Pilze bekämpfen (39).

Wegen der Fähigkeit von G-CSF hämatopoetische Stammzellen, insbesondere Stamm- und Progenitorzellen, zur Proliferation anzuregen und sie aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf zu mobilisieren (89), wird G-CSF z. B. in der Onkologie zur Förderung der Hämatopoese nach erfolgter Chemotherapie angewendet (47, 82).

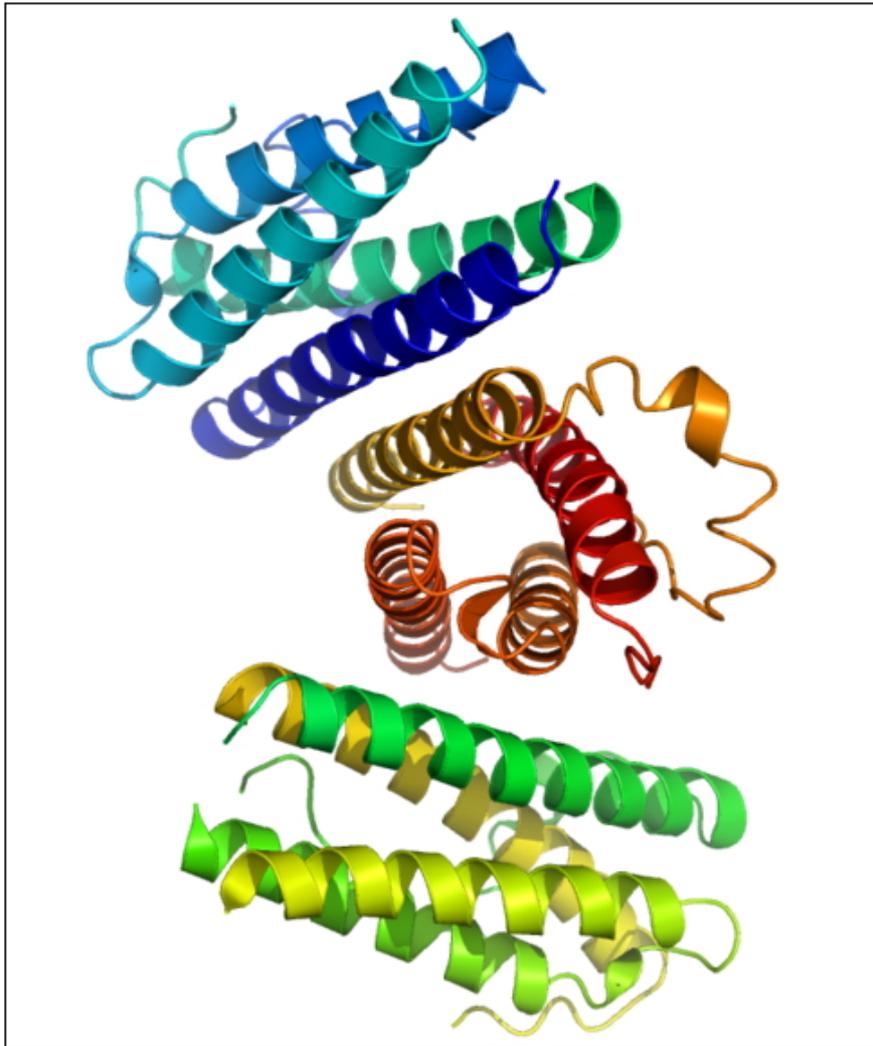


Abb. 1: Modell-Darstellung des G-CSF Hetero-Trimers

Das Monomer des humanen Glykoproteins G-CSF besteht aus insgesamt vier Helices (38). Die Abb. wurde von folgender Internetseite entnommen:

http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:GCSF_Crystal_Structure.rsh.png&filetimestamp=20070310164346 ; 01.04.2011

Wegen der zuvor beschriebenen Wirkung von G-CSF auf hämatopoetische Zellen, ist es auch für die kardiovaskuläre Forschung von großem Interesse. Der Einsatz im Bereich der kardiovaskulären Regeneration wäre denkbar, zumal positive kardiovaskuläre Effekte bereits in verschiedenen präklinischen Studien nachgewiesen wurden (23, 55, 79). Dabei könnten durch post infarctum G-CSF Applikationen regenerative Effekte am geschädigten Myokard erzielt werden.

In einer im Jahre 2001 von Orlic et al. publizierten Arbeit wird beschrieben, dass im Knochenmark lokalisierte Stammzellen über den Blutkreislauf in die ischämischen Bereiche des Herzens einwandern und sich dort zu Kardiomyozyten transdifferenzieren (79). Die Autoren behaupten, dass eine strukturelle Reparatur und funktionelle Erholung der ischämischen Zellsubstanz somit möglich sei (79).

Anschließende Arbeiten konnten aber weder die zuvor erwähnten Ergebnisse der nach G-CSF Applikation erfolgten kardialen Regeneration post infarctum (52, 55) noch die Resultate nach direkter Zelltransplantation in murine Infarkt Herzen zur Verbesserung der Herzfunktion (5, 73, 77) reproduzieren.

Deindl et al. zeigten im Jahre 2006, dass eine G-CSF Behandlung nach erfolgtem Myokardinfarkt das Langzeitüberleben von Mäusen verlängerte und die Herzfunktion durch eine gesteigerte Ateriogenese verbessert werden konnte (23). Außerdem demonstrierten Kuhlmann et al. (2006), dass eine G-CSF Applikation nach einem induzierten Myokardinfarkt die Auswurfleistung von Mäuseherzen erhöhte, indem die Ejektionsfraktion 3 Tage vor und 3 Tage nach G-CSF Applikation gemessen wurde (55). Zudem konnte im Randzoneninfarktbereich eine deutlich gesteigerte G-CSF-R Expression bei Kardiomyozyten und damit zusammenhängend eine Steigerung der endogenen G-CSF Expression festgestellt werden (55). Durch die bereits erwähnte G-CSF Behandlung konnte eine reduzierte Tachyarrhythmie neigung der Herzen nach induziertem Myokardinfarkt beobachtet werden und diese wurde auf eine Steigerung der Connexin43-Expression in der Infarkttrandzone zurückgeführt (55). Jene Ergebnisse konnten ein Jahr später durch Kuwabara et al. reproduziert werden (56). Kuhlmann et al. beobachteten zudem eine Kardiomyozytenhypertrophie nach G-CSF Applikation (55).

Die ersten Stammzell-basierten Therapieversuche, mit der Zielsetzung durch einen Myokardinfarkt hervorgerufene ischämische Anteile des Herzens zu regenerieren, wurden mit Hilfe von aus dem Knochenmark nach G-CSF Applikation mobilisierten hämatopoetischen Zellen durchgeführt (81). Die mobilisierten hämatopoetischen Zellen wanderten dabei aus dem Knochenmark via des Blutkreislaufes in die ischämischen Bereiche des Herzens ein, mit der Zielsetzung, sich dort vor Ort weiter zu Kardiomyozyten zu differenzieren (81).

Später wurden dann aus dem Knochenmark entnommene Stammzellen direkt in das Herz transplantiert. Die Zellgewinnung aus dem Knochenmark für die Transplantation von adulten Stamm- und Progenitorzellen erfolgte durch eine Punktion des Beckenknochens oder mittels Stammzellapherese (36). Anschließend wurden diese Zellen in das geschädigte Myokard mittels Injektion transplantiert. Der Vorteil der Verwendung autologer Vorläuferzellen liegt in der fehlenden Immunogenität, es kommt also zu keiner Abstoßungsreaktionen der transplantierten Zellen (81). Zudem haben die hämatopoetischen Stammzellen ein großes Zelldifferenzierungspotenzial (81). Eine weitreichende Akzeptanz der beiden zuvor beschriebenen Methoden stellte sich aber nicht ein, da die gewonnenen Resultate doppeldeutige Ergebnisse lieferten (81).

In klinischen Studien konnten dabei positive kardiovaskuläre Effekte durch G-CSF-Gabe bewirkt werden (42, 44). Ince et al. führten im Jahre 2005 eine Studie mit einjährigem „Follow up“ durch (44). Es wurden Infarkt-Patienten mit unbehandelten Patienten nach erfolgter oder ausgebliebener G-CSF Applikation verglichen (44). Dabei konnte bei den mit G-CSF behandelten Patienten eine Immigration von CD34 positiven mononukleären Zellen aus dem peripheren Blutkreislauf in das Infarktareal beobachtet werden, welches anschließend zu einer verbesserten Ventrikelfunktion mit einer gesteigerten Auswurfleistung und zu einer Verhinderung des Umbaus des linken Ventrikels führte (44). Hüttmann et al. wiesen im Jahre 2006 nach, dass durch vier G-CSF Intervallgaben mit jeweils einer Dauer von 10 Tagen pro Behandlung eine Stammzellmobilisierung aus dem Blut in das Herz von Patienten mit dilatativer oder ischämischer Kardiomyopathie erfolgte (42). Dadurch konnte eine physikalische Leistungssteigerung bei den Patienten erreicht werden (42).

Jedoch konnten wiederum weitere klinische Studien, wie z.B. die von Zohlhöfer et al. (2006) keine Unterschiede zwischen den mit G-CSF behandelten und unbehandelten kardiovaskulär vorgeschädigten Patienten feststellen (104). Zohlhöfer et al. (2006) postulierten, dass eine Stammzell-Mobilisierung mittels G-CSF Therapie bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt keinen Einfluss auf die Infarktgröße, die linke Herzfunktion oder die Restenosierung der Koronararterien habe (104). Als eine Begründung für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse wurden die unterschiedlichen Behandlungsprotokolle, welche bei den einzelnen klinischen Studien

angewandt worden waren, genannt (51).

Im infarzierten Gehirn steigerte G-CSF die Progenitorzellendifferenzierung zu Neuronen (87) und verbessert die Postinfarkt-Erholung des Gewebes, im besonderen die der sensorimotorischen Funktion (51). Zudem führt im Gehirn die G-CSF Applikation zu einer Verkleinerung des zerebralen Infarktareals und scheint neuroprotektive Effekte zu vermitteln (51)

G-CSF wirkt auch auf Kardiomyozyten und Endothelzellen und schützt diese direkt vor Apoptose, außerdem fördert es die Endothelzellproliferation (33, 55).

Im Jahre 2005 konnte durch Harada et al. der G-CSF-R in adulten und auch bei neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden (33). Dabei führte die Behandlung der Kardiomyozyten mit G-CSF in vitro zur Aktivierung von STAT1, STAT3 und Jak2 (33). Nach einem induzierten Myokardinfarkt konnte die G-CSF Behandlung in vivo eine Funktionsverbesserung des Herzens bewirken und antiapoptotische Effekte vermitteln (33). Des Weiteren wurden nach G-CSF Applikation die Expression der STAT3-, Bcl-2- und Bcl-xL-Proteine hochreguliert, Bcl-2 und Bcl-xL besitzen dabei eine antiapoptotische Wirkung (33). Dieser Effekt konnte gezielt durch die Überexpression einer dominant negativen Form des STAT3-Proteins inhibiert werden (33). Zudem zeigte sich eine vermehrte Vaskularisierung nach erfolgter G-CSF Behandlung (33).

Im Jahre 2006 wurden durch Ueda et al. G-CSF Effekte bei isolierten Rattenherzen in einem Ischämie- / Reperusionsmodell gezeigt (99). Eine G-CSF Applikation führte zu einer Reduktion der Infarktgröße, indem die Überlebensrate der Kardiomyozyten nach erfolgtem Myokardinfarkt gesteigert wurde (99). Dabei konnte nach G-CSF-Gabe eine starke Aktivierung von Jak2, STAT3, ERK, Akt und der endothelialen NO Synthase (eNOS) beobachtet werden (99). Sie vermuteten, dass durch Jak2 das Protein PI3K aktiviert wird, dieses dann im Anschluss zu einer Aktivierung von Akt und eNOS führt, welche dann die protektiven kardialen Effekte vermitteln (99).

Es wurden ebenfalls G-CSF Effekte im ischämischen femoralen Gewebe beobachtet, welche auf eine Stimulation der Angiogenese durch G-CSF hinwiesen (78). Diese Effekte beruhen auf parakrinen Mechanismen, die von neutrophilen Granulozyten und von durch G-CSF Gabe ins Blut mobilisierten Monozyten herrührten (78). Dabei wurde

beobachtet, dass die Anzahl von neutrophilen Granulozyten nach G-CSF Applikation stieg und die Zellen „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) sekretierten, welches zu einer Förderung der Angiogenese führte (78).

Zurzeit wird also angenommen, dass die G-CSF-Wirkung auf Effekten beruht, die durch immigrierte knochenmarksgereifte Zellen und / oder direkte Effekte des Zytokins auf Herzzellen ausgelöst werden (51).

1.3.2 G-CSF Rezeptor (G-CSF-R)

Damit die Zytokine ihre Wirkung in den Zielzellen entfalten können, werden Zytokin-Rezeptoren benötigt an welchen diese binden können (53). Nach der Aktivierung des Rezeptors werden in der Zielzelle zahlreiche Signaltransduktionswege ausgelöst (53).

Die Zytokinrezeptoren werden in Typ I bis IV eingeteilt. Jeder Typ besitzt dabei charakteristische Liganden-Bindungs-Module (53). Typ I gehört zu der Hämatopoetin-, Typ II zu der Interferon-, Typ III zu der „Tumor necrosis factor“ (TNF)- und Typ IV zu der Immunglobulin-Rezeptorfamilie (53).

Der G-CSF-R („Cluster of Differentiation“ 114, CD114), gehört der Zytokin Rezeptor Familie Typ I an (51). Die Rezeptoren der Familie Typ I regulieren die Zellproliferation (51). Der G-CSF-R ist ein Rezeptor, der aus einem extrazellulären Liganden-bindenden Anteil, einer transmembranen Domäne und einem für die Signaltransduktion wichtigen zytoplasmatischen Anteil besteht (51). In der zytoplasmatischen Domäne aller Zytokin-Rezeptoren liegt dabei keine enzymatische Aktivität vor (53).

Der extrazelluläre Anteil des G-CSF-R besteht aus 6 Domänen und hat am N-Terminus eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (Ig) und C-terminal insgesamt fünf Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen (FN III) (51). Dabei bilden die zwei distalen FN III das Zytokin-Rezeptor-homologe-Modul (CRH) (30, 51). Der transmembran gelegende G-CSF-R Anteil wird aus 22-28 Aminosäuren aufgebaut (53).

Des Weiteren hat der G-CSF-R zwei G-CSF Bindungsstellen, welche als „Site II“ und „Site III“ bezeichnet werden. Die Ig-Domäne stellt dabei die „Site III“ und das CRH-Modul die „Site II“ (30, 51). Bindet G-CSF an den Rezeptor, erfolgt eine Aktivierung der Januskinase (Jak), des „V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene

homolog“ (Lyn), der „signal transducers and activators of transcription“ (STATs) und der „extracelullar signal-related kinase 1/2“ (ERK 1/2) (51). Der Rezeptor-Zytokin-Komplex besteht aus zwei G-CSF-R Molekülen und zwei antiparallel-assoziierten G-CSF Zytokin Molekülen (51).

1.3.3 G-CSF vermittelte Signaltransduktion

Der G-CSF Rezeptor wird im kardiovaskulären System, insbesondere in adulten und neonatalen Kardiomyozyten (33, 55) exprimiert. Wie in **Abb.2** zu sehen ist, werden Signaltransduktionswege wie der Ras/MAPK-Signalweg (4, 7, 51), der p38 MAPK Signalweg (3, 27), der Jak/STAT Signalweg (84, 96) und der PI3K/Akt Signalweg (75, 94), welche bekannt dafür sind, dass sie „downstream“ des G-CSF-R aktiviert werden, auch bei den Regulationskreisen in Kardiomyozyten und im Rahmen der Herzzelldifferenzierung und -proliferation angesprochen. Bindet G-CSF an das Rezeptordimer kommt es zur Aktivierung dieser Wege (4, 51, 95).

Die mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK) werden in vier Gruppen unterteilt (39). Die erste Gruppe besteht aus ERK1/2, vorgeschaltet MEK1/2, die zweite Gruppe aus p38 MAPK, vorgeschaltet MKK3/6, die dritte Gruppe aus JNK, vorgeschaltet MKK4/7 und die vierte Gruppe aus ERK5, vorgeschaltet MEK5 (39). Dadurch wird die Proliferation und Differenzierung vorangetrieben (51). Es erfolgt zunächst eine Aktivierung des Adapterproteins Shc durch Phosphorylierung (53). Daraufhin werden der Ras/MAPK- (4, 51), der p38 MAPK- und der ERK 1/2-Signaltransduktionsweg aktiviert (27, 51).

Ein weiterer Signaltransduktionsweg ist der Jak/STAT Signalweg (4, 51, 84, 95). Die Janus Kinasen (Jak), die der Gruppe der nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen angehören, werden durch die Dimerisation des Rezeptors zunächst phosphoryliert und somit aktiviert (4, 51, 95). Im weiteren Verlauf phosphorylieren die Janus Kinasen wiederum den G-CSF Rezeptor an spezifischen Tyrosinresten. Die Proteine der „signal transducers and activators of transcription“-Gruppe (STATs) werden ebenfalls durch Janus Kinasen aktiviert und translozieren nach der Aktivierung in den Nukleus, wo sie anschließend als Transkriptionsfaktoren wirken (4, 51). Mitglieder der STATs-Gruppen,

welche durch G-CSF aktiviert werden, sind die STAT1, STAT3 und STAT5 (97, 98). Die unphosphorylierte STAT-Form liegt dabei als Monomer, die phosphorylierte Form als Homodimer vor (53). Aktiviertes STAT3 fördert das Zellüberleben (33) und ist an der Transduktion von Proliferationssignalen beteiligt (70).

Die Aktivierung der Akt-Proteinkinase erfolgt über das Zusammenspiel mehrerer Mediatoren (25, 75). Zuerst wird die nicht-Rezeptor Tyrosinkinase Lyn „downstream“ des G-CSF-R aktiviert (20). Anschließend wird als nächstes „Casitas B-lineage Lymphoma“ (c-Cbl) phosphoryliert, das wiederum führt zur Bindung von c-Cbl an die Phosphatidylinositol PI3-Kinase (101). Die PI3-Kinase aktiviert dann die Akt-Kinase (28). Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges führt zu einem gesteigerten Zellüberleben (83, 94).

Die Aktivität des G-CSF-R kann über die Proteine „suppressors of cytokine signaling 3“ (SOCS3) und „SH2-containing inositol phosphatase“ (SHIP) negativ beeinflusst werden (40). Dabei wird SHIP ebenfalls von Shc rekrutiert und hemmt den Aktivierungsschritt der PI3-Kinase (41). SOCS3 dagegen inhibiert STAT3 und führt den aktivierten Rezeptor dem proteasomalen Abbau zu (40).

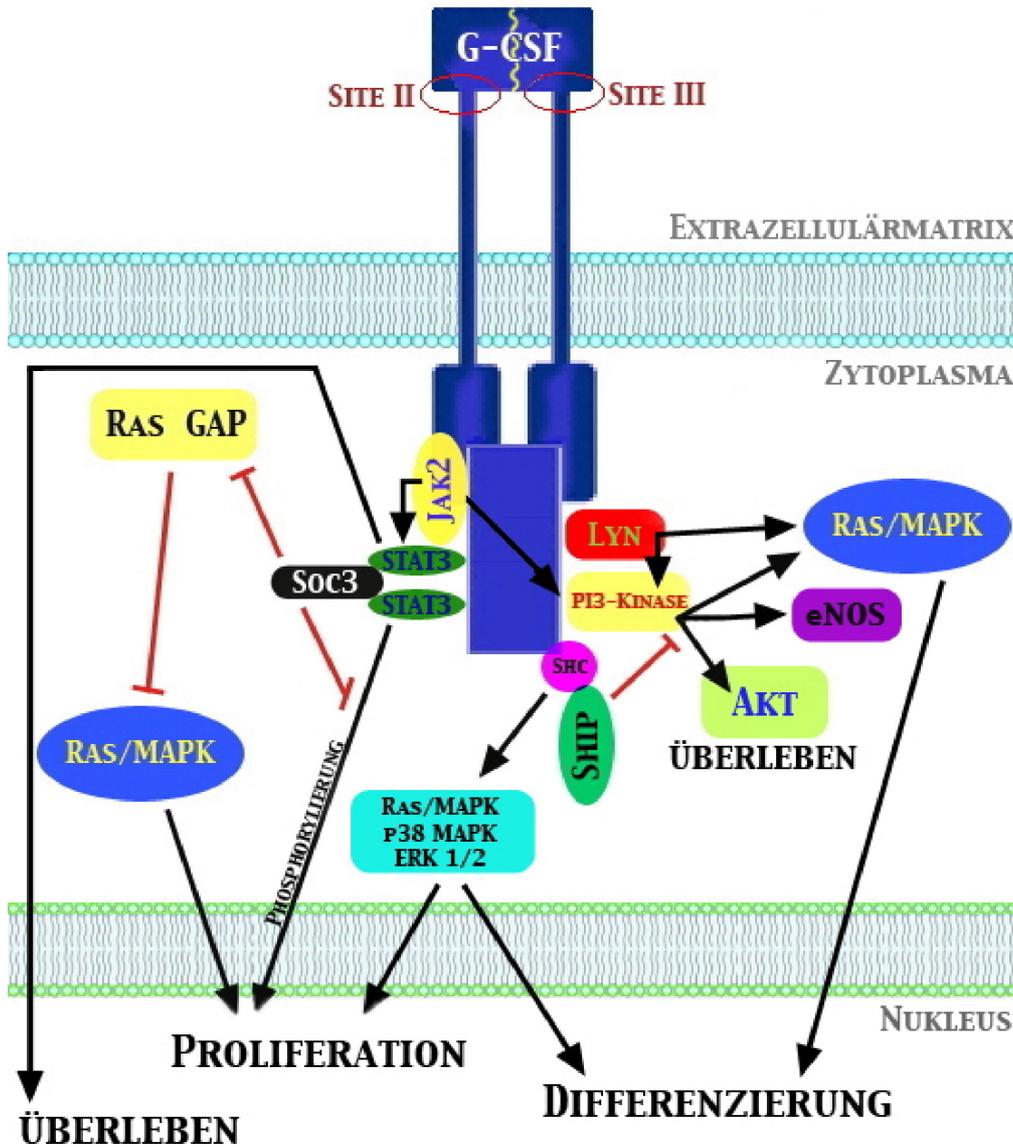


Abb. 2: Schematische Darstellung der durch G-CSF aktivierten Signalkaskaden

Durch die G-CSF-Ligandenbindung über die Bindungsstellen site II und III kommt es zu einer antiparallelen Homodimerisation des G-CSF Rezeptors. Daraus resultieren die Aktivierungen verschiedener Signaltransduktionswege (dargestellt als schwarze Pfeile): Jak/STAT, Akt, eNos, MAPK (p38 MAPK, Ras/MAPK und ERK 1/2). Eine negative Regulierung (dargestellt als rote Verbindungen) des aktiven Rezeptors erfolgt über die Proteine SOCS3 und Ship. Begriffserklärung: eNos = endotheliale NO Synthase; GAP = GTPase aktivierendes Protein; Jak = Janus Kinase; MAPK = mitogen aktivierte Proteinkinase; Ship = SH2-containing inositol phosphatase; SOCS3 = suppressor of cytokine signaling-3; STAT = signal transducers and activators of transcription; G-CSF-R = G-CSF Rezeptor.

1.4 Pluripotente embryonale Stammzellen: ein in-vitro Modellsystem für die Charakterisierung kardiovaskulärer Differenzierungsprozesse

Eine Besonderheit der ES-Zellen ist ihre Pluripotenz (81, 91), folglich können sie sich in alle endo-, meso- und ektodermale Zellen der drei Keimblätter differenzieren (54, 91). Dabei entwickelt sich das Herz während der Embryogenese aus dem mesodermalen Keimblatt (65).

Um die Differenzierungsfähigkeiten der embryonalen Stammzellen in Richtung kardiovaskulärer Zellen bestmöglich zu nutzen, werden so genannte „embryoid bodies“ („EBs“) generiert (s. 3.3.6). Bei einem „embryoid body“ handelt es sich um eine dreidimensionale Struktur, die einen Zellkomplex darstellt (12, 60). Dadurch, dass in den „EBs“ alle drei Keimblätter vertreten sind, beeinflussen sich die unterschiedlichen Zellen gegenseitig und ermöglichen unter eine komplexe kardiale, neuronale, vaskuläre Differenzierung (12, 45, 60). Das „embryoid body“ Modellsystem soll die Entwicklungsphase der frühen embryonalen Entwicklung, angefangen von der Blastozyste (z.B. beim Menschen am 4. Tag der Embryogenese) bis zum Epiblast (z.B. beim Menschen in der 3. Wochen der Embryogenese), nachahmen (32).

In dieser Arbeit soll der „embryoid body“ Zellkomplex die Infarkttrandzone im Herzen in vitro imitieren, da es auch im Infarktareal zu zahlreichen Differenzierungs- und Umbauprozessen post infarctum kommt (10, 55, 88).

Eine Behandlung von murinen „EBs“ mit TGF-beta, BMP2 oder TNF-alpha hatte zur Folge, dass eine verstärkte Kardiogenese in diesen Zellkomplexen ablief, so dass z.B. „beating areas“ und eine gesteigerte Myofibrillogenese beobachtet werden konnten (8, 10, 12).

Auch Chen et al. (2006) demonstrierten, dass eine in diesem Fall mit 20 ng / ml „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) erfolgte Behandlung die Kardiomyozytendifferenzierung in aus embryonalen Stammzellen generierten „EBs“ deutlich steigern konnte (19). Dieser Effekt wird über eine ERK-beteiligte Flk-1 und Flt-1 Aktivierung vermittelt (19).

Demnach ist die „embryoid body“ Methode dafür geeignet, um die kardiovaskuläre differenzierungsfördernde oder ggf. -hemmende Wirkung eines Faktors / Zytokins auf pluripotente Zellen darzustellen. Für diese wissenschaftliche Arbeit ist dabei das

Zytokin G-CSF von besonderem Interesse, da bei diesen Zellen bis dato keine wissenschaftlichen Ergebnisse im Bezug auf dessen kardiovaskuläre Wirkung vorliegen.

1.5 Ein Ausblick - mögliche therapeutische Einsatzmöglichkeiten für kardiovaskuläre Zellen

Diese Dissertation beschäftigt sich vor allem mit der Grundlagenforschung im Bereich von Differenzierungsprozessen kardiovaskulärer Zellen. Für den in der Zukunft denkbaren therapeutischen Einsatz dieser Zellen, vor allem von embryonalen Stammzellen, gibt es immer noch zahlreiche ungelöste Probleme, welche besonders die Nutzung der ES-Zellen einschränken. Zum einen ist die Gewinnung der embryonalen Stammzellen ethisch umstritten und die Verfügbarkeit dieser Zellen eingeschränkt (43), zum anderen trat nach der Transplantation der ES-Zellen in das Herz ein erhöhtes Tumorstadiumsrisiko auf (10, 91). Nach der weitergehenden Erforschung der Zelldifferenzierungsprozesse von ES-Zellen und neuen Methoden zur Zellgenerierung, besteht nun die Möglichkeit jene Zellen im Tiermodell tumorfrei transplantieren zu können (10). Behfar et al. (2007) konnten nachweisen, dass das Tumorstadium durch eine Applikation von 30 ng / ml TNF- α unterdrückt werden kann (10). Für die Versuche wurden „EBs“ aus ES-Zellen generiert und anschließend mit TNF- α behandelt (10). Behfar et al. zeigten weiter, dass Tumorfaktoren herunter- und die kardialen Transkriptionsfaktoren heraufreguliert wurden (10). Die auf diesem Wege hergestellten kardialen Vorläuferzellen wurden in das murine Herz transplantiert und differenzierten dort weiter zu Kardiomyozyten (10). Die transplantierten Zellen konnten anschließend im Narbengewebe detektiert werden und waren proliferationsfähig.

Kolossov et al. konnten im Jahre 2006 darlegen, dass eine Transplantation von Knochenmarkszellen nicht zu einer Verbesserung der Herzfunktion führte, wohingegen aus embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten die Herzfunktion nachweislich verbessern konnten (52). Durch eine Puromycin-Behandlung wurden die aus den embryonalen Stammzellen abgeleitete Kardiomyozyten, welchen zuvor ein Puromycin-Resistenz-Gen in das Genom implementiert worden war, selektiert, so dass

sich im Anschluss Kardiomyozyten-Reinheitswerte von mehr als 99% ergaben (52). Diese gewonnenen Herzmuskelzellen wurden anschließend in das Infarkttherz transplantiert (52). Des Weiteren beteiligten sich die Knochenmarkszellen im Gegensatz zu den aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten nicht an der Bildung von Herzmuskel- und Endothelzellen (52). Auch 4 - 5 Monate nach der Transplantation der aus embryonalen Stammzellen abgeleiteten Kardiomyozyten in das Infarktareal konnten keine Anzeichen für ein Tumorwachstum nachgewiesen werden (52). Ob diese Ergebnisse auch im Menschen reproduzierbar sind, bleibt abzuwarten. Das angestrebte, längerfristige Ziel der embryonalen Stammzellforschung ist es, regenerative Therapien für das geschädigte Herz zu entwickeln und falls möglich eine Wiederherstellung der geschädigten Herzmuskulatur zu erreichen. Die Differenzierungsvorgänge von pluripotenten Zellen zu funktionsfähigen Kardiomyozyten könnten eine kardiale Regeneration maßgeblich unterstützen. Eine weitreichende Grundlagenforschung bildet dabei die Basis für einen möglichen späteren erfolgreichen therapeutischen Einsatz dieser Zellen.

1.6 Zielsetzung

Kuhlmann et al. (2006) zeigten, dass Mäuse, bei denen ein Herzinfarkt induziert wurde und diese simultan eine Behandlung mit G-CSF erhielten, eine Verbesserung der kardialen Ejektionsfraktion aufwiesen (55). Zudem konnte eine Reduktion der Arrhythmieneigung der Herzen erreicht werden (55). In dem Bereich der Infarkttrandzone konnte nach G-CSF Behandlung eine gesteigerte Connexin43 Expression und eine ausgeprägte Arteriogenese nachgewiesen werden (55). Diese Effekte könnten möglicherweise durch die G-CSF Applikation ausgelöst worden sein, wobei der Wirkungsmechanismus bis dato unbekannt ist (55).

Der G-CSF Rezeptor wird auf unreifen Zellen, neonatalen Kardiomyozyten, adulten Kardiomyozyten und auf Endothelzellen exprimiert (33). Dadurch könnten durch G-CSF direkte Effekte auf diese Zellen ausgeübt werden (33). Dabei ist die Konzentration der G-CSF- und der G-CSF Rezeptor-mRNA im murinen Herz nach Infarktinduktion

stark erhöht. Dieses deutet darauf hin, dass die G-CSF Signaltransduktionswege im Herzen endogen aktiviert werden könnten (55).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob G-CSF die Differenzierung von unreifen Zellen in Richtung kardiovaskulärer Zelltypen und / oder deren Proliferation beeinflusst. Dazu wurden embryonale Stammzellen und daraus abgeleitete „embryoid bodies“ als in-vitro Modelle verwendet. Bei „embryoid bodies“ (EBs) sind vielfach auch kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse nachgewiesen worden, weshalb das „EB“-Zellsystem als ein anerkanntes in-vitro System für die Analyse solcher Differenzierungsvorgänge genutzt wird. Im Rahmen der detaillierten Auswertung wurden „real-time“qRT-PCR und FACS-Analysen eingesetzt. Zudem wurden Versuche mit neonatalen Kardiomyozyten durchgeführt, um auch das Spektrum des Zell-Differenzierungsgrades zu einem späteren Zeitpunkt abdecken zu können. Dabei kamen die Westernblot- und „real-time“qRT-PCR-Verfahren zum Einsatz.

2. Material

2.1 Anorganische Materialien

2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalienliste

Art der Chemikalie	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie
β -Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
Desoxyadenintriphosphat (dATP)	Promega
Desoxycytosintriphosphat (dCTP)	Promega
Desoxyguanintriphosphat (dGTP)	Promega
Desoxynukleotidtriphosphat	Eurogentec
dNTP / dUTP Mix	Eurogentec
Desoxythymintriphosphat (dTTP)	Promega
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Calbiochem
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie
Ethidiumbromid	Riedel-de-Haën
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie
Fibronectin	Sigma-Aldrich Chemie
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich Chemie
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie
D-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie
Glyzerin	Merck
Glyzin	Sigma-Aldrich Chemie
L-Glutamin	PAA
Methanol	Roth
Magnesiumchlorid	Applichem
Natriumacetat	Roth
Natriumbicarbonat	Merck
Natriumchlorid	Merck

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie
Natriumpyruvat	Biochrom
PeqGOLD MoSieve™ Agarose MS 500	PaqLab
PeqGOLD Universal Agarose	PaqLab
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie
RNasin® Plus	Promega
Salzsäure (HCl)	Merck

2.2 Organische Materialien

2.2.1 Zytokine

Tab. 2: Zytokine

Art des Zytokins	Hersteller
Endothelin 1	Bachem
ESGRO® (LIF = leukemia inhibitory factor)	Chemicon
„Fibroblast Growth Factor 2“ (FGF2)	Immunotools
„granulocyte-colony stimulating factor“ (G-CSF); recombinant mouse, carrier-free, in CMF-PBS rekonstituiert	R & D Systems

2.2.3 Aminosäuren

Tab. 3: Aminosäuren

Art der Aminosäuren	Hersteller
Minimal-essentielle Aminosäuren (MEM)	Biochrom
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom

2.3 Biologische Materialien

2.3.1 Enzyme

Tab. 4: Enzyme

Art des Enzyms	„Enzyme Commission (EC) number“	Hersteller
Kollagenase	EC 3.4.24.7	Gibco
Pancreatin	Trypsin - EC 3.4.21.4 Chymotrypsin - EC 3.4.21.1 Elastase - EC 3.4.21.36 Carboxypeptidase - EC 3.4.17.1 Carboxypeptidase B - EC 3.4.17.2	Gibco
M-MLV Reverse Transkriptase	EC 2.7.7.49	Promega
Taq Polymerase	EC 2.7.7.7	Invitrogen
Trypsin-EDTA	EC 3.4.21.4	PAA

2.4 Nährmedien und Antibiotika

2.4.1 Nährmedien

2.4.1.1 Seren

Tab. 5: Seren

Art des Serums	Hersteller
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie
Fötale Kälberserum (FCS)	Biowest
Neugeborenen Kalbsserum (NCS= newborn calf serum)	Gibco
Pferdeserum 1%	Sigma

1 % (v/v) MEM (100 x)

2.4.2 Antibiotika

Tab. 7: Antibiotika

Art des Antibiotikums	Hersteller
Penicillin	PAA
Streptomycin	PAA

2.5 Lösungen und Puffer

2.5.1 Gekaufte Lösungen und Puffer

Tab. 8: Fertige Lösungen und Puffer

Art der Lösung / des Puffers	Hersteller
CASY®ton	Schärfe System GmbH
Laemmlli Proben Puffer	Bio-Rad Laboratories
Low Cross buffer (Western Blot)	Candor Bioscience GmbH
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich Chemie
1 x PBS Tabletten (phosphate buffered saline)	Gibco
1 x PBS (-Ca ²⁺ ; -Mg ²⁺) (CMF-PBS)	PAA
10 x Tris / Borsäure / EDTA extended range Puffer (TBE-Puffer)	Bio-Rad Laboratories
10 x Tris / Glyzin / SDS Puffer	Bio-Rad Laboratories
Sigmapuffer	Sigma-Aldrich Chemie

2.5.2 Angesetzte Lösungen und Puffer

Anodenpuffer	100 mM Tricin in 300 mM Tris-HCl pH 8,8	
Fibronectinlösung	Fibronectin Stammlösung	(100 μ l)
	PBS	(4 ml)
Kathodenpuffer	300 mM Capronsäure in 30 mM Tris-HCl pH 8,7	
10 x MOPS-EDTA Puffer	0,2 M MOPS (säurefrei)	
	50 mM Natriumacetat (wasserfrei)	
	10 mM EDTA	
	in A. bidest	
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	
Pancreatin-Lösung	NaCl	(8 g)
	D-Glucose	(2 g)
	KCl	(200 mg)
	Natriumphosphat $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$	(57,5 mg)
	Phenolrot	(20 mg)
	Natriumbicarbonat	(20 mg)
	A. bidest	(1 l)
6x Probenpuffer	Aqua	(7 ml)
	Glyzerin (87 %)	(3 ml)
	Bromphenolblau (10 %)	(100 μ l)

RNA-Probenpuffer	Formamid deionisiert ($\geq 99,5\%$)	(0,75 ml)
	10x MOPS-EDTA-Puffer	(0,15 ml)
	Formaldehyd (37 %)	(0,24 ml)
	A. bidest	(0,145 ml)
	Glyzerin (87 %)	(0,115 ml)
	Bromphenolblau (10 %)	(0,02 ml)

Sigma-Puffer	Sigmapuffer	(90 ml)
	7,5% NaHCO ₃	(1,6 ml)
	5M NaOH für pH Einstellung (7,34 und 7,35)	
	Mit Zellkulturwasser auf Endvolumen von 100ml auffüllen	

Transferpuffer	25 mM Tris	
	192 mM Glyzin	
	20 % (v/v) Methanol	
	in A. bidest	

Tris / Glyzin / SDS Laufpuffer	1,92 M Glyzin	
	20 % (w/v) SDS	
	in 250 mM Tris-HCl pH 8,3	

2.6 Kits und Reagenzsysteme

2.6.1 RNA-Extraktion

- RNeasy® Mini Kit, Qiagen
- RNeasy® Fibrous Tissue Kit, Qiagen
- RNeasy® Micro Kit, Qiagen

2.6.2 Reverse Transkription

- M-MLV Reverse Transkriptase (200 U / μ l), Promega
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems
- Oligo(dT)15, Promega

2.6.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

- Taq Polymerase, nativ (5 U / μ l), Invitrogen

2.6.4 „Real-time“qRT-PCR

- Power SYBR Green PCR Mastermix, Applied Biosystems

2.6.5 Agarosegelelektrophorese

- SYBR Safe™ DNA Gel Stain, Invitrogen

2.6.6 Proteinextraktion

- Cell disruption Puffer (dem PARIS® kit entnommen), Ambion
- Advanced™ Protein assay Reagenz, Cytoskeleton Inc.

2.6.7 Western Blot Analysen

- ECL Kit, Amersham Bioscience
- Pierce® ECL Western Blotting Substrat, Thermo Scientific
- CL-X Posure™ Film, Thermo Scientific

- PVDF-Membran, Millipore
- Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83 reinforced, Whatman

2.7 Generierung der PCR-„primer“

Die in dieser Dissertation verwendeten „primer“ wurden von der Firma Metabion, eurofins MWG GmbH und Sigma-Aldrich hergestellt. Das „primer“-Design wurde unterstützt durch das online verfügbare Programm primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>; 01.04.2011). Dabei ist zu beachten, dass die „primer“ die Exon-Exon-Grenzen umschließen, um ggf. genomische DNA (gDNA)-Verunreinigungen innerhalb der cDNA-Proben lokalisieren zu können. Amplifikate, die auf die gDNA zurückzuführen sind, wären sichtbar länger, als solche, welche von der cDNA als „template“ ihren Ursprung haben. Dieses ist der Fall, weil in der genomischen DNA noch zusätzlich zu den Exon-, die Intronsequenzen vorhanden sind. Zudem erfolgte eine Auswahl der Bindungsstellen des „primer“-Paares möglichst weit zum 3'-OH Ende der Gensequenz gelegen, da die DNA-Synthese immer in 5'-3'-Richtung abläuft. Durch diese Platzierung kann eine effiziente „primer“-Bindung an der cDNA ermöglicht werden.

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten „primer“ (bp=Basenpaare)

Gen	„Forward-primer“	„Reverse-primer“	Amplifikatlänge in bp
ANP	TACAGTGCGGTG TCCAACA	CTCATCTTCTACCGG CATCTT	83
beta-Aktin	TTGCTGACAGGA TGCAGAAG	ACATCTGCTGGAAG GTGGAC	141
BNP	TGCTTTGGGCAC AAGATAGA	AGACCCAGGCAGAG TCAGAA	125
CD 34	ATGTCCGGCCTT CTCCTATT	CCCAAAGGTCAGAG ATTGGA	123
Connexin43	GAGAGCCCGAA	GCTCCAGTCACCCA	121

	CTXTCCTTT	TGTCT	
Cyclophilin A	GACCAAACACA AACGGTTCC	CATGCCTTCTTTCAC CTTCC	98
C/EBP-alpha	AAAGCCAAGAA GTC GTGGAC	CTTTATCTCGGCTCT TGCGC	91
Fik1	CTCAATGTGGGG CTTGATTT	CAGGTGTATTCCCCT TGGTC	170
GATA4	TCAAACCAGAA AACGGAAGC	GTGGCATTGCTGGA GTTACC	117
G-CSF	CTGCAGGCTCTA TCGGGTAT	CTGGAAGGCAGAAG TGAAGG	171
G-CSF-R I	GTAGCCTGAGCT CCTGGTTG	CGGTTTCTTGTCTTC CTCCA	112
G-CSF-R II	AGCCCACAGTA GCCTGAG	TCTCCTTGGAGCAC ATAGGC	204
MEF2c	GCAGCAGCAGC ACCTACATA	TGCTCAAGCTGTCA ACAGGA	230
MesP1	CGTTCAGTACG CAGAAACA	TTGTCCCCTCCACTC TTCAG	153
Mlc2v	AAAGAGGCTCC AGGTCCAAT	CCTCTCTGCTTGTGT GGTCA	177
Myosin-Heavy- Chain alpha	CAGAGTCGGTG AAGGGCATGA	TTCAACTGTAGCTTG TCCACCAG	122
Myosin-Heavy- Chain beta	GGACTTCATAGA CTTCGGCATGG	CCTTGAAGGTCATG TCTGTGGC	127
Nestin	ACAAGACTCCGT AGAGGTGA	CAAGCCCTGATCTA T CTTTG	166
Nkx 2.5	CAAGTGCTCTCC TGCTTTCC	GGCTTTGTCCAGCTC CACT	136
VE-Cadherin	CAGGCGGGTGT	CCAAGTCTCGTGA	150

	CAGCATC	ATCTCCA	
YY1	AAGAAGTGGGA GCAGAAGCA	CAACCACTGTTTCAT GGTCAA	112

2.8 Antikörper

2.8.1 Primäre Antikörper

Tab. 10: Zusammenstellung der verwendeten primären Antikörper

(HRP = horseradish peroxidase; WB = Western Blot)

Antigen	Firma	Verdünnung, / Methode
Cx43, non-phosphorylated	Zyomed System	1 : 1000 / WB
Cx43 total	Zyomed System	1 : 200 / WB
PCNA	Santa-Cruz	1 : 150 / WB
Anti-β-tubulin	Calbiochem	1 : 300 / WB

2.8.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 11: Zusammenstellung der verwendeten sekundären Antikörper

(HRP = horseradish peroxidase; WB = Western Blot)

Antigen	Firma	Verdünnung, / Methode
horseradish peroxidase -coupled anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology	1 : 2000 / WB

2.9 DNA- und Protein-Marker

2.9.1 DNA-Marker

Tab. 12: DNA-Marker

Art des DNA-Markers	Hersteller	Abb.
peqGOLD Ultra Low Range DNA- Leiter I	PaqLab	Siehe Anhang
MassRuler™ DNA Ladder Low Range	Fermentas GmbH	Siehe Anhang

2.9.2 Protein-Marker

Tab. 13: Protein-Marker

Art des Protein-Markers	Hersteller	Abb.
Precision Plus Protein™ Standards Dual Color	Bio-Rad Laboratories	Siehe Anhang

2.10 Versuchstiere und Zelllinien

2.10.1 Versuchstiere

- Mus musculus
- Rattus norvegicus

2.10.2 Zelllinien

2.10.2.1 Murine embryonale Stammzellen

Tab. 14: Embryonale Stammzellen aus Mus musculus

Art der ES-Zellen	Zellpassagenummer	Bezugsquelle
C3H	32	Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster
E14	36	Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster
HM1	36	Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster
Rosa	35	Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Münster

2.10.2.2 Neonatale Kardiomyozyten

Zellgewinnung aus:

- Mus musculus
- Rattus norvegicus

2.10.3 Versuchstierhaltung

Die in dieser Arbeit genutzten gentechnisch veränderten Organismen gehören der Sicherheitsstufe S1 an. Für die Organentnahme im Rahmen der durchgeführten Versuche sind die Mäuse und Ratten, entsprechend den Vorschriften des Tierschutzgesetzes, getötet worden.

2.11 Geräte

Tab. 15: Geräteliste

Methoden	Name des Gerätes	Herstellerfirma
Bioanalyser	Bioanalyser 2100	Agilent
Gelelektrophoresesystem	Sub-Cell GT DNA-Elektrophoresezelle	Bio-Rad Laboratories Inc
Geldokumentationssystem	Doc-Print Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat
Inkubator	Harcell150	Heraeus Holding GmbH
Phasenkontrastmikroskop	Nikon TMS-F	Nikon GmbH
PCR-Zykler	T Gradient	Whatman Biometra®
PCR-Zykler	Primus 25 advanced	PaqLab
Photospektrometer	Ultraspec III	Pharmacia LKB
„Real-time“ qRT-PCR	HT 7900	Applied Biosystems
RNA-Qualitätskontrolle	Bioanalyser	Agilent Technologies Deutschland GmbH
SDS-Page - 10 %iges SDS-Gel	Criterion precast Gel 10 % Tris-HCl, 1.0mm 18 comb	Bio-Rad Laboratories
Spektrophotometer	NanoDrop®-1000	NanoDrop Technologies
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Ultraschall-Homogenisator	UW 2070	BANDELIN electronic

Vortex	Mixer	Ernst Richter Medizintechnik Bremen-Münster
Wasserbad	GFL	Ernst Richter Medizintechnik Bremen-Münster
Western Blot (Röntgenfilmentwicklung)	OPTIMAX X-Ray Film Processor 1170-1-0000	PROTEC GmbH & Co KG
Western Blot Röntgenfilmentwicklungskammer)	Hypercassette™	Amersham Biosciences
Zellkultivierung	LaminAir Ha 2446 GS	Heraeus Holding GmbH
Zellzähler	CASY® Zellzählers	Schärfe System GmbH
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge	Mini Spin plus	Eppendorf
Zentrifuge	Megafuge1.0R	Heraeus

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Genexpressionsanalysen

Im Rahmen der Expressionsanalysen zahlreicher Gene ist zuerst die Total RNA aus den für die Versuche verwendeten Zellen extrahiert worden. Daraufhin wurde sie in cDNA umgeschrieben. Anschließend sind mit der cDNA als „template“ zum einen konventionelle RT-PCRs, zum anderen „real-time“ qRT-PCRs durchgeführt worden.

3.1.2 RNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Die Durchführung der Total RNA Extraktion erfolgte mit Hilfe der zuvor aufgelisteten Ready-to-use Kits (s. 2.6.1). Das RNeasy® Micro Kit kam bei einer sehr geringen Zelldichte zum Einsatz, das RNeasy® Mini Kit wurde für größere Zellmengen und nicht fibröses Gewebe verwendet und das RNeasy® Fibrous Tissue Kit bei fibrösem Gewebe eingesetzt. Zuerst wurden die Zellen lysiert und die freigewordene Total RNA einer anschließenden chromatographischen Aufreinigung unterzogen. Bevor die RNA-Konzentration und die Qualität bestimmt werden konnten, wurde eine Elution mit RNase freiem Wasser durchgeführt. Bei ausreichenden Ausgangsmengen wurde die Konzentration mit dem Spektrophotometer NanoDrop®-1000 (s. 2.11) ermittelt. Dabei erfolgte eine Reinheitsbestimmung mittels des Verhältnisses zwischen der Absorption bei 260 und 280nm (E_{260} / E_{280} für reine RNA = 2,0). Im Anschluss wurde die RNA-Qualität im Bezug auf eine eventuell stattgefundene Degradation mit dem Bioanalyser Agilent 2100 (s. 2.11) hin untersucht. Bei geringen RNA-Ausgangsmengen erfolgte zusätzlich mit diesem Gerät eine Konzentrationsbestimmung (s. 3.1.3.3).

3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Die im weiteren Verlauf beschriebene Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von RNA-, DNA-Molekülen und Proteinen. Die im Gel verwendete

Agarose bildet eine poröse dreidimensionale Struktur, durch jene die Nukleinsäuren im elektrischen Feld hindurchwandern können. So kann eine Auftrennung nach ihrer Molekulargröße erfolgen. Dann wandern die Nukleinsäuren entsprechend ihrer negativen Ladung vom Minuspol zum Pluspol. Durch den Einsatz unterschiedlicher Agarosekonzentrationen kann die Porengröße verändert werden und somit die Trenngenauigkeit der Elektrophorese beeinflusst werden. Um die Größe eines Fragments bestimmen zu können, wird zusätzlich ein Größenstandard (s. 8.1.1 / 8.1.2) aufgetragen.

3.1.3.1 Auftrennung von DNA-Proben mittels Agarosegelelektrophorese

Für die DNA-Proben-Auftrennung sind Gele mit einer Agarosekonzentration von 1-1,5% in 0,5 x TBE-Puffer hergestellt worden. Dafür wurde die zuvor aufgelistete Universalagarose eingesetzt. Die Zusammensetzung eines hergestellten Gels besteht aus:

DNA-Gelzusammensetzung (1 %):

<i>Universalagarose</i>	<i>1 g</i>
<i>TBE-Puffer (0,5x)</i>	<i>ad 100 ml</i>
<i>SYBR Safe™ (Zugabe nach dem Erhitzen)</i>	<i>14 µl</i>

Wenn eine höhere Trennschärfe benötigt wurde, ist die peqGOLD MoSieve™ -Agarose, die sich durch eine bessere Schmelzeigenschaft und eine bessere Löslichkeit von der Universalagarose unterscheidet, verwendet worden. Mit der peqGOLD MoSieve™ -Agarose ist es möglich Gele bis zu einer Agarosekonzentration von 6 % zu gießen. Zuerst wurde die Agarose, den Herstellerangaben entsprechend, gelöst. Nachdem die Agaroselösung sich auf 50 °C abgekühlt hatte, wurde sie in die Gelelektrophoreseform gegossen. Anschließend wurde ein Kamm eingesetzt, um für die Probenbeladung Gel-Taschen einzulassen. Nach einer Abkühlzeit von etwa 30 min. wurde das ausgelierte

Gel in eine mit 0,5 x TBE- Laufpuffer gefüllte horizontale Laufkammer (Sub-Cell GT DNA-Elektrophoresezelle, s. 2.11) transferiert und im Anschluss der Kamm entfernt. Daraufhin sind die Proben mit 6x Probenpuffer versetzt worden. Nach der Beladung des Gels mit den entsprechenden Proben inklusive eines entsprechenden Größenstandards wurde für ein Standardgel eine Spannung von 180 V angelegt. Für die weitere Dokumentation des Elektrophoreseergebnisses wurde mittels von UV-Licht das hinzugegebene SYBR Safe™ angeregt. Das SYBR Safe™ interkaliert zwischen den DNA-Basen und das emittierte Licht wurde im Anschluss mit Hilfe einer Kamera (Doc-Print Geldokumentationssystem, s. 2.11) detektiert.

3.1.3.2 RNA-Gelelektrophorese

Die RNA-Gelelektrophorese ist vom Prinzip her genauso wie die DNA-Elektrophorese durchgeführt worden. Die RNA tendiert im Gegensatz zu der DNA oft dazu Sekundärstrukturen auszubilden. Deshalb könnte ohne einen vorherig abgelaufenen Denaturierungsschritt keine zuverlässige Auftrennung nach der Molekülgröße stattfinden. Die Probenvorbereitung weicht von daher von jener, die für eine Standardgelelektrophorese benötigt wird, ab. Zuerst erfolgte eine Verdünnung der RNA-Probe 1 : 5 mit RNA-Probenpuffer, anschließend wurde die Probe für 15 min. bei 65 °C erhitzt und dann bis zum Auftragen im Gel auf Eis gestellt. Im Rahmen der Gel-Herstellung wurde der 1 x MOPS-EDTA-Puffer verwendet. Dieser wurde auch als Laufpuffer eingesetzt. Nachfolgend ist die Zusammensetzung eines 1 %igen RNA-Gels aufgelistet:

RNA-Gelzusammensetzung (1 %):

<i>Universalagarose</i>	<i>1 g</i>
<i>1 x MOPS-EDTA-Puffer</i>	<i>ad 100 ml</i>
<i>SYBR Safe™ (nach dem Erhitzen hinzuzugeben)</i>	<i>14 µl</i>

Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei einer Spannung von 60 V.

3.1.3.3 Automatisierte Gelelektrophorese-Systeme

Für die Qualitäts- und Quantitätsanalyse von geringen RNA-Mengen wurde ein automatisiertes Gelelektrophorese System angewendet. Dabei wurden die Proben mit dem Bioanalyzer 2100 (s. 2.11) analysiert. Es wurde ein „lab-on-a-chip“ Verfahren verwendet, bei welchem die über einen interkalierenden Farbstoff gefärbten Proben (maximal 12 Proben pro „chip“) chromatographisch über ein Gel getrennt und dann durch einen Laser detektiert wurden. Das so entstandene Chromatogramm liefert Informationen über den RNA-Degradationszustand und die RNA-Konzentration. Dabei findet die Mikrofluidik-Technologie Verwendung, um die biologischen Proben zu analysieren.

3.1.4 Reverse Transkription

Das Umschreiben von RNA in cDNA mit Hilfe von retroviralen reversen Transkriptasen (RNA-abhängige DNA-Polymerasen) wird unter dem Begriff der reversen Transkription (RT) zusammengefasst. Für große RNA-Mengen wurde folgendes Protokoll mit der M-MLV reversen Transkriptase angewendet:

<i>RNA</i>	<i>1 µg</i>
<i>OligodT</i>	<i>0,5 µl</i>
<i>A. bidest</i>	<i>ad 15 µl</i>

Dabei wurde der Ansatz bei 70 °C für 10 min. inkubiert und daraufhin sofort für 2-3 min. auf Eis gestellt. Dann wurde der unten aufgelistete Mastermix zum Ansatz hinzugegeben und bei 40 °C für 90 min. inkubiert:

<i>RT-Puffer</i>	<i>5 µl</i>
<i>dNTP-Mix(10mM)</i>	<i>1,25 µl</i>
<i>RNase Inhibitor (RNasin)</i>	<i>1 µl</i>
<i>M-MLV Reverse Transkriptase</i>	<i>1 µl</i>

A. bidest

ad 10 μ l

Bei kleinen RNA-Mengen ($\leq 1 \mu\text{g}$) wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (s. 2.6.2) verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte dabei nach Herstellerangaben. Die anschließenden Expressionsanalysen wurden mit Hilfe von unterschiedlichen PCR-Verfahren durchgeführt.

3.1.5 „Polymerase chain reaction“ (PCR)

Die PCR ist aus verschiedenen Schritten aufgebaut, welche im folgenden Teil aufgelistet sind:

1. Denaturierung

Schmelzen der Doppelstrang-DNA (engl.: „template“) in ihre Einzelstränge bei 95 °C.

2. „Annealing“

Bei einer niedrigeren „primer-abhängigen“ Temperatur zwischen ca. 55 - 65 °C lagern sich die eingesetzten „primer“ spezifisch an der DNA an. Somit wird das für die DNA-Polymerase benötigte 3'-OH Ende für die Synthese eines neuen DNA-Stranges zur Verfügung gestellt.

3. Elongation

Bei 72 °C wird durch die DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert, so dass die Reaktion mit zwei Doppelsträngen endet. Diese können nun in einem neuen weiteren Zyklus amplifiziert werden.

3.1.5.1 Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR verläuft nach den oben genannten Schritten. Im Anschluss finden sich die Substanzen aufgelistet, die für eine erfolgreiche PCR-Durchführung unerlässlich sind:

„ <i>template</i> “	2 μ l
<i>dNTP / dUTP-Mix (5 mM)</i>	0,2 μ l
<i>10x Puffer-MgCl₂</i>	2,5 μ l
<i>Mg²⁺ (50 mM)</i>	2,5 μ l
<i>Taq-Polymerase (5U / μl)</i>	0,3 μ l
„ <i>Forward-primer</i> “ (100 pmol / μ l)	1 μ l
„ <i>Reverse-primer</i> “ (100 pmol / μ l)	1 μ l
<i>A. bidest</i>	ad 25 μ l

Abb.3 zeigt das in der PCR verwendete PCR-Programm inklusive der Temperaturprofile und Laufzeiten der einzelnen Phasen.

1.	94°C	3 min.	initiale Denaturierung	
2.	94°C	30 sek.	Denaturierung	} 35-40 Zyklen
3.	55-65°C	1 min.	„Primer annealing“	
4.	72°C	30 sek.	Extension	
5.	72°C	8 min.	Finale Extension	
6.	4°C	unendlich	Schutz vor Degradation	

Abb. 3: Aufbau einer klassischen PCR

Die angegebene „primer annealing“ Temperatur schwankt je nach eingesetztem „primer“ zwischen 55 - 65° C und muss deshalb spezifisch für jeden „primer“ ermittelt und eingestellt werden.

Nach Verfügbarkeit wurden jeweils der PCR-Zykler T Gradient (s. 2.11) oder der Primus 25 advanced (s. 2.11) eingesetzt.

3.1.5.2 „Real-time“qRT-PCR

3.1.5.2.1 Quantitative „real-time“qRT-PCR

Die quantitative „real-time“qRT-PCR ist eine Weiterentwicklung der zuvor beschriebenen Polymerase Kettenreaktion (PCR). In dieser Arbeit wurde zur Durchführung der Experimente das „real-time“qRT-PCR-Gerät HT 7900 (s. 2.11) verwendet. Bei diesem speziellen PCR-Verfahren besteht die Möglichkeit, durch den Einsatz von DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen die Vervielfältigung der Amplifikate in „real-time“ (Echtzeit) zu verfolgen und anschließend über die Menge der hergestellten DNA eine quantitative Aussage zu tätigen. Um jene Zusatzinformationen

messen zu können, erfolgt eine Lichteinstrahlung mit einer zuvor definierten Wellenlänge, welche die zu analysierenden Proben anstrahlt und den fluoreszierenden Farbstoff anregt. Anschließend wird die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes detektiert und für die Berechnung der vorhandenen DNA-Amplifikate verwendet. Dabei korreliert die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes proportional mit der Zunahme des PCR-Produktes. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff weist zudem in gebundener Form eine höhere Fluoreszenzintensität auf als in ungebundener Form. Am Ende des Versuches wird mit Hilfe der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der „real-time“qRT-PCR vorgenommen. Eine korrekte Quantifizierung der PCR ist dabei nur in jener exponentiellen Phase möglich, in der die optimalen Reaktionsbedingungen gegeben sind.

3.1.5.2.2 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff – SYBR® Green

Bei den durchgeführten Experimenten wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green verwendet. Dabei kam der Power SYBR Green PCR Mastermix (s. 2.6.4) zum Einsatz. Das SYBR® Green interkaliert in die DNA. Da eine Zunahme der DNA-Menge nach jedem abgeschlossenen Zyklus erfolgt und damit die Produktmenge mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes angereichert wird, verstärkt sich das fluoreszierende Signal proportional zum PCR-Amplifikat. Eine Schwachstelle des Verfahrens ist, dass auch unspezifische Produkte detektiert werden können. Mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse (s. **Abb.4**) können jedoch diese unspezifischen Produkte anhand der unterschiedlichen Fragmentlängen gegenüber dem zu erzielenden Produkt aufgespürt werden.

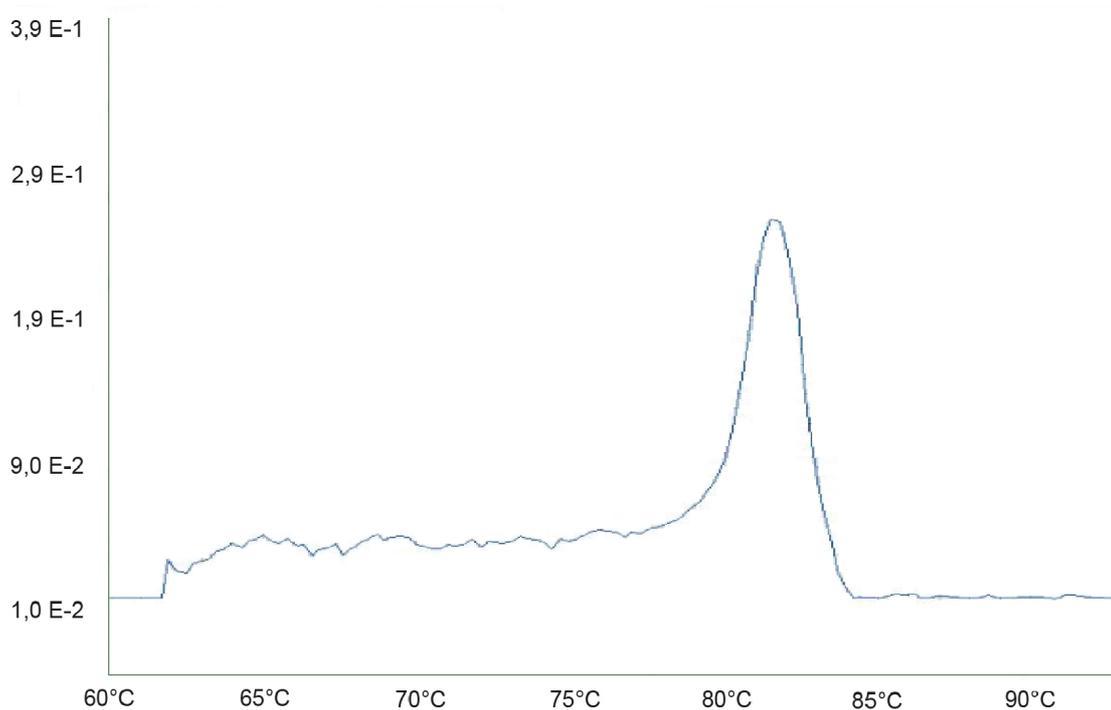


Abb. 4: Schmelzkurvenanalyse bei einer „real-time“qRT-PCR

Der Graph zeigt die Änderungsrate der Fluoreszenzintensität auf der y-Achse in Bezug zur Temperatur in °C auf der x-Achse. Ein deutlicher „peak“ ist bei ca. 82 °C sichtbar und lässt auf das Aufschmelzen eines spezifischen Amplifikats schließen. Das Schmelzen unspezifischer Produkte sowie „primer-dimere“ würde mehrere kleinere „peaks“ in einem niedrigeren Temperaturbereich erzeugen.

3.1.5.2.3 Relative Quantifizierung

Für die relative Quantifizierung wird ein Referenz-Gen („housekeeping“-Gen) als Bezugsmenge in die Berechnung mit einbezogen. Dadurch lassen sich auch unterschiedlichste Proben miteinander vergleichen. Bei jenem „housekeeping“-Gen handelt es sich um ein Gen, welches in den zu untersuchenden biologischen Proben keinen Schwankungen unterworfen ist und stets gleichmäßig exprimiert wird. Vornehmlich handelt es sich dabei um beta-Aktin oder Cyclophilin A. Deshalb kann man mit diesem Verfahren relative DNA-Mengen unterschiedlicher biologischer Proben im Hinblick auf ein Gen miteinander vergleichen.

3.1.5.2.4 CT -Wert

Der Verlauf der „real-time“qRT-PCR wird in drei Phasen aufgeteilt. Während der 1. Phase ist die Probenmenge beschränkt. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass die Taq Polymerase, die cDNA und die „primer“ als Enzym-Substrat-Komplex zusammen kommen. In der 3. Phase der PCR kommt es zu einem Anstieg von hemmenden Produkten wie DNA, Monophosphatnukleotiden und Pyrophosphat begleitet von Fehl-Hybridisierung. Der steigende Verbrauch der Substrate und die durch Hitze verursachte Zerstörung der Reagenzien stellt weitere limitierende Faktoren jenes Verfahrens dar. Demnach kann nur in der 2. Phase der DNA-Anstieg optimal quantifiziert werden. Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird der CT-Wert (Schwellenwert-Zyklus; engl.: „Threshold Cycle“) angewendet, welcher den Punkt beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Die Fluoreszenz wurde in denen für diese Arbeit durchgeführten Experimenten mittels des SYBR® Greens hervorgerufen, als Hintergrund-Fluoreszenz wurde ROX (6-Carboxyl-X-Rhodamine) verwendet. Wird also ein Gen, welches in jenem Experiment betrachtet wird, stark exprimiert, so ist schon nach wenigen Reaktionszyklen die entsprechende Gensequenz in ausreichender Menge amplifiziert worden, so dass die gemessene Fluoreszenz über dem Schwellenwert liegt. Schwach exprimierte Gene wiederum, liefern weniger „template“-cDNA und somit werden mehr Reaktionszyklen benötigt, um die gleiche Menge von Amplifikat bilden zu können und den Schwellenwert zu überschreiten (**s. Abb.5**). Es liegt demnach ein antiproportionales Verhältnis zwischen CT-Wert und Expressionsrate vor. Um die CT-Werte und damit die Expression verschiedener Gene bzw. verschiedener Proben miteinander vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewendet.

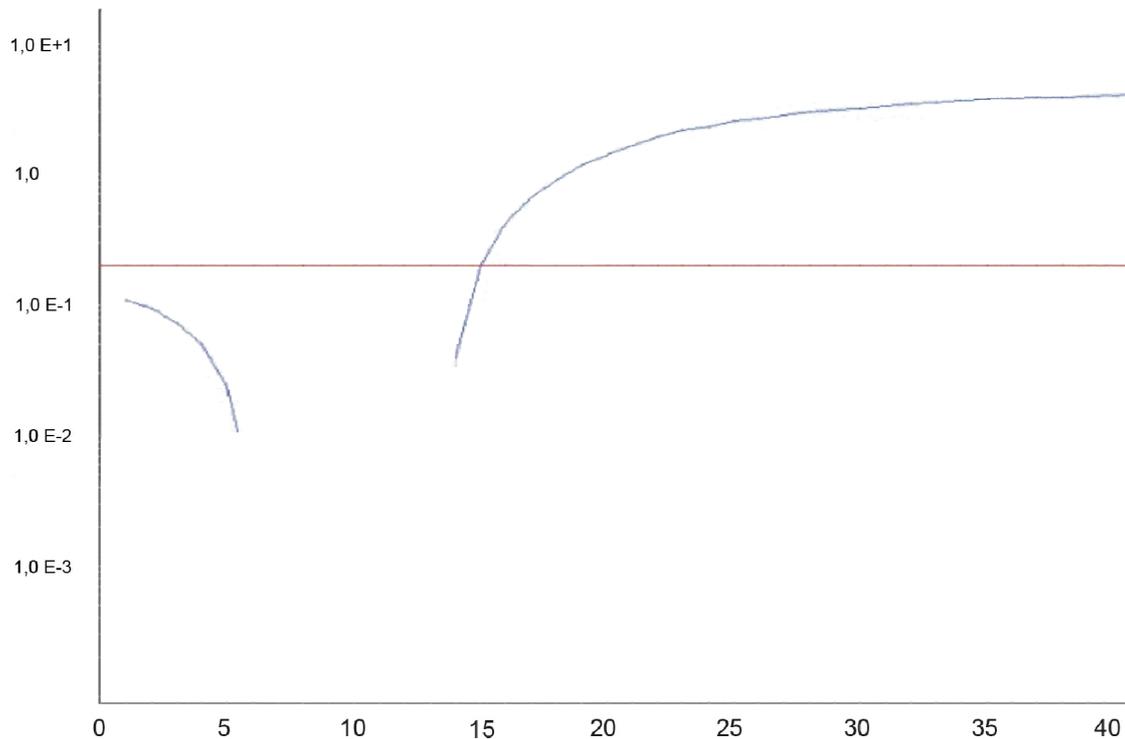


Abb. 5: Amplifikationskurve einer „real-time“qRT-PCR

Dargestellt ist ein typischer Verlauf einer Amplifikationskurve, welcher am Ende des „real-time“qRT-PCR-Laufs erstellt wird. Auf der X-Achse wird die Zyklusanzahl auf der Y-Achse die Fluoreszenzintensität des SYBR® Greens dargestellt. Nach einer gewissen Anlaufphase wird ein charakteristische exponentielle Amplifikation erkennbar, deren Rate auf Grund von limitierenden Reaktionskomponenten im weiteren Reaktionsverlauf abnimmt und in ein Plateau übergeht. Der Schwellenwert, der zur Berechnung des CT-Wertes eingesetzt wird, ist als rote Linie dargestellt.

3.1.5.2.5 Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode

Bei der Anwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wird das Expressionslevel eines zu untersuchenden Gens auf die endogene Referenz („housekeeping“-Gen) normiert und in Relation zu einem entsprechenden Kalibrator gesetzt. Die unterschiedliche Expression wird dabei als Regulationsquotient (RQ) mit Hilfe des $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Bei den CT-Werten, welche jeweils als Triplets vorlagen, wurden die Mittelwerte der CT-Werte gebildet. Dann erfolgte die Berechnung des ΔCT -Wertes,

indem jedes zu untersuchende Gen auf das ausgewählte „housekeeping“-Gen bezogen wurde. Der CT-Wert des zu untersuchenden Gens wurde dazu von dem CT-Wert des „housekeeping“-Gens abgezogen. Im Anschluss erfolgte die Berechnung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes, indem der ΔCT -Wert des zu bestimmenden Gens von dem ΔCT -Wertes des Kalibrators subtrahiert wurde. Danach wurde der berechnete $\Delta\Delta CT$ -Wert in folgende Gleichung eingesetzt:

$$RQ = 2^{-(\Delta\Delta CT)}$$

Ein $RQ > 1$ stellte somit eine Hochregulation des untersuchten Gens, ein $RQ < 1$ eine Runterregulation im Vergleich mit dem Kalibrator dar. Aufgrund dessen ist eine quantitative Aussage über die eingesetzten Proben möglich.

3.1.5.2.6 Pipettierschema

Tab. 16: Pipettierschema

Reagenzien	Volumen
„template“	2 μ l
Power SYBR Green PCR Mastermix	5 μ l
„Forward-primer“ (10 pmol)	1 μ l
„Reverse-primer“ (10 pmol)	1 μ l
H ₂ O	1 μ l
Gesamtvolumen:	10 μ l / Well auf einer 384-Well-Platte

3.1.5.2.7 „Real-time“qRT-PCR Ablauf

Enzymaktivierung	95 °C	10 min.
Denaturierung	95 °C	15 sek.
„Annealing“ / „Elongation“	60 °C	1 min.
Dissoziation (Schmelzkurvenanalyse)	95 °C - 60 °C - 95 °C	15 sek. - 15 sek. - 15 sek.

Die beiden Schritte Denaturierung und „Annealing“ / „Elongation“ durchliefen nacheinander 40 Zyklen.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion aus kultivierten Zellen

Zur Proteinextraktion aus kultivierten Zellen wurde zuerst das Medium abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit CMF-PBS gewaschen und mit 200 μ l Lysispuffer / 6 cm Ø Kulturschale benetzt. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und die entstandene Suspension in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß überführt. Dann wurde die Zellsuspension viermal 1 min. mit dem Ultraschall-Homogenisator UW 2070 (s. 2.11) verkleinert. In den Pausen wurde das Lysat immer wieder auf Eis gestellt und zum Schluss bei 20.800 g und 4 °C für 20 min. zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im Überstand und wurden in ein neues Eppendorftube transferiert.

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsermittlung ist das Advanced™ Protein assay Reagenz (s. 2.6.6) in einfacher Konzentration verwendet worden. Dabei wurde der Proteinextrakt 1 : 1000 mit dem Reagenz verdünnt. Die Extinktion wurde anschließend photometrisch bei 590 nm mit dem Ultraspec III Photospektrometer (s. 2.11) gemessen. Die

Proteinkonzentration wird mit der unten genannten Formel berechnet:

Proteinkonzentration in ng / μ l = 30 * Verdünnungsfaktor * Extinktion_{590nm}

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese stellt die effektivste und einfachste Trennmethode für Makromoleküle dar. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die Trennung der Makromoleküle in einem elektrischen Feld nach der Größe. Jene Makromoleküle weisen zudem eine elektrophoretische Beweglichkeit auf. Die Proteine (50 μ g pro Laufspur) wurden in dem SDS-Gel Criterion precast Gel 10 % Tris-HCl (s. 2.6.7) aufgetrennt. Dabei wurde eine konstante Spannung von 100 V an das Gel angelegt. Die Proben wurden 1 : 2 mit dem Laemmli Probenpuffer, welcher den Herstellerangaben entsprechend zuvor mit β -Mercaptoethanol versetzt worden war, verdünnt, 6 min. bei 90 °C erhitzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Es wurden dabei alle Spuren mit der gleichen Proteinmenge beladen. Als Marker wurde der Precision Plus Protein™ Standards Dual Color Marker (s. Anhang) verwendet, als Laufpuffer diente der Tris / Glyzin / SDS Puffer in einfacher Konzentration.

3.2.4 Western-Blot

Der Proteintransfer von dem Gel auf die Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 83 reinforced (s. 2.6.7) wurde bei 450 mA für 3 h in einem Tank Blot Verfahren durchgeführt. Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran (s. 2.6.7) erfolgte im semi-dry Verfahren bei 250 mA für 60 Minuten. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h mit Milchpulver in TBS-T inkubiert. Jene Blockierung führt zur Absättigung unspezifischer, noch nicht besetzter Bindungsstellen der Membran. Die sich auf der Membran befindlichen Proteine sind für eine Vielzahl an Reaktionen zugänglich. Somit ist es möglich, Proteine, die als Antigen von Antikörpern erkannt werden können, auf der Membran zu detektieren und somit die Proteine

immunologisch nachzuweisen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach 5 x 5 min. Waschen der Membran folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Bei der Blockierung der Membran, den Antikörperinkubationen und den Waschvorgängen wurden jeweils 5% Magermilchpulver in TBS-T eingesetzt. Der sekundäre Antikörper ist kovalent an Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt. Die Peroxidase katalysiert die enzymatische Umsetzung eines Chemilumineszenzsubstrats. Die dabei entstehende Fluoreszenz kann mit Hilfe eines Röntgenfilms detektiert werden. Dazu muss die Membran nach wiederum 5 x 5 min. Waschen mit dem Pierce ECL Western Blotting Substrat (s. 2.6.7) behandelt werden. Im Anschluss wurde der Röntgenfilm CL-X Posure™ Film (s. 2.6.7) zusammen mit der behandelten Membran in die Entwicklungskammer Hypercassette™ (s. 2.11) gelegt und nach einer kurzen Belichtungsdauer mit dem OPTIMAX X-Ray Film Processor 1170-1-0000 (s. 2.11) in einer Dunkelkammer entwickelt. Danach wurden dreidimensionale Densitometrien durchgeführt und die „Scans“ mit der ImageQuant imaging software (Molecular Dynamics) analysiert.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Eukaryontische Zellen

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen mit der LaminAir Ha 2446 GS (s. 2.11). Das Phasenkontrastmikroskop Nikon TMS-F (s. 2.11) wurde für die visuelle Überprüfung des Zell-Kultivierungszustandes verwendet.

3.3.2 Kryokonservierung und erneute Kultivierung der Zellen

Für die Langzeitlagerung von Zellen im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen einer konfluenten Schale mit Trypsin abgelöst. Das dabei gewonnene Zellpellet wurde in 10% (v/v) DMSO in FCS resuspendiert. Dann erfolgte eine Überführung der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen und die Zellen wurden bei -20 °C für 2 h gelagert.

Die weitere Lagerung erfolgte im Anschluss bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mind. 12 h, bevor die Zellen in Flüssigstickstoff überführt wurden. Um die Zellen zu revitalisieren, wurden sie zuerst in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad bis zum völligen Auftauen des Mediums inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 755 g für 4 min. zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in frischem vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und in mit Gelatine beschichteten Zellkulturgefäßen ausgesät.

3.3.3 Zellpassage

Um eine normale Wachstumsgeschwindigkeit der ES-Zellen nach erfolgter Kryokonservierung zu erreichen, wurden sie mindestens zweimal nach dem Auftauen passagiert, um die Zellen wieder zu rehabilitieren und die Zellfunktionen zu normalisieren. Eine erneute Zellpassage wurde bei einer Konfluenz von ca. 90 % Zellen durchgeführt. Hierzu wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt und anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmtem CMF-PBS gewaschen. Dann erfolgte eine Zugabe von einer vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung, wobei sich das eingesetzte Volumen nach der Schalengröße richtete. Die Zellen wurden im Brutschrank bis zur vollständigen Ablösung unter mikroskopischer Kontrolle inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch die Zugabe von zwei Volumen eines vorgewärmten serumhaltigen Mediums gestoppt. Daraufhin wurde die sich in der Schale befindliche Zellsuspension auf- und abpipettiert, um möglichst alle Zellen vom Schalenboden abzulösen. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung (s. 3.3.4). Die Zellsuspension wurde bei 755 g für 4 min. zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Zellpellet in frischem vorgewärmtem Medium resuspendiert und $1/3$ der Zellen in einer neuen Schale ausplattiert.

3.3.4 Zellzahlbestimmung

Die Vitalität und Anzahl der Zellen ist mit Hilfe des CASY® Zellzählers (s. 2.11) unter Berücksichtigung des Herstellerprotokolls bestimmt worden.

3.3.5 Kultivierung von murinen E14 Zellen

Die E14 Zellen wurden in Gelatine-beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert. Die Beschichtung der Kulturgefäßböden erfolgte durch Inkubation mit 0,1 % Gelatine in CMF-PBS für mindestens 30 min.. Die Zellen wurden in dem Inkubator Harcell150 (s. 2.11) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 1 bis 2 Tage. Dabei wurde das bestehende Medium abgesaugt. Anschließend sind die Zellen mit vorgewärmtem CMF-PBS vorsichtig gewaschen und zum Schluss durch die Hinzugabe von frischem vorgewärmtem Medium versorgt worden. Um die Differenzierung der Zellen zu hemmen, wurde LIF-Medium bei der Zellkultivierung verwendet.

3.3.6 Generierung der “embryoid bodies” aus E14-Zellen

3.3.6.1 Herstellung der „hanging drops”

Zu Beginn wurden die Wellplatten mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die ES-Zellen trypsiniert, um eine Ablösung der Zellen vom Wellplattenboden zu ermöglichen. Die Zellen wurden anschließend für 3 min. im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension 5 x in einer 1 ml Pipette langsam auf und ab pipettiert, um eine vollständige Ablösung der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss wurden 6 ml LIF-Medium hinzugegeben. Es wurde dann die Zellzahl mit Hilfe des CASY® Zellzählers (s. 3.3.4) bestimmt. Anschließend wurden gleiche Zellmengen auf 6 Falkons aufgeteilt. Es sollten sich dabei 500-700 Zellen in 20 µl Suspension befinden, da alleine dieses Volumen für einen „hanging drop” benötigt wird, um später problemlos die „EBs“ bilden zu können. Daraufhin wurden die 6 Zellgefäße bei 900-1000 rpm für 5 min. zentrifugiert und mit dem jeweiligen Medium resuspendiert. Beim nächsten Schritt wurden die Zellkulturplatten mit 10 ml PBS gefüllt, um ein Austrocknen der „hanging drops” während des Reifungsprozesses der „EBs” zu vermeiden. Im Anschluss wurden die „hanging drops” auf dem Deckel der Zellkulturplatten platziert, so dass sich die benachbarten „hanging drops” nicht berühren konnten (1 „hanging drop” = 20 µl

Zellsuspension). Zuletzt wurde der Deckel mit den „hanging drops“ vorsichtig umgedreht, auf die Zellkulturplatte gesetzt und für 2 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.3.6.2 Ernten der „embryoid bodies“

Nach 2 Tagen wurden die „EBs“, welche in den „hanging drops“ herangereift waren, geerntet. Die Ernte erfolgte indem die „EBs“ vom Deckel der Zellkulturplatten abpipettiert wurden. Anschließend wurden sie in die jeweiligen Medien (jeweils 2,5 ml) überführt. Dann wurden die 6 Wellplatten, welche zuvor nicht mit Gelatine benetzt worden waren, so geschwenkt, dass sich die „EBs“ gleichmäßig auf den Wellplatten verteilen konnten. Bei den „EBs“ wurde täglich das jeweilige Medium gewechselt.

3.3.7 Isolation der neonatalen Kardiomyozyten aus Mäuseherzen

Die neonatale Kardiomyozyten aus neugeborenen Mäusen wurden am postnatalen Tag 1 isoliert. Die Maus wurde mittels einer Schere enthauptet. Umgehend danach wurde das Herz zur weiteren Verarbeitung entnommen. Die Vorhöfe, die Aorta, sowie Reste von Lunge und Thymus wurden mit Hilfe einer kleinen Schere entfernt. Dann wurde das Herz mit DMEM übergossen, um es vor Austrocknung zu schützen und darauf in jeweils zwei große 1mm³ Teile getrennt. Die präparierten Herzstücke wurden daraufhin mit 10 ml SIGMA-Puffer gewaschen und dann eine Verdauung bestehend aus 10 ml SIGMA-Puffer sowie 300 µl Kollagenase und 355 µl Pankreatin hinzugegeben. Die Vorverdauung dauerte 5 min., die Enzymlösung wurde im Anschluss an die Verdauung verworfen. Daraufhin folgten jeweils 5 weitere Verdauungsschritte. Dabei wurden die Gewebsbrocken für 7 min. in einer Verdauungslösung inkubiert und anschließend die Lösung abgenommen, die Enzyme mit 2 ml NCS inaktiviert und die Enzymlösung zentrifugiert. Das sich dabei absetzende Zellpellet wurde in 4 ml NCS aufgenommen. Am Ende wurden alle 5 gesammelten Zellpellets aus den jeweiligen Verdauungsschritten zusammengeführt, in 10 ml des vorbereiteten Plating-Mediums aufgenommen und eine Zellzahlbestimmung durchgeführt (s. 3.3.4). Das Zell-Medium-Gemisch wurde auf eine große Petrischale zum „preseeding“ gegeben. Das

„preseeding“ dauerte dabei mindestens 150 min. und diente dazu, die in dem Zell-Medium-Gemisch befindlichen Fibroblasten von den neonatalen Kardiomyozyten zu trennen. Dabei setzte sich der Großteil der Fibroblasten am Boden ab, während die neonatalen Kardiomyozyten sich weiterhin in der Lösung befanden. Das Medium mit den darin befindlichen neonatalen Kardiomyozyten wurde abgenommen und erneut die Zellzahl bestimmt (s. 3.3.4). Während dessen wurde eine 12-Well-Platte mit Fibronectin beschichtet ($250 \mu\text{l}$ / Well) und für etwa 1 h im Brutschrank inkubiert. Dann erfolgte die Aussät der Zellen. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und durch das „Maintenance“ Medium ersetzt.

3.3.8 Isolation der neonatalen Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Im Rahmen der Vorbereitung zur Isolation von neonatalen Kardiomyozyten aus Rattenherzen, wurden 20 mg / 100 ml Pancreatin und 100-200 Units Kollagenase in Pancreatinlösung gelöst und der pH überprüft. Die präparierten neonatalen Rattenherzen wurden mit DMEM benetzt, auf Eis gesammelt und die Atrien entfernt. Anschließend wurden die Herzen mehrmals mit frischem DMEM gespült und in eine Petrischale mit frischem DMEM überführt. Dort wurden die Herzen mit einem Skalpell in schmale Streifen (1 - 2 mm Stückchen) geschnitten. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Gewebestücke mit 10 ml Pancreatin-Lösung versetzt und die Suspension in einen kleinen Erlenmeyerkolben überführt. Der Kolben wurde in ein Wasserbad gestellt und langsam für 15 min. geschwenkt. Dann wurde die Enzymlösung abgesaugt, verworfen, 10 ml neue Pancreatinlösung hinzugegeben und erneut für 15 min. im Wasserbad geschwenkt. Daraufhin wurde die Lösung ohne Gewebereste in ein 15 ml Falcon überführt und zum dritten Mal 10 ml frische Pancreatinlösung hinzugegeben. Es wurden bis zu 10 Verdauungsschritte durchgeführt bis kaum noch Gewebestückchen sichtbar waren. Zuletzt wurde das 50 ml Falcon mit den gesammelten Zellpellets bei 500 -1000 rpm für 2 - 4 min. zentrifugiert. Für das „Preplating“ wurde das Zellpellet in einer Petrischale mit 10 ml Ham's F12 „Preplating“ Medium resuspendiert. Jener Schritt dauerte dann 1,5 – 3 h. Anschließend wurde dem Pellet das Kulturmedium „Low

glucose“ DMEM-Medium hinzugefügt. Zum Schluss wurden die Zellen gezählt (s. 3.3.4) und nach Wunsch ausplattiert.

3.4 Statistik

Für die Prüfung auf statistische Signifikanz wurde die T-Test-Funktion (Excel, Microsoft®) verwendet. Bei Normalverteilung der Werte wurde zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben der T-Test (ungepaart zweiseitig) mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der G-CSF-Rezeptor und G-CSF mRNAs in murinen embryonalen Stammzellen

Die murinen embryonalen Stammzelllinien Rosa, HM1, C3H und E14 wurden als Monolayer unter differenzierungshemmenden Bedingungen kultiviert und anschließend geerntet (s. 3.3.5). Im weiteren Verlauf wurde die Total RNA aus den Zellen extrahiert (s. 3.1.2), die cDNA synthetisiert (s. 3.1.4) und die G-CSF-R cDNA mit Hilfe der konventionellen RT-PCR (s. 3.1.5.1) anhand eines spezifischen PCR-Produktes (112 bp) in den Rosa, HM1 und C3H ES-Zelllinien sowie in den Positivkontrollen (murines Infarkttherz, murines gesundes Herz und murines Knochenmark) nachgewiesen (**s. Abb.6A**). Der Nachweis der G-CSF-R mRNA bei den E14 ES-Zellen erfolgte anhand eines weiteren spezifischen PCR-Produktes (204 bp) (**s. Abb.6B**). Für den Nachweis der G-CSF-R mRNA wurden zwei verschiedene Primerpaare verwendet (s. 2.7), für die vorab gezeigt worden war, dass die Amplifikate in beiden Fällen spezifisch für den G-CSF-R sind.

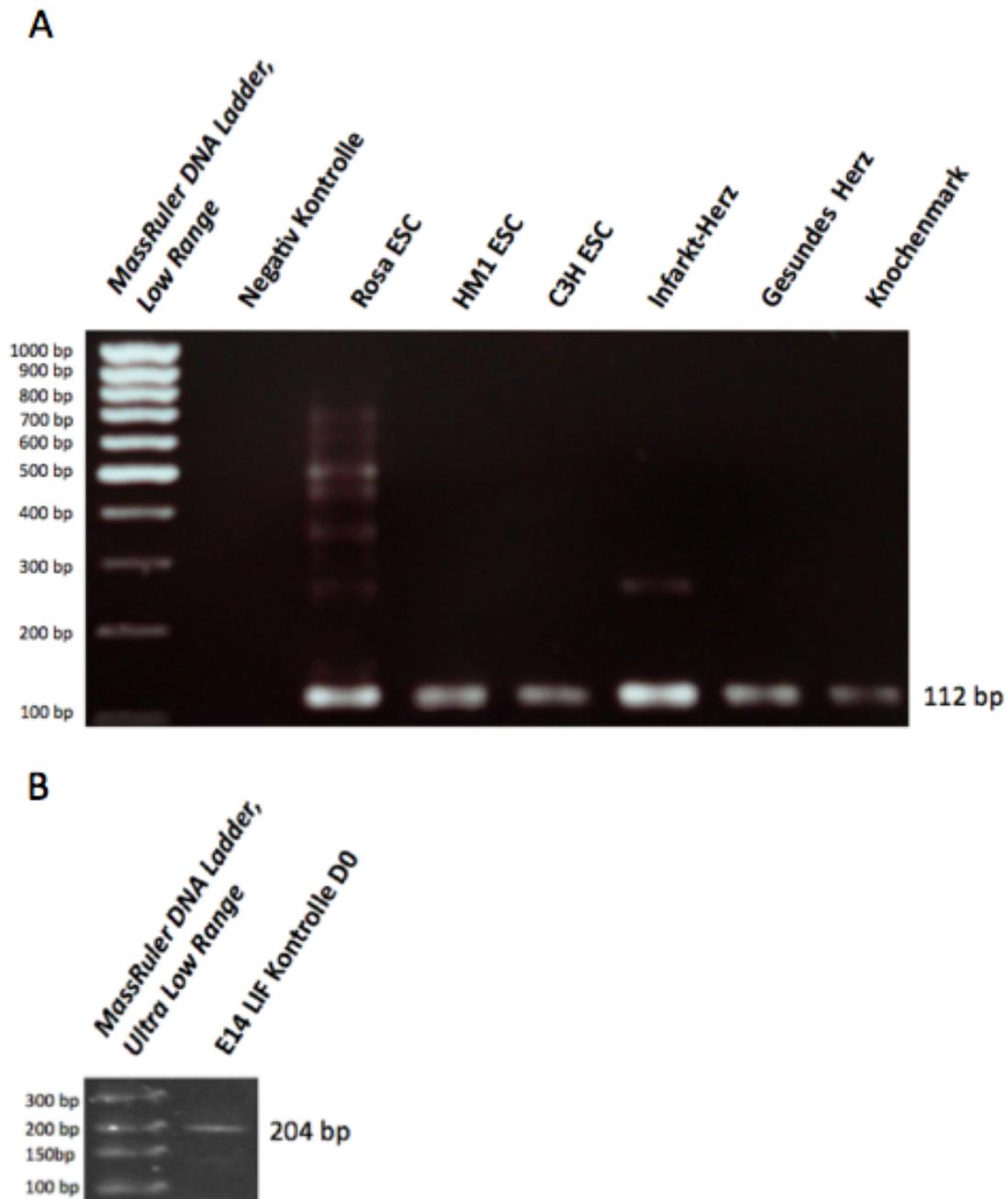


Abb. 6: G-CSF-R-mRNA-Expression in Rosa, HM1, C3H und E14 embryonalen Stammzellen

(A) Es wurden G-CSF-R-PCR-Produkte (112 bp) aus Rosa, HM1 und C3H ES-Zellen (ESC), (B) sowie G-CSF-R-PCR-Produkte (204 bp) aus E14 ES-Zellen cDNA amplifiziert und in Agarosegelen aufgetrennt.

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden ausschließlich E14 Zellen verwendet, da es sich bei diesen, um eine sehr weit verbreitete embryonale

Stammzelllinie handelt. Zunächst wurde untersucht, ob die G-CSF-R mRNA und die seines Liganden G-CSF auch in sich differenzierenden E14 Zellen exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurden „embryoid bodies“ („EBs“) (s. 3.3.6) erzeugt (s. **Abb.7**). Die **Abb.7** zeigt mikroskopische Aufnahmen der undifferenzierten E14-Stammzellen (D0), sowie „EBs“ an Tag 4 (D4), Tag 9 (D9), Tag 13 (D13), Tag 18 (D18) und Tag 20 mit einem umgebenden Zellrasen (D20). In dem beschriebenen Zeitraum wurden in der Mehrzahl der „EBs“ „beating areas“ (spontan kontrahierende Areale) beobachtet, die auf die Differenzierung in Kardiomyozyten hinweisen. Die Ernte der Zellen für die RNA Extraktion erfolgte an den Tagen 0, 8, 13, 14 und 21. Die Total RNA wurde extrahiert (s. 3.1.2) und die cDNA synthetisiert (s. 3.1.4). Im Anschluss wurde eine konventionelle RT-PCR durchgeführt (s. 3.1.5.1) und mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.3) ausgewertet. Die Zellen wurden auf die G-CSF-R-, die G-CSF- und die beta-Aktin-Expression (s. **Abb.8**) hin untersucht. Das G-CSF-R Amplifikat ist 204 bp, das G-CSF Amplifikat 171 bp und das beta-Aktin Amplifikat 141 bp lang (s. **Abb.8**). Die undifferenzierten E14 embryonalen Stammzellen exprimieren das G-CSF-R Gen auf dem mRNA Level. Im Laufe der „EB“ Kultivierung konnten weiterhin die G-CSF-R mRNA und auch die mRNA des Liganden G-CSF eindeutig nachgewiesen werden. Mögliche Einflüsse von exogen appliziertem G-CSF auf die Expression der Gene für G-CSF und seinen Rezeptor können auf der Grundlage der vorliegenden Resultate weder ausgeschlossen noch angenommen werden, da das Experiment nur einmal durchgeführt worden ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das G-CSF / G-CSF-R „signaling“ wahrscheinlich bedeutsam für Prozesse ist, die in „embryoid bodies“ ablaufen. Hierbei könnte es sich z.B. um Differenzierungsprozesse oder Zellproliferation handeln.

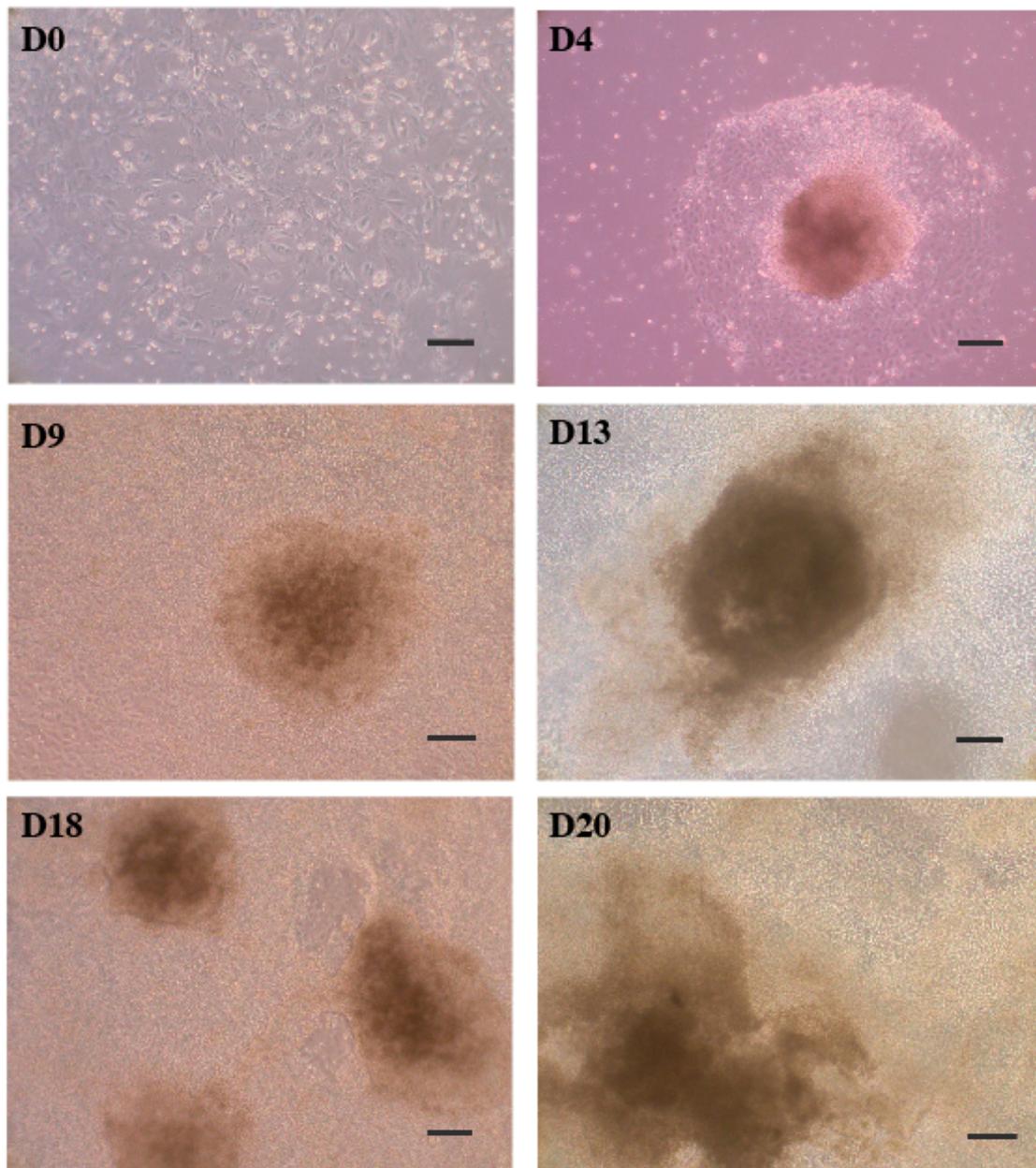


Abb. 7: Aus E14 ES-Zellen gebildete „embryoid bodies“ („EBs“)

Die „EBs“ wurden aus murinen E14 ES-Zellen (D0) mittels der „hanging drops“ Methode generiert. (D4) „EBs“ am Tag 4; (D9) „EBs“ am Tag 9; (D13) „EBs“ am Tag 13; (D18) „EBs“ am Tag 18; (D20) „EBs“ am Tag 20. (D0, D4) Balkenlänge = 45 μm (10x Vergrößerung); (D9, D13, D18, D20) Balkenlänge = 77 μm (20x Vergrößerung).

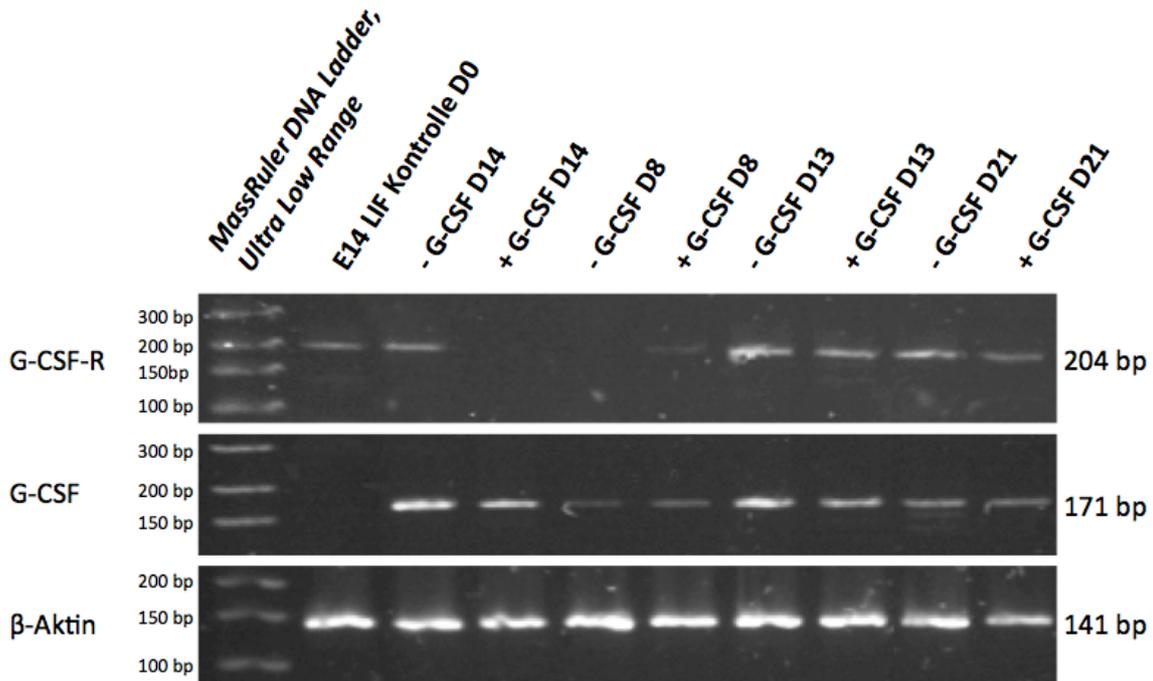


Abb. 8: G-CSF-R, G-CSF und beta-Aktin Expression in „embryoid bodies“

Expression der Gene G-CSF-R (204 bp), G-CSF (171 bp) und beta-Aktin (141 bp) an den Tagen 0, 8, 13, 14 und 21 mit, „(+) G-CSF“, und ohne, „(-) G-CSF“, Behandlung in „embryoid bodies“. Überblick über die G-CSF-R, G-CSF und beta-Aktin Expression während des Differenzierungsprozesses von „EBs“ über einen Versuchszeitraum von 21 Tagen.

4.2 Molekulare Charakterisierung von G-CSF Effekten auf kardiovaskuläre Differenzierung in murinen embryonalen Stammzellen

Bei den durchgeführten Versuchen mit E14 ES-Zellen sollte untersucht werden, ob G-CSF Einflüsse auf Differenzierungs- oder Wachstumsprozesse in kardiovaskulären Zellen oder deren Vorläuferzellen hat. Dazu wurden „embryoid bodies“ mit der „hanging drops“-Methode generiert (s. 3.3.6). Anschließend wurden die „EBs“ in 6 Lochplatten kultiviert und zum einen mit Stammzell-Medium, zum anderen mit Stammzell-Medium + 100 ng / ml G-CSF behandelt. Der Versuch orientierte sich an der Arbeit von Behfar et al. (2007) (9), nur dass in diesem Fall die Effekte von G-CSF anstatt von TNF- α auf ES-Zellen untersucht wurden. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und die Zellen mikroskopisch untersucht. Dabei entwickelten sich die „EBs“

wie in **Abb.7** dargestellt. Während des gesamten Versuchszeitraums konnten „beating areas“ in der Mehrzahl der „EBs“ beobachtet werden. Die „beating areas“ sind ein Indiz für kardiale Differenzierungsprozesse.

Die „EBs“ wurden am Tag 8, 13 und 20 trypsiniert. Im Anschluss wurde die Total RNA aus den Zellen extrahiert (s. 3.1.2). Des Weiteren erfolgte eine cDNA Synthese (s. 3.1.4) und eine anschließende genspezifische Analyse der mRNA-Level mit Hilfe der quantitativen „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2). Als „housekeeping“-Gen wurde beta-Aktin verwendet. **Abb.9** zeigt die CD34-Genexpression, einem Marker für hämopoetische und vaskuläre Differenzierung, in unbehandelten „EBs“ (-G-CSF) und in „EBs“, die mit 100 ng / ml G-CSF inkubiert wurden (+G-CSF), über einen Versuchszeitraum von 20 Tagen (Anzahl der durchgeführten Versuche (n)=3; Mittelwerte im Diagramm dargestellt). Die Referenzprobe (E14 D0) sind undifferenzierte, unbehandelte E14 embryonale Stammzellen am Tag 0. Diese Zellen wurden in LIF-Medium kultiviert, um eine Differenzierung zu unterdrücken (s. 3.3.6). Am Tag 8 exprimierten die unbehandelten und die mit G-CSF behandelten „EBs“ weniger CD34 als die undifferenzierten E14 Zellen (E14 D0). Am Tag 13 und 20 war die CD34 Expression der behandelten und unbehandelten „EBs“ deutlich erhöht, wobei sich keine Unterschiede zwischen unbehandelten und mit G-CSF behandelten „EBs“ zeigten. Die CD34 Expression stieg, wie es für „EBs“ mit zunehmender Kultivierungsdauer zu erwarten ist, an. Es wurden zudem Expressionsanalysen der Gene GATA4, MesP1, Mlc2v, Flk1 und VE-Cadherin mittels „Real-time“qRT-PCR durchgeführt. Die Analyse führte von Experiment zu Experiment zu sehr stark schwankenden und daher nicht signifikanten Ergebnissen. Auch die von der AG Nikol durchgeführten FACS-Analysen (3 Wiederholungen) zeigten sehr stark abweichende und somit nicht signifikante Effekte von G-CSF auf die Häufigkeit der durch die Expression der Oberflächenmarker CD31, CD34 und CD45 identifizierten Zellen. Es kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob G-CSF einen Einfluss auf die E14 ES-Zellen hat.

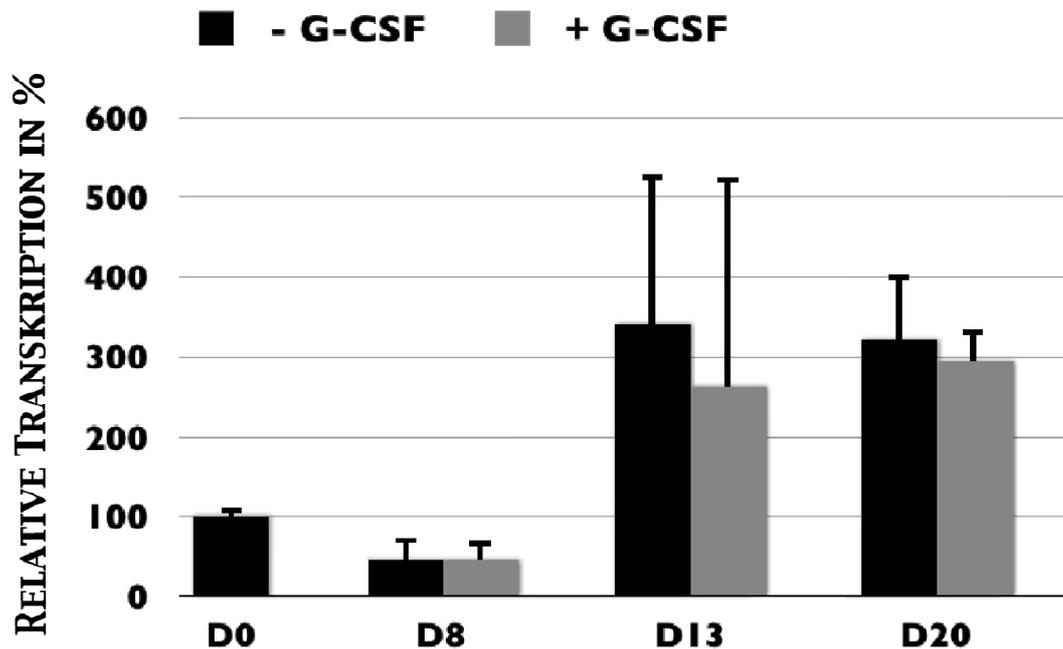


Abb. 9: CD34-Genexpression in „EBs“ über einen Zeitraum von 20 Tagen

Die Zellen wurden am Tag 8 (D8), 13 (D13) und 20 (D20) geerntet und mit Hilfe der „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) analysiert. Dabei wurde die jeweilige CD34 Expression verglichen mit Tag 0 (D0). Es liegt keine Signifikanz zwischen nicht behandelten „EBs“ (-G-CSF) und mit 100 ng / ml G-CSF behandelten „EBs“ (+G-CSF) vor. $p < 0,05$; $n=3$; Y-Achse in %; X-Achse D8, D13; D20 = Tage der Genanalyse; Referenzprobe mit 100% CD34-Expressionlevel sind undifferenzierte E14 ES-Zellen am D0 (E14 D0); „housekeeping“-Gen = beta-Aktin.

4.3 G-CSF-Effekte auf neonatale Kardiomyozyten

4.3.1 Molekularbiologische Analysen von G-CSF Effekten auf neonatale Mauskardiomyozyten

Die neonatalen Kardiomyozyten wurden freundlicherweise durch Herrn Rainer Michaelis und Herrn Dr. med. Sergiu Scobioala aus Mäuseherzen isoliert (s. 3.3.7). Anschließend wurden sie in Kultur genommen und mit G-CSF in einer Konzentration von 100 ng / ml für 24 h behandelt. Die als Kontrolle dienenden neonatalen Kardiomyozyten wurden ausschließlich mit Medium, ohne G-CSF, kultiviert. Nach 24 h wurde die Total RNA extrahiert (s. 3.1.2), die cDNA synthetisiert (s. 3.1.4) und eine

PCR durchgeführt (s. 3.1.5.1). Es wurde gezeigt, dass diese unreifen Kardiomyozyten das G-CSF-R Gen exprimieren (s. **Abb.10**), so dass die Voraussetzung für weiterführende Analysen zum Einfluss von appliziertem G-CSF auf diese Zellen gegeben war.

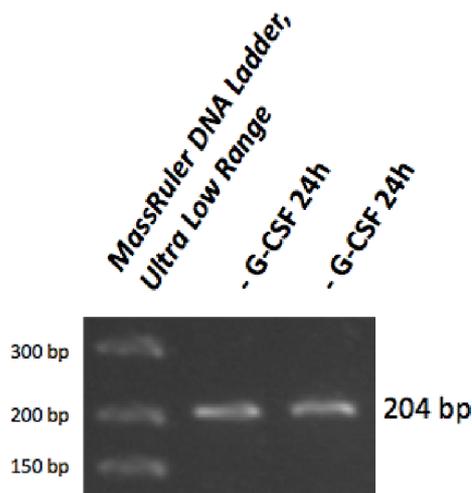


Abb. 10: G-CSF-Rezeptor mRNA Nachweis in murinen neonatalen Kardiomyozyten

Mit Hilfe der PCR (s. 3.1.5) und anschließender Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.3) wurde das G-CSF-R Amplifikat (204 bp) detektiert. Dazu wurde die Total RNA aus den neonatalen Kardiomyozyten isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Die neonatalen Kardiomyozyten wurden ohne G-CSF (-G-CSF) für 24 h *in vitro* kultiviert.

Für die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen zum Einfluss von G-CSF auf die Expression differenzierungsindikativer Gene wurden neonatale Kardiomyozyten mit „Maintenance“ Medium (s. 2.4.1.3) und zusätzlich 100 ng / ml G-CSF, 10 ng / ml „Fibroblast growth factor 2“ (FGF2) oder 10 nM Endothelin 1 (ET1) für 24 h in der Zellkultur behandelt. FGF2 und ET1 wurden dabei als Positivkontrollen eingesetzt. FGF2 ist ein Zytokin, welches die kardiogene Differenzierung *in vivo* und *in vitro* reguliert und bei Kardiomyozyten eine Hypertrophie auslöst (49). ET1 verursacht wie FGF2 eine Hypertrophie und führt somit zu einer erhöhten Genexpression von ANP, Myosin-Heavy-Chain alpha und Myosin-Heavy-Chain beta (62, 93, 100). Als negativ Kontrolle dienten Zellen, die nur in „Maintenance“ Medium ohne weitere Zusätze kultiviert worden waren (s. **Tab.17**). Die Zellen wurden geerntet, die Total RNA extrahiert (s. 3.1.2) und die cDNA synthetisiert (s. 3.1.4). Im Anschluss wurde

mittels „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) die Expression zahlreicher, für die kardiovaskuläre Differenzierung indikativer Gene auf dem RNA-Niveau untersucht. Zudem wurden drei Proben aus neonatalen und drei Proben aus adulten Mäuseherzen als Vergleichsproben im Rahmen der „real-time“ qRT-PCR Experimente mit eingeschlossen, um den Reifungsgrad der neonatalen Kardiomyozyten besser einordnen zu können. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Experimente unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt und statistisch ausgewertet (n=3). Mit Endothelin 1 wurden dagegen nur 2 Versuchsansätze behandelt (n=2), so dass in diesem Fall eine statistische Auswertung mittels des T-Testes nicht möglich war (s. 3.4).

Tab. 17: Behandlung der neonatalen Kardiomyozyten für 24 h mit verschiedenen Medien

Neg. Kontrolle	G-CSF-Behandlung	FGF2- Behandlung	ET 1 Behandlung
„Maintenance“ Medium (s. 2.4.1.3)	„Maintenance“ Medium (s. 2.4.1.3)	„Maintenance“ Medium (s. 2.4.1.3)	„Maintenance“ Medium (s. 2.4.1.3)
Kein Zusatz	100 ng / ml „recombinant“ GCSF	10 ng / ml FGF2	10 nM Endothelin 1

Im Rahmen der „real-time“qRT-PCR Versuche wurden die mRNAs für *Atriales natriuretisches Peptid (ANP)*, *„Braintype natriuretic peptide“ (BNP)*, *„CCAAT-enhancer-binding protein alpha“ (C/EBP-alpha)*, *Connexin43*, *„Myocyte-specific enhancer factor 2C“ (MEF2c)*, *„mesoderm posterior 1“ (MesP1)*, *„myosin light chain 2V“ (Mlc2v)*, *Myosin-Heavy-Chain alpha (MHC alpha)*, *Myosin-Heavy-Chain beta (MHC beta)*, *Nestin*, *Nkx 2.5* und *Yin Yang 1 (YY1)* in den behandelten Zellen in Relation zu denen in der negativ Kontrolle (unbehandelte neonatale Kardiomyozyten) quantifiziert.

Der mRNA-Spiegel des Gens *C/EBP-alpha* (s. **Abb.11**) ist bei der neonatalen Herzprobe um den Faktor 0,36 signifikant erniedrigt (Regulationsquotient (RQ)=0,36 ; $p < 0,05$) und der mRNA-Spiegel der adulten Herzprobe ist im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe um den Faktor 3,33 signifikant erhöht (RQ=3,3). Das mRNA-Level des Gens *Connexin43* (s. **Abb.12**) ist bei der mit G-CSF behandelten Probe signifikant um den Faktor 0,94 erniedrigt (RQ=0,94). Dies entspricht einer Abnahme von 6 % des Expressionslevels im Vergleich zur negativ Kontrolle. Des

Weiteren waren die mRNA-Spiegel der neonatalen und der adulten Herzprobe signifikant um den Faktor 3,96 und den Faktor 10,78 erhöht. Der mRNA-Spiegel des Gens *MEF2c* (s. **Abb.12**) zeigte nach erfolgter G-CSF Behandlung eine signifikante Erniedrigung um den Faktor 0,84 (RQ=0,84) im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe. Zudem war der mRNA-Spiegel der neonatalen Herzprobe um den Faktor 4,15 (RQ=4,15) und das mRNA-Level der adulten Herzprobe auf den Faktor 11,46 (RQ=11,46) signifikant erhöht. Bei dem Gen *MesP1* (s. **Abb.12**) kam es nach 24 h G-CSF Behandlung zu einer signifikanten Runterregulierung des mRNA-Levels (RQ=0,62) im Vergleich zum RNA-Spiegel der Kontrollprobe. Auch nach FGF2 Applikation zeigte sich eine signifikante Reduktion des *MesP1* Transkriptionslevels (RQ=0,47). Unter Endothelin 1 Behandlung erniedrigte sich das mRNA-Level um den Faktor 0,65 im Vergleich zur Kontrollprobe. Die mRNA-Spiegel der neonatalen und adulten Herzprobe waren signifikant um den Faktor 0,05 und 0,02 erniedrigt. Der mRNA-Spiegel des Gens *Mlc2v* (s. **Abb.13**) war bei der neonatalen Herzprobe signifikant um den Faktor 17,64 und bei der adulten Herzprobe signifikant um den Faktor 90,36 erhöht. Für *Myosin-Heavy-Chain alpha* (s. **Abb.13**) wurden signifikant erhöhte mRNA-Niveaus bei neonatalem Herz (RQ=9,54) und bei adultem Herz (RQ=52,54) detektiert. Der mRNA-Spiegel von *Myosin-Heavy-Chain beta* (s. **Abb.13**) wurde signifikant unter G-CSF Behandlung (RQ=0,85) runterreguliert, welches einer Transkriptionsabnahme von 15 % im Vergleich zur Kontrollprobe entspricht. Die mRNA-Spiegel der neonatalen und adulten Herzprobe wurden jeweils um den Faktor 11,17 und den Faktor 55,48 signifikant erhöht. Der mRNA-Spiegel des Gens *Nkx 2.5* (s. **Abb.14**) zeigte eine signifikante Hochregulierung der neonatalen (RQ=5,81) und adulten Herzprobe (RQ=11,51). Das Gen *YY1* (s. **Abb.14**) hatte bis auf die signifikante Hochregulierung des mRNA-Spiegels der adulten Herzprobe um den Faktor 2,44, gleich bleibende Transkriptionslevel bei der Kontroll-, bei der neonatalen Herzprobe und bei den mit G-CSF, FGF2 und Endothelin 1 behandelten neonatalen Kardiomyozyten. Dagegen konnten keine signifikanten Veränderungen des mRNA-Niveaus für die Gene *ANP* (s. **Abb. 11**), *BNP* (s. **Abb. 11**) und *Nestin* (s. **Abb. 14**) im Vergleich zum mRNA-Niveau der unbehandelten Kontrollprobe nachgewiesen werden.

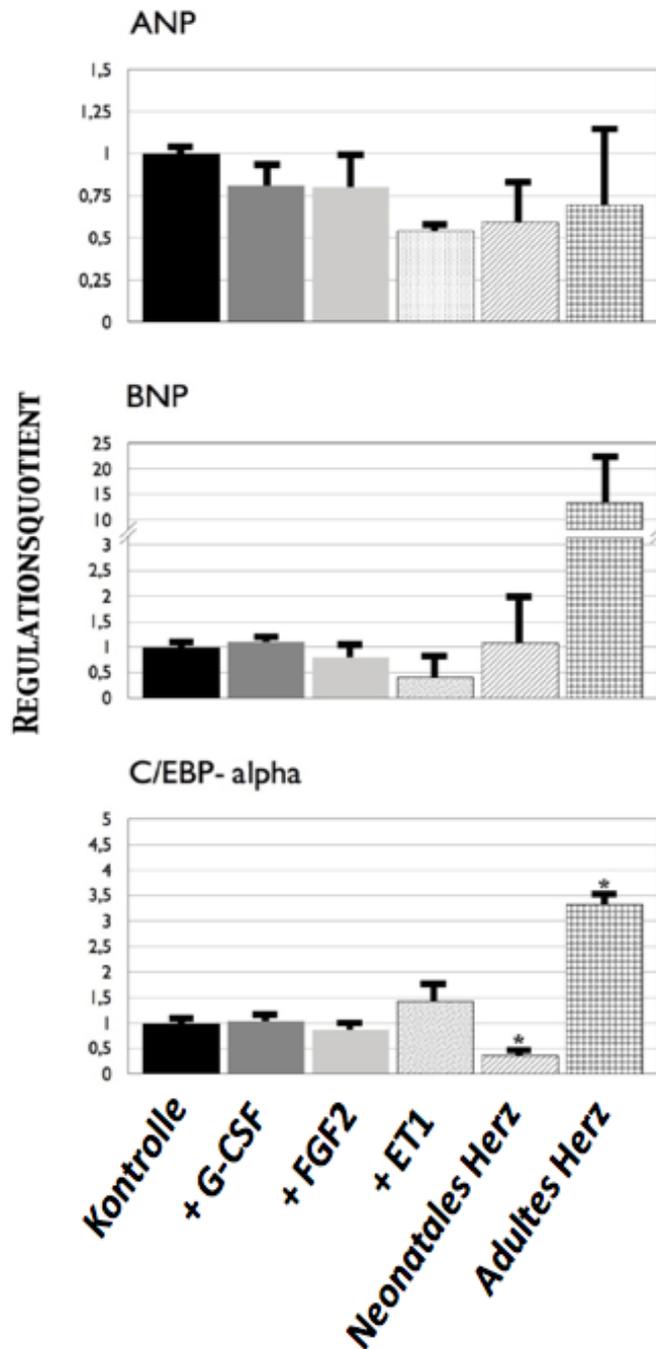


Abb. 11: Vergleichende Quantifizierung der ANP, BNP und C/EBP-alpha mRNAs

Verwendeter Zelltyp: murine neonatale Kardiomyozyten; Nach 24-stündiger Inkubation mit G-CSF, FGF2 und Endothelin 1 (ET1) wurden per „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) die relativen mRNA-Niveaus für ANP, BNP und C/EBP-alpha ermittelt. Referenzprobe mit 1,0 Regulationsquotient (RQ) sind unbehandelte neonatale Kardiomyozyten; Y-Achse als RQ (Heraufregulierung>1; Herunterregulierung<1); X-Achse mit den behandelten Proben; „housekeeping“-Gen = Cyclophilin A; p<0,05; n=3, mit ET1 nur n=2, *=statistisch signifikant unterschiedlich von Kontrolle

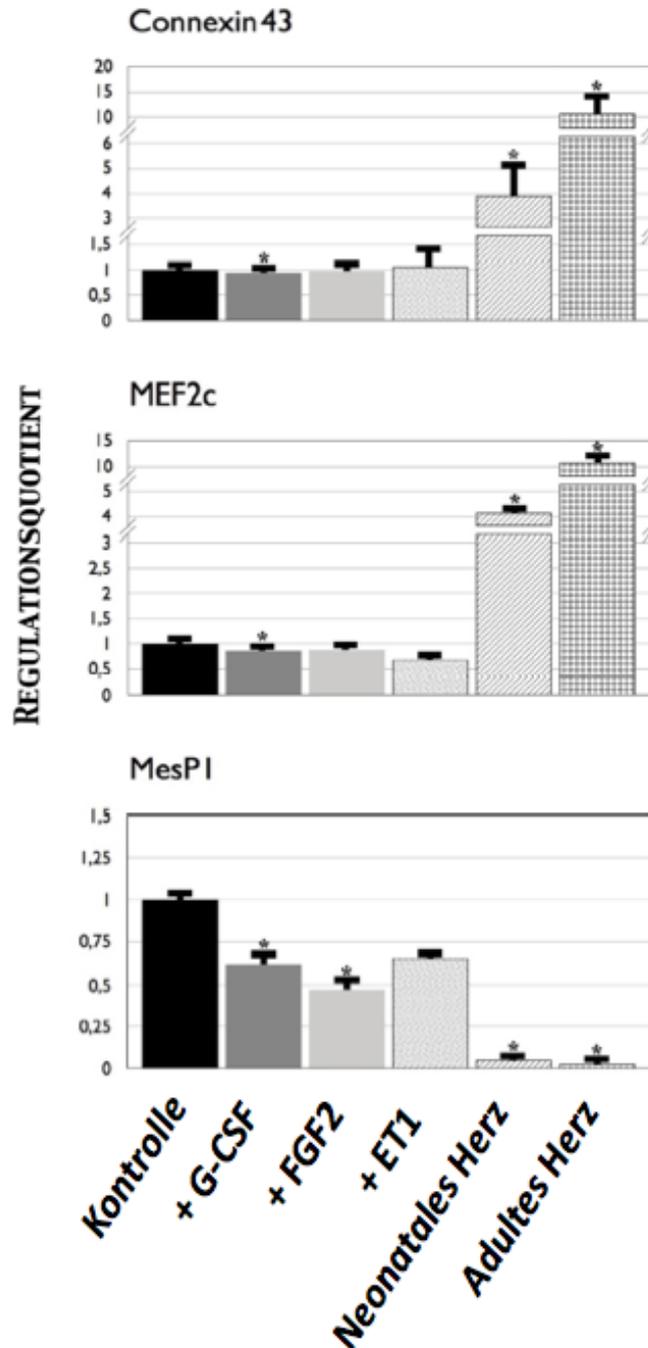


Abb. 12: Vergleichende Quantifizierung der Connexin43, MEF2c und MesP1 mRNAs

Verwendeter Zelltyp: murine neonatale Kardiomyozyten; Nach 24-stündiger Inkubation mit G-CSF, FGF2 und Endothelin 1 (ET1) wurden per „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) die relativen mRNA-Niveaus für Connexin43, MEF2c und MesP1 ermittelt. Referenzprobe mit 1,0 Regulationsquotient (RQ) sind unbehandelte neonatale Kardiomyozyten; Y-Achse als RQ (Heraufregulierung > 1; Herunterregulierung < 1); X-Achse mit den behandelten Proben; „housekeeping“-Gen = Cyclophilin A; p < 0,05; n = 3, mit ET1 nur n = 2, * = statistisch signifikant unterschiedlich von Kontrolle

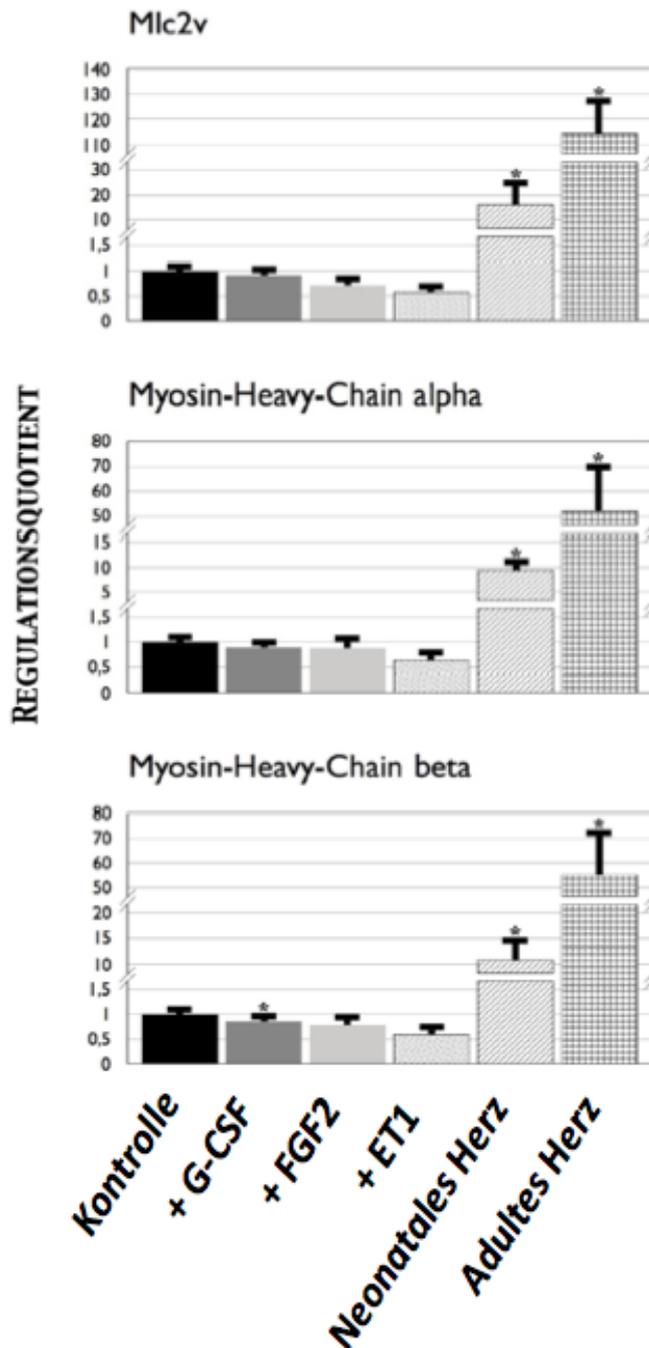


Abb. 13: Vergleichende Quantifizierung der Mlc2v, MHC alpha und MHC beta mRNAs

Verwendeter Zelltyp: murine neonatale Kardiomyozyten; Nach 24-stündiger Inkubation mit G-CSF, FGF2 und Endothelin 1 (ET1) wurden per „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) die relativen mRNA-Niveaus für Mlc2v, MHC alpha und MHC beta ermittelt. Referenzprobe mit 1,0 Regulationsquotient (RQ) sind unbehandelte neonatale Kardiomyozyten; Y-Achse als RQ (Heraufregulierung>1; Herunterregulierung<1); X-Achse mit den behandelten Proben; „housekeeping“-Gen = Cyclophilin A; p<0,05; n=3, mit ET1 nur n=2, *=statistisch signifikant unterschiedlich von Kontrolle

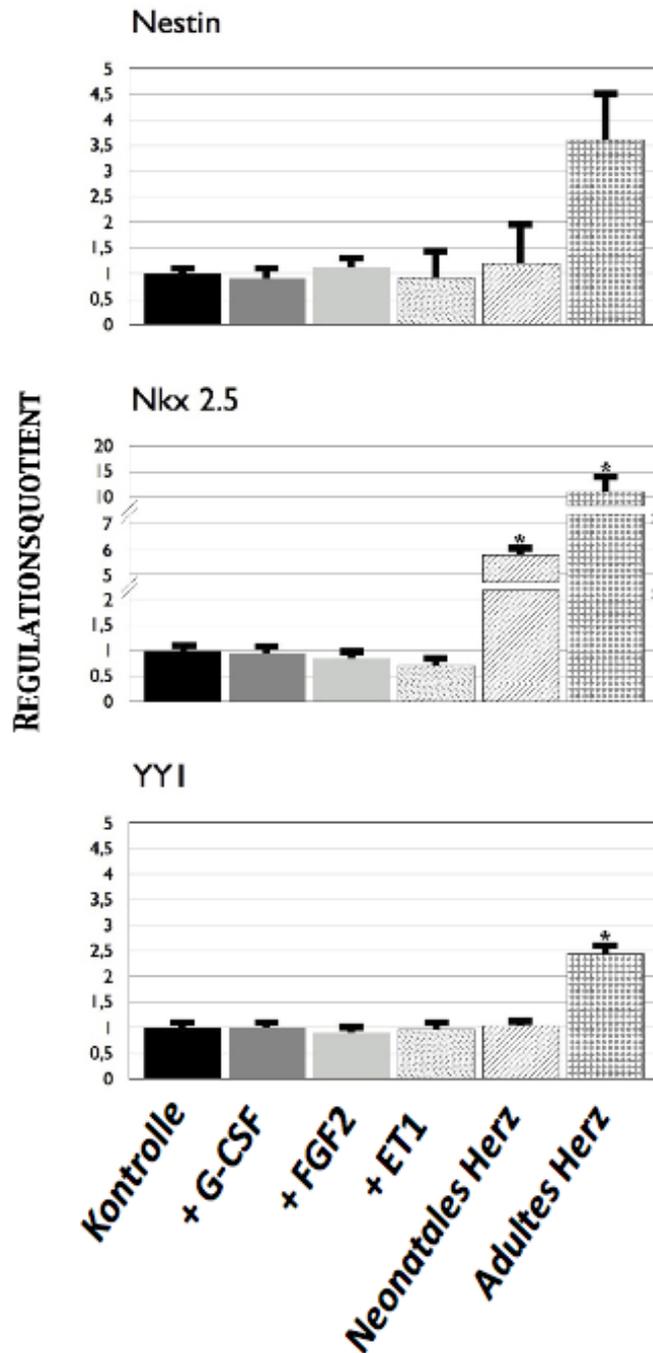


Abb. 14: Vergleichende Quantifizierung der Nestin, Nkx 2.5 und YY1 mRNAs

Verwendeter Zelltyp: murine neonatale Kardiomyozyten; Nach 24-stündiger Inkubation mit G-CSF, FGF2 und Endothelin 1 (ET1) wurden per „real-time“qRT-PCR (s. 3.1.5.2) die relativen mRNA-Niveaus für Nestin, Nkx 2.5 und YY1 ermittelt. Referenzprobe mit 1,0 Regulationsquotient (RQ) sind unbehandelte neonatale Kardiomyozyten; Y-Achse als RQ (Heraufregulierung >1; Herunterregulierung <1); X-Achse mit den behandelten Proben; „housekeeping“-Gen = Cyclophilin A; $p < 0,05$; $n=3$, mit ET1 nur $n=2$, *=statistisch signifikant unterschiedlich von Kontrolle

4.3.2 Proteinbiochemische Analysen von G-CSF Effekten auf neonatale Rattenkardiomyozyten

Für proteinbiochemische Untersuchungen wurden unreife Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen isoliert (s. 3.3.8), in Kultur genommen und anschließend mit 100 nM G-CSF für 24 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Proteine extrahiert (s. 3.2.1). Die weitere Analyse der Proben erfolgte mittels des Western-Blot-Verfahrens (s. 3.2.4). Die Experimente wurden zusammen mit Herrn Dr. med. Sergiu Scobioala durchgeführt. Dabei wurden *in vitro* mit G-CSF behandelte (+G-CSF) und unbehandelte (-G-CSF) neonatale Rattenkardiomyozyten auf die Spiegel von nicht-phosphoryliertem (Cx43-NP) und phosphoryliertem (Cx43-P) Connexin43 hin untersucht (s. **Abb.15**). Die Spiegel für Connexin43 waren nach G-CSF Applikation im Vergleich zur unbehandelten Probe (Kontrolle) verringert. Die Abnahme der Spiegel der mit G-CSF behandelten Zellen waren in Bezug auf die Kontrollprobe (100 %) bei dem Cx43-P mit 47 % stärker ausgeprägt als bei dem Cx43-NP mit 29 %. Die phosphorylierten Connexin43 Formen wiesen eine Masse von 46 kDa und 45 kDa, das nicht-phosphorylierte Connexin43 eine von 42 kDa auf. Die beschriebene Connexin43-Expressionsminderung ist konform mit dem reduzierten mRNA-Niveau des Connexin43 Gens (s. **Abb.12**). Im Rahmen eines weiteren Westernblots (s. **Abb.16**) wurden mit G-CSF behandelte (+G-CSF) und unbehandelte (-G-CSF) neonatale Rattenkardiomyozyten (*in vitro*) auf die Expression des „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA) , mit einer Masse von 35 kDa, hin untersucht. Dabei wurde PCNA bei den mit G-CSF behandelten (+G-CSF) Zellen nachgewiesen.

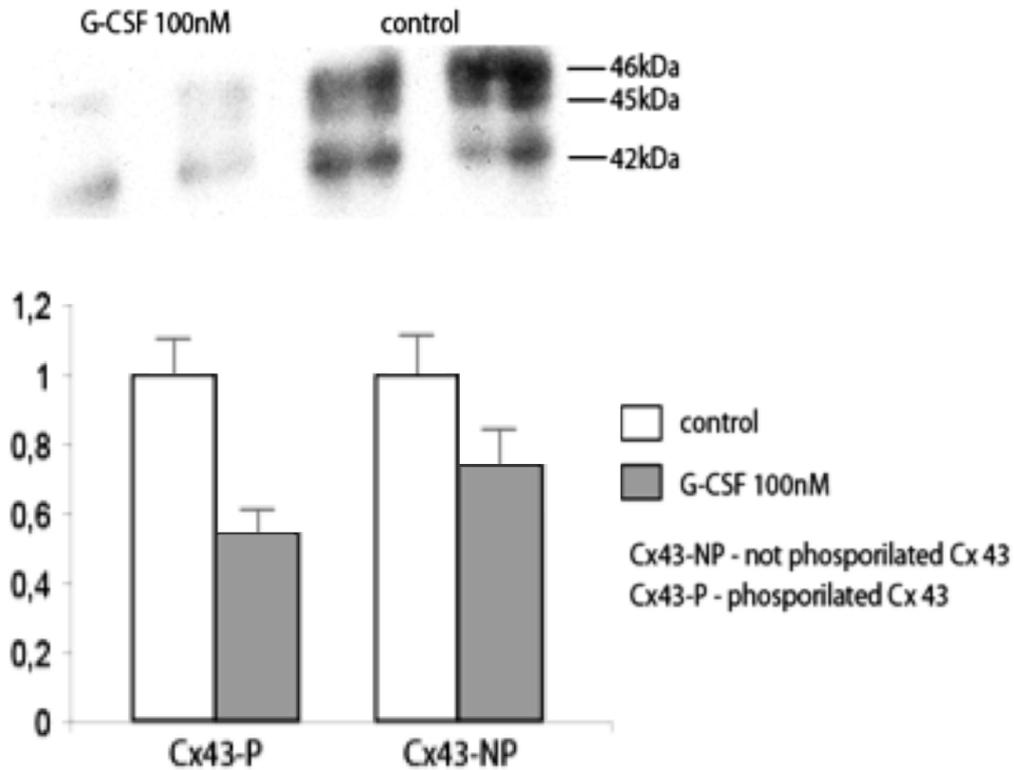


Abb. 15: Westernblot Nachweis von phosphoryliertem Cx43 und nicht-phosphoryliertem Cx43

Einfluss von G-CSF auf die Expression von phosphoryliertem (Cx43-P; 46 kDa und 45 kDa) und nicht-phosphoryliertem Connexin43 (Cx43-NP; 42 kDa) in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Zellen waren zuvor in vitro für 24 h mit und ohne G-CSF (100 nM) behandelt worden. Gel: SDS-Gel Criterion precast Gel 10 % Tris-HCl; Marker: Precision Plus Protein™ Standards Dual Color Marker (s. Anhang)

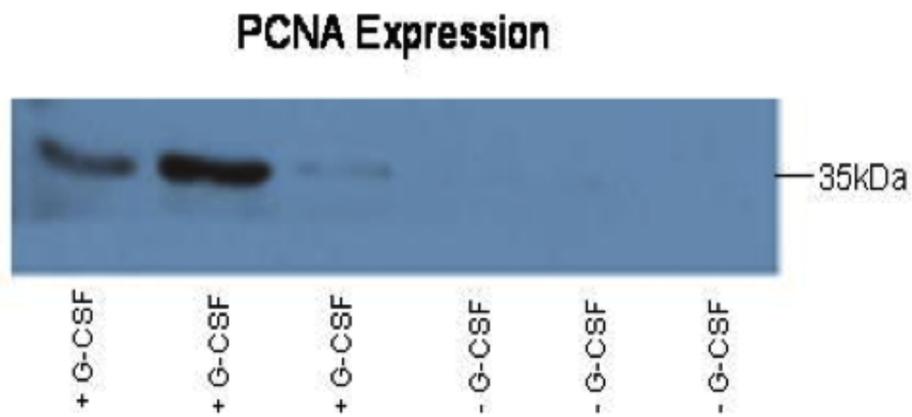


Abb. 16: Westernblot Nachweis von PCNA

Einfluss von G-CSF auf die Expression von PCNA. Die neonatale Rattenkardiomyozyten waren *in vitro* 24 h mit 100 nM G-CSF behandelt worden. Gel: SDS-Gel Criterion precast Gel 10 % Tris-HCl; Marker: Precision Plus Protein™ Standards Dual Color Marker (s. Anhang)

5. Diskussion

5.1 G-CSF-Rezeptor und G-CSF Expression in embryonalen Stammzellen und daraus abgeleiteten „embryoid bodies“

Das Zytokin G-CSF ist aufgrund seiner mobilisierenden Wirkung auf Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarks (89) im Rahmen tierexperimenteller Arbeiten (23, 55, 79) sowie klinischer Studien (42, 44) zur Therapie des infarktbedingt insuffizienten Herzens eingesetzt worden. Seine dabei nachgewiesenen positiven Wirkungen auf Struktur und Funktion des geschädigten Herzens können einerseits auf parakrine Effekte, der vermehrt in den Herzen zu findenden, knochenmarkabstammenden Zellen zurückzuführen sein (51). Andererseits sind aufgrund der Expression des G-CSF Rezeptors in allen bedeutenden kardialen Zelltypen, einschließlich der kardialen Stammzellen sowie der Kardiomyozyten, auch direkte regenerative Effekte des Zytokins auf das Herz möglich (11, 23, 33, 55). Embryonale Stammzellen bzw. daraus abgeleitete „embryoid bodies“ sollten in dieser Arbeit als Modellsystem eingesetzt werden, um das Potential von G-CSF auf kardiovaskuläre Differenzierungs- und Reifungsprozesse untersuchen zu können.

Es konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, dass die murinen embryonalen Stammzelllinien E14, Rosa, HM1 und C3H die G-CSF und die G-CSF-R mRNA exprimieren (s. **Abb.6A / 6B**). Für die Organe bzw. Gewebe murines Infarkt-Herz, normales Mäuseherz und murines Knochenmark wurde bereits demonstriert, dass sie G-CSF sowie den G-CSF-R exprimieren (55). Die daraus isolierten RNA-Proben dienen demnach als Positivkontrolle.

Die weiterführenden Versuche mit den „embryoid bodies“ wurden mit der Zelllinie E14 durchgeführt (s. **Abb.6B**). Mit dem Nachweis der Expression der G-CSF-R mRNA in E14 ES-Zellen und aus E14 ES-Zellen generierten „embryoid bodies“ ist eine Grundvoraussetzung für die weiterführenden Untersuchungen von G-CSF Effekten auf embryonale Stammzellen gegeben. Zudem exprimieren die zu untersuchenden „EBs“ auch den Liganden G-CSF, so dass anzunehmen ist, dass die G-CSF-R vermittelte Signaltransduktion bei bislang nicht identifizierten Prozessen in „EBs“ eine Rolle spielt.

Weiterhin wurden ab dem Versuchstag 5 zahlreiche „beating areas“, die indikativ für Differenzierung in Kardiomyozyten sind, und Gefäßneubildungen beobachtet.

Die CD34 Expression, welche einen Nachweis für ablaufende Differenzierung darstellt, steigerte sich kontinuierlich bis Tag 13 und blieb dann bis zum Tag 20 der Versuche annähernd konstant (s. **Abb.9**). He et al. (2004) beschrieben in ihrer Veröffentlichung, dass murine E14.1 ES-Zellen ein CD34 Expressionsmaximum am Tag 12 aufwiesen (34). Levenberg et al. veröffentlichten im Jahre 2007 Daten, welche belegen, dass bei humanen „EBs“ der CD34 Expressionshöhepunkt sich um den Tag 13 des Differenzierungsprozesses befindet (61). Demnach haben sich die „embryoid bodies“ wie zu erwarten normal entwickelt und stehen somit als ein valides Modellsystem für weiterführende Versuche zur Verfügung.

5.2 Keine durch G-CSF induzierten differenzierungsfördernden Effekte auf „embryoid bodies“ nachweisbar

Obwohl die Eignung des „embryoid body“ Modellsystems durch die zuvor erwähnten Befunde (s. 5.1) bereits geklärt worden ist, konnten keine G-CSF Effekte nachgewiesen werden. Die Versuche mit den G-CSF behandelten „EBs“ im Vergleich zu den Kontroll-„EBs“, zeigten insgesamt keine signifikanten Effekte des Zytokins, welche auf eine Beeinflussung kardiovaskulärer Differenzierungsprozesse hindeuten. D.h. es konnten keine signifikanten Expressionsveränderungen der Gene CD34, GATA4, MesP1, Mlc2v, Flk1 und VE-Cadherin bei den mit G-CSF-behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gezeigt werden. Des Weiteren war keine erkennbare Steigerung der Häufigkeit oder der Größe der „beating areas“ zu beobachten.

Im Unterschied zu dieser Arbeit konnten Shimoji im Jahre 2010 G-CSF Effekte während der Embryogenese und auf mehrere ES-Zelllinien nachweisen (90). Sie zeigten vorab, dass der Ligand G-CSF und der G-CSF Rezeptor sowohl in EB3 ES-Zellen als auch in den daraus generierten „embryoid bodies“ exprimiert werden (90). Zudem demonstrierten sie, dass 50% der G-CSF-R „KO“-Mäuse während der späten Embryonalentwicklung starben. Ferner wurden zahlreiche Herzfehler, wie z.B. eine deutliche Abnahme des atrioventrikulären Wanddurchmessers, im Vergleich zu den

„wild-type“ Mäusen festgestellt (90). Das G-CSF / G-CSF-R „signaling“ scheint also eine bedeutende Rolle für die während der Embryogenese ablaufenden kardialen Differenzierungsprozesse zu spielen (90). Außerdem wiesen Shimoji et al. nach, dass eine G-CSF Applikation zu einer verstärkten Proliferation von aus murinen EB3 ES-Zellen, aus einer primaten ES-Zelllinie und aus „induced pluripotent stem cells“ („iPSCs“) abgeleiteten Kardiomyozyten führte (90). Dabei wurden die ES-Zellen mit einer Konzentration von 0,75 ng / ml G-CSF behandelt, da sich jene Konzentrationen in Vorversuchen als diejenige herausstellte, welche den besten kardialen Proliferationseffekt bewirkte (90). G-CSF Konzentrationen von 75 ng / ml zeigten bereits einen deutlich abgeschwächten kardialen Proliferationseffekt (90). Das Ausbleiben von G-CSF Effekten auf „EBs“ im Rahmen dieser Arbeit könnte deshalb zum einen durch die deutlich höhere verwendete G-CSF Konzentration von 100 ng / ml im Vergleich zu 0,75 ng / ml bei Shimoji et al. erklärt werden (90). Zum anderen wurden unterschiedliche murine ES-Zelllinien verwendet, nämlich E14 anstatt EB3. Die bei den Experimenten verwendeten E14 ES-Zellen könnten ferner eine höhere endogene G-CSF Produktion aufweisen und somit im Gegensatz zu den EB3 ES-Zellen nicht auf extern appliziertes G-CSF reagieren. In Zukunft müssen weitere Versuche zeigen, ob sich die Ergebnisse von Shimoji et al. reproduzieren lassen (90).

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben von G-CSF Effekten wäre, dass sie durch eine endogene Autostimulation verhindert werden (**s. Abb.8**). Auch im Organismus wird endogen G-CSF produziert, wie zahlreiche Publikationen belegen. Bereits Kuhlmann et al. beschrieben im Jahre 2006 eine Steigerung der lokalen G-CSF Expression nach induziertem Myokardinfarkt und äußerten die Vermutung, dass das Vorhandensein von endogenem G-CSF kardioprotektive Effekte vermitteln könnte (55). Um nachhaltig klären zu können, ob bei den „EBs“ aus E14 ES-Zellen eine endogene Autostimulation mit G-CSF vorliegt, müssten weitere Versuche mit embryonalen Stammzellen aus G-CSF „knock out“ („KO“) Mäusen (63) und aus G-CSF-R KO Mäusen (35) durchgeführt werden. Demnach kann die Frage, ob eine G-CSF Applikation Einfluss auf die Differenzierung von embryonalen Stammzellen hat oder eine endogene Autostimulation der ES-Zellen durch G-CSF vorliegt, zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig geklärt werden.

5.3 G-CSF-Effekte auf neonatale Kardiomyozyten

Harada et al. konnten 2005 den G-CSF-R auf neonatalen Rattenkardiomyozyten detektieren und wiesen nach, dass eine Behandlung mit dem G-CSF Zytokin zur dosisabhängigen Aktivierung von Jak2, STAT1 und 3 führt (33). Der Expressionsnachweis des G-CSF-R in murinen neonatalen Kardiomyozyten konnte in dieser Arbeit reproduziert werden (s. **Abb.10**).

Im Rahmen der Genexpressionsanalysen mittels „real-time“qRT-PCR (s. **Abb.11 / 12 / 13 / 14**) wurden die murinen neonatalen Kardiomyozyten neben G-CSF mit FGF2 und ET1 behandelt. FGF2 und ET1 sollten dabei als Positivkontrolle dienen. FGF2 ist ein Zytokin, welches die kardiogene Differenzierung in vivo und in vitro reguliert und bei Kardiomyozyten eine Hypertrophie auslöst (49). ET1 verursacht wie FGF2 eine Hypertrophie und führt somit zu einer erhöhten Genexpression von ANP, Myosin-Heavy-Chain alpha und Myosin-Heavy-Chain beta (62, 93, 100). Die Behandlung der Zellen mit FGF2 und ET1 führte nicht zu den erwarteten Effekten, wobei unklar ist, warum diese unter den gewählten Versuchsbedingungen (24-stündige 10 ng / ml FGF2 bzw. 10 nM ET1 Inkubation) nicht aufgetreten sind, denn Kardami et al. (49) und Li et al. (62) konnten eine Hypertrophie der Zellen bei gleicher Inkubationsdauer und FGF2 bzw. ET1 Konzentration nachweisen.

Bei den Genen BNP (21), C/EBP-alpha (71), Mlc2v (31) und Nestin (72), welche dafür bekannt sind, dass sie bei ablaufenden kardialen Differenzierungsprozessen hochreguliert werden, konnten keine nennenswerten Veränderungen der mRNA-Niveaus detektiert werden (s. **Abb.11 / 12 / 13 / 14**). Das Gen BNP ist für die Steuerung der Volumen-Homeostase zuständig und wird in der Medizin als ein Marker für Herzversagen eingesetzt (21). C/EBP-alpha ist ein Transkriptionsfaktor, welcher Einfluss auf das Zellwachstum nimmt (71). Mlc2v beeinflusst Signaltransduktionswege, welche für die embryonale Herzentwicklung essentiell sind (31). Eine Expression der Mlc2v mRNA liegt dabei ausschließlich in den Herzkammern vor (31). Nestin ist ein Marker für ablaufende Differenzierungsprozesse in Progenitor- / Precursorzellen aller drei Keimblätter (48, 72, 76).

Im Rahmen der „real-time“qRT-PCR Experimente wurden das Gen MesP1, welches

einen frühen Marker für kardiale Progenitorzellen darstellt (14), das Gen MEF2c, bei dem es sich um einen frühzeitigen Kardiomyozytentranskriptionsfaktor handelt (15), und das Gen Nkx 2.5, welches einen weiteren Marker für kardiale Progenitorzellen darstellt (15), untersucht. MesP1 wird dabei zeitlich gesehen als erstes, MEF2c als zweites und Nkx 2.5 als letztes reguliert (10, 22, 64, 86). In den Versuchen kam es zur signifikanten Minderung der mRNA-Spiegel für die Gene MesP1 und MEF2c bei mit G-CSF behandelten neonatalen Kardiomyozyten (s. **Abb.12**). Bei dem Nkx 2.5 mRNA-Spiegel zeigte sich eine nicht signifikante Expressionsminderung (s. **Abb.14**). Die mRNA-Niveaus der Positivkontrollen FGF2 und ET1 sind bei MesP1, MEF2c und Nkx 2.5 im Vergleich mit dem mRNA-Spiegel der unbehandelten neonatalen Kardiomyozyten reduziert. Folgende Erklärungen könnten hierfür in Betracht kommen: Zum einen könnte G-CSF die Differenzierung einer Subpopulation relativ unreifer Zellen, welche bei der Gewinnung der neonatalen Kardiomyozyten mitisoliert worden sind (s. 3.3.8) und die diese Marker (MesP1, MEF2c und Nkx 2.5) exprimieren, begünstigen, so dass der relative Anteil dieser Marker abnimmt. Zum anderen könnte G-CSF in der hohen Dosis, wie es appliziert worden ist, programmierten Zelltod (Apoptose) präferenziell bei dieser unreifen kardialen Subpopulation induziert haben (103). Weiterhin könnte G-CSF eine Dedifferenzierung der Subpopulation dieser Zellen in die Richtung noch unreifer Zellen bewirkt haben, welche diese Marker "noch nicht" exprimiert haben. Zudem könnte die G-CSF Behandlung den positiven Anteil der Zellen, welcher die Marker exprimiert, reduzieren, indem es die Proliferation reiferer Zellen, die diese Marker nicht mehr exprimieren, begünstigt.

Kuhlmann et al. beobachteten im Jahre 2006 im Mausmyokardinfarktmodell eine Kardiomyozytenhypertrophie nach G-CSF Applikation (55). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Expression des Gens YY1 (s. **Abb.14**), welches einen Marker (negativen Indikator) für Hypertrophie darstellt und als Transkriptionsfaktor die Myosin-Heavy-Chain (MHC) alpha Expression herunterreguliert (66, 67, 92), bei neonatalen Kardiomyozyten untersucht. YY1 zeigte bis auf das mRNA-Niveau der adulten Herzprobe keine Transkriptionsveränderungen im Vergleich zum mRNA-Niveau der unbehandelten neonatalen Kardiomyozyten. Die MHC alpha Genexpression ist nach G-CSF Applikation außerdem nicht signifikant beeinflusst worden (s. **Abb.13**). Dagegen

wies das Gen MHC beta nach G-CSF Gabe im Vergleich zur Kontrolle eine minimal signifikante Expressionsabnahme auf (**s. Abb. 13**). Im Herzen finden sich zwei Myosin-Heavy-Chain (MHC) Isoformen, MHC alpha und MHC beta (67). Ihre Expressionslevel ändern sich während der Herzentwicklung und bei Erkrankungen des Herzens (67). Eine reduzierte MHC alpha Expression, die z.B. bei einer Kardiomyopathie auftritt, wird mit einer verringerten Herzkontraktilität in Verbindung gesetzt. Da MHC alpha eine deutlich stärkere Herzmuskelkontraktion als MHC beta ermöglicht (67), ist im Menschen eine MHC alpha Expressionserhöhung mit einer Verbesserung der Funktion des linken Ventrikels assoziiert (92). Bei Ratten konnte durch eine gesteigerte physiologische Betätigung eine Steigerung der MHC alpha Expression und eine Verringerung der MHC beta Expression erreicht werden, so dass die entstandene Hypertrophie mit einer gesteigerten kardialen Kontraktilität in Verbindung gesetzt wird (92). Insgesamt ist aber davon auszugehen, dass G-CSF bei den untersuchten neonatalen Kardiomyozyten wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Hypertrophie dieser Zellen gehabt hat. Das Ausbleiben der Hypertrophie bei den Positivkontrollen legt den Schluss nahe, dass weitere Untersuchungen durchgeführt werden sollten, um die genannte Vermutung eindeutig zu verifizieren.

Kuhlmann et al. fanden im Jahre 2006 zudem Beweise dafür, dass G-CSF die Connexin43 Expression beeinflussen könnte (55). Die Arbeitsgruppe zeigte, dass G-CSF die infarktbedingte Reduktion der Connexin43 Expression in der Infarkttrandzone partiell hemmt (55). Jenes Ergebnis ist vermutlich die molekulare Ursache der verminderten Arrhythmieneigung von Infarkt Herzen G-CSF-behandelter Mäuse (55).

Deshalb wurden in dieser Arbeit die neonatale Kardiomyozyten auf Connexin43 Expressionsänderung hin untersucht. Dabei ergab sich bei Connexin43 (29) eine minimale signifikante Genexpressionsminderung von 6% bei mit G-CSF behandelten murinen neonatalen Kardiomyozyten im Vergleich zu unbehandelten (**s. Abb.12**). Die mRNA-Spiegel der Positivkontrollen, mit FGF2 und ET1 behandelte neonatale Kardiomyozyten, zeigten keine nennenswerte Veränderung im Vergleich zum mRNA-Niveau der Kontrollprobe. Die Connexin43-mRNA-Spiegel der neonatalen und adulten Herzprobe waren erwartungsgemäß deutlich höher.

Neben einer durch „real-time“qRT-PCR gezeigten Connexin43-Expressionsabnahme nach G-CSF Applikation (s. **Abb.12**) konnte bei Westernblotanalysen eine deutliche Runterregulierung von phosphoryliertem und nicht-phosphoryliertem Connexin43 nach 24-stündiger Inkubation mit G-CSF beobachtet werden (s. **Abb.15**). G-CSF scheint bei neonatalen Rattenkardiomyozyten eine Proliferation auszulösen, welche dazu führt, dass sich die Connexin43 Bindungen bzw. die „gap junctions“ zwischen den Kardiomyozyten verringern (s. **Abb.15 / 16**). „Gap junctions“ sind aus Transmembranproteinen bestehende Dodecamere, welche hauptsächlich aus Connexin43 und in geringen Mengen auch aus Connexin40 und -45 aufgebaut sind (37). Diese leiten die Depolarisierungsvorgänge der einzelnen Herzzellen weiter, ermöglichen die Zell-Zellkommunikation und den Ablauf der Zellteilung (37, 57, 58). Die beobachtete Connexin43 Expressionsreduktion könnte demnach ein sekundäres Ereignis im Rahmen der ablaufenden Zellteilungsprozesse sein.

Andere Veröffentlichungen boten bereits Hinweise auf eine negative Korrelation zwischen der Connexin43 Expression und die durch Wachstumsfaktoren stimulierte Proliferation neonataler Kardiomyozyten (24, 102). Doble et al. vermuteten im Jahre 2004, dass eine Überexpression von Connexin43 die DNA Synthese der Kardiomyozyten inhibiert (24). Zhang et al. postulierten im Jahre 1998, dass eine reduzierte Connexin43 Expression mit dem Eintritt der Herzmuskelzelle in die S-Phase des Zellzyklus zusammenhängt (102). Matsuyama et al. (2009) veröffentlichten Ergebnisse, welche zeigten, dass ein Connexin43 „knockdown“ durch siRNA bei neonatalen Kardiomyozyten von einem signifikanten Proliferationsanstieg begleitet wurde (69). Sie wiesen nach, dass ein Connexin43 „knockdown“ mit einer Verringerung der phosphorylierten p38 MAPK einherging und eine Behandlung der Zellen mit einem p38 MAPK-Inhibitor die Zellproliferation signifikant erhöhte (69).

Um eine durch G-CSF Inkubation ausgelöste Proliferation weiter zu verifizieren, wurde eine Proteinexpressionsanalyse mit dem anerkannten Proliferationsmarker PCNA durchgeführt. Das Westernblot-Ergebnis mit einer PCNA Hochregulierung nach 24-stündiger G-CSF Inkubation (s. **Abb.16**) ließ den endgültigen Schluss zu, dass es durch die G-CSF Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten zu einer gesteigerten Zellproliferation gekommen ist. PCNA ist ein zentraler Bestandteil bei der DNA

Replikation und Zellteilung (17). Dabei handelt es sich um ein Hilfsprotein der DNA Polymerase δ (46), welches vor allem in der Zeitphase zwischen G1- und S-Phase des Zellzyklus gebildet wird (16, 68). PCNA kommt in nicht proliferierenden Zellen gar nicht bis nur in minimalsten Mengen vor, dafür aber äußerst zahlreich in Zellen, welche eine hohe Zellproliferation aufweisen (17, 68). Von Marino et al. wurde im Jahre 1991 beschrieben, dass PCNA in höheren Dosierungen in Rattenkardiomyozyten während der späten fetalen Entwicklung und kurz nach der Geburt vorliegt (68). Dieser Zeitraum ist eine Phase in welcher Myozyten eine hohe Proliferationsrate aufweisen (1). In der Literatur wurde zudem darüber berichtet, dass sich schnell teilende Tumorzellen weniger intrazelluläre Kommunikation mittels „gap junctions“ und damit auch Connexin43 aufweisen als die nicht transformierten Vorgängerzellen (80). Das heißt, dass schnell proliferierende Zellen weniger „gap junctions“ ausbilden, da diese bei der Zellteilung hinderlich sind.

Die gezeigten Resultate, insbesondere die PCNA und Connexin43 Westernblotanalysen als auch die Connexin43 mRNA-Expressionsanalysen, weisen darauf hin, dass G-CSF einen positiven Effekt auf die Proliferation neonataler Kardiomyozyten hat. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, um die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zu verifizieren.

6. Zusammenfassung

Wissenschaftliche Vorarbeiten zeigten, dass nach einem Myokardinfarkt die G-CSF und G-CSF Rezeptor Expression in der Infarkttrandzone deutlich ansteigt. Der G-CSF Rezeptor wird dabei vermutlich auch auf regenerationsvermittelnden (Stamm-)Zellen exprimiert, so dass aktuell postuliert wird, dass G-CSF eine Rolle bei der Myokardregeneration spielt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob G-CSF die Differenzierung von unreifen Zellen in Richtung kardiovaskulärer Zelltypen und / oder deren Proliferation beeinflusst. Die Grundlage für die weitere Erforschung von G-CSF Effekten auf pluripotente bzw. unreife Zellen stellte der Expressionsnachweis des G-CSF-R bei murinen embryonalen Stammzellen und den neonatalen Kardiomyozyten dar. Dazu wurden embryonale Stammzellen und daraus abgeleitete „embryoid bodies“ als in-vitro Modelle verwendet, da in letzteren vielfach kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse nachgewiesen wurden. Von daher ist dieses Zellsystem ein anerkanntes in-vitro System für die Analyse solcher Vorgänge. Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass G-CSF bei embryonalen Stammzellen, unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen, offenbar weder kardiale noch vaskuläre Differenzierungsprozesse steigerte.

Die Versuche mit neonatalen Kardiomyozyten wurden durchgeführt, um auch Zellen eines weitergehenden Differenzierungsgrades einzuschließen. Dabei scheint G-CSF die Zellteilung der neonatalen Kardiomyozyten zu stimulieren. Bei den mit G-CSF behandelten neonatalen Kardiomyozyten konnte sowohl auf Protein- als auf mRNA-Ebene eine signifikant verringerte Expression des Connexin43-Proteins nach G-CSF Applikation beobachtet werden. Diese Connexin43 Expressionsreduktion könnte durch eine Abnahme der „gap junctions“ während der Zellteilung erklärt werden. Weitere Untersuchungen zeigten eine nach G-CSF Behandlung gesteigerte Expression des Proliferationsmarkers PCNA, welche somit ein weiteres Indiz für das Ablaufen zellproliferativer Prozesse darstellt. Ferner liegen Ergebnisse einer signifikanten MesP1 und MEF2c Runterregulation nach 24-stündiger G-CSF Inkubation auf dem mRNA-Niveau vor. Ob die Veränderungen der mRNA-Spiegel der zuvor genannten Gene tatsächlich Einflüsse von G-CSF auf die Expression dieser Gene widerspiegeln oder

lediglich Veränderungen zu den Häufigkeiten der hierfür positiven Zellpopulationen reflektieren, muss noch geklärt werden.

Die genannten Befunde der signifikanten Connexin43 Expressionsminderung und der vorhandenen PCNA Expression sprechen somit für eine Stimulation der Proliferation von neonatalen Kardiomyozyten durch G-CSF.

- Genehmigungen der Tierexperimente s. 8.2 im Anhang (A-Antrag vom 02.03.1999: 9.93.2.10 A31/1997 / A-Antrag vom 30.09.2009: 8.87-51.05.20.09.192) -

7. Literaturverzeichnis

1. Anversa P., Li P., Zhang X., Olivetti G., Capasso J. M. Ischaemic myocardial injury and ventricular remodelling. *Cardiovasc Res*1993 Feb;27(2):145-57.
2. Anversa P., Rota M., Urbanek K., Hosoda T., Sonnenblick E. H., Leri A., Kajstura J., Bolli R. Myocardial aging--a stem cell problem. *Basic Res Cardiol*2005 Nov;100(6):482-93.
3. Aouadi M., Bost F., Caron L., Laurent K., Le Marchand Brustel Y., Binetruy B. p38 mitogen-activated protein kinase activity commits embryonic stem cells to either neurogenesis or cardiomyogenesis. *Stem Cells*2006 May;24(5):1399-406.
4. Avalos B. R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*1996 Aug 1;88(3):761-77.
5. Balsam L. B., Wagers A. J., Christensen J. L., Kofidis T., Weissman I. L., Robbins R. C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*2004 Apr 8;428(6983):668-73.
6. Barile L., Messina E., Giacomello A., Marban E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*2007 Jul-Aug;50(1):31-48.
7. Bashey A., Healy L., Marshall C. J. Proliferative but not nonproliferative responses to granulocyte colony-stimulating factor are associated with rapid activation of the p21ras/MAP kinase signalling pathway. *Blood*1994 Feb 15;83(4):949-57.
8. Behfar A., Zingman L. V., Hodgson D. M., Rauzier J. M., Kane G. C., Terzic A., Puceat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J*2002 Oct;16(12):1558-66.
9. Behfar A., Terzic A. Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*2006 Mar;3 Suppl 1:S78-82.
10. Behfar A., Perez-Terzic C., Faustino R. S., Arrell D. K., Hodgson D. M., Yamada S., Puceat M., Niederlander N., Alekseev A. E., Zingman L. V., Terzic A. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med*2007 Feb 19;204(2):405-20.
11. Bocchietto E., Guglielmetti A., Silvagno F., Taraboletti G., Pescarmona G. P., Mantovani A., Bussolino F. Proliferative and migratory responses of murine microvascular endothelial cells to granulocyte-colony-stimulating factor. *J Cell Physiol*1993 Apr;155(1):89-95.
12. Boheler K. R., Czyz J., Tweedie D., Yang H. T., Anisimov S. V., Wobus A. M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*2002 Aug 9;91(3):189-201.
13. Boilson B. A., Gulati R. Stem cell therapy for the heart: a perspective. *Transl Res*2010 Jan;155(1):3-5.
14. Bondue A., Lapouge G., Paulissen C., Semeraro C., Iacovino M., Kyba M., Blanpain C. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell*2008 Jul 3;3(1):69-84.
15. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol*2003 Jun 1;258(1):1-19.
16. Bravo R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. *Exp Cell Res*1986 Apr;163(2):287-93.

17. Celis J. E., Madsen P., Celis A., Nielsen H. V., Gesser B. Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Lett* 1987 Aug 10;220(1):1-7.
18. Chamberlain D. A. Overview of completed sudden death trials: European experience. *Cardiology* 1987;74 Suppl 2:10-23.
19. Chen Y., Amende I., Hampton T. G., Yang Y., Ke Q., Min J. Y., Xiao Y. F., Morgan J. P. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Oct;291(4):H1653-8.
20. Corey S. J., Burkhardt A. L., Bolen J. B., Geahlen R. L., Tkatch L. S., Tweardy D. J. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 May 24;91(11):4683-7.
21. Cowie M. R., Mendez G. F. BNP and congestive heart failure. *Prog Cardiovasc Dis* 2002 Jan-Feb;44(4):293-321.
22. David R., Stieber J., Fischer E., Brunner S., Brenner C., Pfeiler S., Schwarz F., Franz W. M. Forward programming of pluripotent stem cells towards distinct cardiovascular cell types. *Cardiovasc Res* 2009 Nov 1;84(2):263-72.
23. Deindl E., Zaruba M. M., Brunner S., Huber B., Mehl U., Assmann G., Hoefler I. E., Mueller-Hoecker J., Franz W. M. G-CSF administration after myocardial infarction in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis. *FASEB J* 2006 May;20(7):956-8.
24. Doble B. W., Dang X., Ping P., Fandrich R. R., Nickel B. E., Jin Y., Cattini P. A., Kardami E. Phosphorylation of serine 262 in the gap junction protein connexin-43 regulates DNA synthesis in cell-cell contact forming cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2004 Jan 26;117(Pt 3):507-14.
25. Dong F., Larner A. C. Activation of Akt kinase by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF): evidence for the role of a tyrosine kinase activity distinct from the Janus kinases. *Blood* 2000 Mar 1;95(5):1656-62.
26. Ellison G. M., Galuppo V., Vicinanza C., Aquila I., Waring C. D., Leone A., Indolfi C., Torella D. Cardiac stem and progenitor cell identification: different markers for the same cell? *Front Biosci (Schol Ed)* 2010;2:641-52.
27. Engel F. B., Schebesta M., Duong M. T., Lu G., Ren S., Madwed J. B., Jiang H., Wang Y., Keating M. T. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 2005 May 15;19(10):1175-87.
28. Franke T. F., Kaplan D. R., Cantley L. C. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997 Feb 21;88(4):435-7.
29. Fromaget C., el Aoumari A., Gros D. Distribution pattern of connexin 43, a gap junctional protein, during the differentiation of mouse heart myocytes. *Differentiation* 1992 Sep;51(1):9-20.
30. Fukunaga R., Ishizaka-Ikeda E., Pan C. X., Seto Y., Nagata S. Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J* 1991 Oct;10(10):2855-65.
31. Gruber P. J., Li Z., Li H., Worrall D., Huang B., Abdullah I., Wang W., El-Deiry W., Ferrari V. A., Zhou R. In vivo imaging of MLC2v-luciferase, a cardiac-specific reporter gene expression in mice. *Acad Radiol* 2004 Sep;11(9):1022-8.

32. Hamazaki T., Oka M., Yamanaka S., Terada N. Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci* 2004 Nov 1;117(Pt 23):5681-6.
33. Harada M., Qin Y., Takano H., Minamino T., Zou Y., Toko H., Ohtsuka M., Matsuura K., Sano M., Nishi J., Iwanaga K., Akazawa H., Kunieda T., Zhu W., Hasegawa H., Kunisada K., Nagai T., Nakaya H., Yamauchi-Takahara K., Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005 Mar;11(3):305-11.
34. He Z. X., Huang S. L., Zhou Q. F., Li S. N. [Generation of CD34+/Sca-1+ cells from mouse embryonic stem cells with two-step differentiation in vitro]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2004 Nov;42(11):830-4.
35. Hermans M. H., van de Geijn G. J., Antonissen C., Gits J., van Leeuwen D., Ward A. C., Touw I. P. Signaling mechanisms coupled to tyrosines in the granulocyte colony-stimulating factor receptor orchestrate G-CSF-induced expansion of myeloid progenitor cells. *Blood* 2003 Apr 1;101(7):2584-90.
36. Herold Gerd. *Innere Medizin*. Köln: Herold; 2007.
37. Herve J. C., Sarrouilhe D. Protein phosphatase modulation of the intercellular junctional communication: importance in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 2006 Jan-Apr;90(1-3):225-48.
38. Hill C. P., Osslund T. D., Eisenberg D. The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jun 1;90(11):5167-71.
39. Horn Florian. *Biochemie des Menschen*. 4., aktualisierte und erweiterte Auflage ed: Thieme; 2009.
40. Hortner M., Nielsch U., Mayr L. M., Johnston J. A., Heinrich P. C., Haan S. Suppressor of cytokine signaling-3 is recruited to the activated granulocyte-colony stimulating factor receptor and modulates its signal transduction. *J Immunol* 2002 Aug 1;169(3):1219-27.
41. Hunter M. G., Avalos B. R. Phosphatidylinositol 3'-kinase and SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) are recruited by distinct positive and negative growth-regulatory domains in the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *J Immunol* 1998 May 15;160(10):4979-87.
42. Huttmann A., Duhrsen U., Stypmann J., Noppeney R., Nuckel H., Neumann T., Guttersohn A., Nikol S., Erbel R. Granulocyte colony-stimulating factor-induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure--Feasibility, safety and effects on exercise tolerance and cardiac function. *Basic Res Cardiol* 2006 Jan;101(1):78-86.
43. Hyun I. The bioethics of stem cell research and therapy. *J Clin Invest* 2010 Jan;120(1):71-5.
44. Ince H., Petzsch M., Kleine H. D., Eckard H., Rehders T., Burska D., Kische S., Freund M., Nienaber C. A. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005 Aug 30;112(9 Suppl):I73-80.

- 45.Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D., Eden A., Yanuka O., Amit M., Soreq H., Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med*2000 Feb;6(2):88-95.
- 46.Jaskulski D., deRiel J. K., Mercer W. E., Calabretta B., Baserga R. Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxynucleotides to PCNA cyclin. *Science*1988 Jun 10;240(4858):1544-6.
- 47.Johnsen H. E. Clinical practice and future needs in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor treatment: a review of randomized trials in clinical haemato-oncology. *J Int Med Res*2001 Mar-Apr;29(2):87-99.
- 48.Kania G., Corbeil D., Fuchs J., Tarasov K. V., Blyszczuk P., Huttner W. B., Boheler K. R., Wobus A. M. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells*2005 Jun-Jul;23(6):791-804.
- 49.Kardami E., Jiang Z. S., Jimenez S. K., Hirst C. J., Sheikh F., Zahradka P., Cattini P. A. Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*2004 Aug 15;63(3):458-66.
- 50.Kastrup J., Ripa R. S., Wang Y., Jorgensen E. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? *Eur Heart J*2006 Dec;27(23):2748-54.
- 51.Klocke R., Kuhlmann M. T., Scobioala S., Schabitz W. R., Nikol S. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. *Curr Med Chem*2008;15(10):968-77.
- 52.Kolossov E., Bostani T., Roell W., Breitbach M., Pillekamp F., Nygren J. M., Sasse P., Rubenchik O., Fries J. W., Wenzel D., Geisen C., Xia Y., Lu Z., Duan Y., Kettenhofen R., Jovinge S., Bloch W., Bohlen H., Welz A., Hescheler J., Jacobsen S. E., Fleischmann B. K. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med*2006 Oct 2;203(10):2315-27.
- 53.Krauss Gerhard. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Third, Completely Revised Edition ed: WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA; 2003.
- 54.Krylova T. A., Kol'tsova A. M., Zenin V. V., Gordeeva O. F., Musorina A. S., Goriachaia T. S., Shlykova S. A., Kamenetskaia Iu K., Pinaev G. P., Polianskaia G. G. [The characters and specific features of new human embryonic stem cells lines]. *Tsitologija*2009;51(7):565-76.
- 55.Kuhlmann M. T., Kirchhof P., Klocke R., Hasib L., Stypmann J., Fabritz L., Stelljes M., Tian W., Zwiener M., Mueller M., Kienast J., Breithardt G., Nikol S. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med*2006 Jan 23;203(1):87-97.
- 56.Kuwabara M., Kakinuma Y., Katare R. G., Ando M., Yamasaki F., Doi Y., Sato T. Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of beta-catenin and cadherin. *FEBS Lett*2007 Oct 16;581(25):4821-30.
- 57.Lampe P. D., Lau A. F. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys*2000 Dec 15;384(2):205-15.
- 58.Lampe P. D., Lau A. F. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*2004 Jul;36(7):1171-86.

59. Laugwitz K. L., Moretti A., Caron L., Nakano A., Chien K. R. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 2008 Jan;135(2):193-205.
60. Lev S., Kehat I., Gepstein L. Differentiation pathways in human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2005 Jun;1047:50-65.
61. Levenberg S., Zoldan J., Basevitch Y., Langer R. Endothelial potential of human embryonic stem cells. *Blood* 2007 Aug 1;110(3):806-14.
62. Li X., Wei X. L., Meng L. L., Chi M. G., Yan J. Q., Ma X. Y., Jia Y. S., Liang L., Yan H. T., Zheng J. Q. Involvement of tissue transglutaminase in endothelin 1-induced hypertrophy in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Hypertension* 2009 Oct;54(4):839-44.
63. Lieschke G. J., Grail D., Hodgson G., Metcalf D., Stanley E., Cheers C., Fowler K. J., Basu S., Zhan Y. F., Dunn A. R. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994 Sep 15;84(6):1737-46.
64. Lindsley R. C., Gill J. G., Murphy T. L., Langer E. M., Cai M., Mashayekhi M., Wang W., Niwa N., Nerbonne J. M., Kyba M., Murphy K. M. *Mesp1* coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell* 2008 Jul 3;3(1):55-68.
65. Liu Y., Asakura M., Inoue H., Nakamura T., Sano M., Niu Z., Chen M., Schwartz R. J., Schneider M. D. *Sox17* is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Mar 6;104(10):3859-64.
66. Mahdavi V., Strehler E. E., Periasamy M., Wiecek D. F., Izumo S., Nadal-Ginard B. Sarcomeric myosin heavy chain gene family: organization and pattern of expression. *Med Sci Sports Exerc* 1986 Jun;18(3):299-308.
67. Mariner P. D., Luckey S. W., Long C. S., Sucharov C. C., Leinwand L. A. Yin Yang 1 represses alpha-myosin heavy chain gene expression in pathologic cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Jan 7;326(1):79-86.
68. Marino T. A., Haldar S., Williamson E. C., Beaverson K., Walter R. A., Marino D. R., Beatty C., Lipson K. E. Proliferating cell nuclear antigen in developing and adult rat cardiac muscle cells. *Circ Res* 1991 Nov;69(5):1353-60.
69. Matsuyama D., Kawahara K. Proliferation of neonatal cardiomyocytes by connexin43 knockdown via synergistic inactivation of p38 MAPK and increased expression of FGF1. *Basic Res Cardiol* 2009 Nov;104(6):631-42.
70. McLemore M. L., Grewal S., Liu F., Archambault A., Poursine-Laurent J., Haug J., Link D. C. STAT-3 activation is required for normal G-CSF-dependent proliferation and granulocytic differentiation. *Immunity* 2001 Feb;14(2):193-204.
71. Miyazaki Y., Kaikita K., Endo M., Horio E., Miura M., Tsujita K., Hokimoto S., Yamamuro M., Iwawaki T., Gotoh T., Ogawa H., Oike Y. C/EBP Homologous Protein Deficiency Attenuates Myocardial Reperfusion Injury by Inhibiting Myocardial Apoptosis and Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 Feb 17.
72. Mokry J., Pudil R., Ehrmann J., Cizkova D., Osterreicher J., Filip S., Kolar Z. Re-expression of nestin in the myocardium of postinfarcted patients. *Virchows Arch* 2008 Jul;453(1):33-41.
73. Murry C. E., Soonpaa M. H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H. O., Rubart M., Pasumarthi K. B., Virag J. I., Bartelmez S. H., Poppa V., Bradford G., Dowell J. D.,

- Williams D. A., Field L. J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*2004 Apr 8;428(6983):664-8.
- 74.Myerburg R. J., Kessler K. M., Castellanos A. Sudden cardiac death. Structure, function, and time-dependence of risk. *Circulation*1992 Jan;85(1 Suppl):I2-10.
- 75.Naito A. T., Akazawa H., Takano H., Minamino T., Nagai T., Aburatani H., Komuro I. Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway plays a critical role in early cardiomyogenesis by regulating canonical Wnt signaling. *Circ Res*2005 Jul 22;97(2):144-51.
- 76.Nikolova T., Czyz J., Rolletschek A., Blyszczuk P., Fuchs J., Jovtchev G., Schuderer J., Kuster N., Wobus A. M. Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *FASEB J*2005 Oct;19(12):1686-8.
- 77.Nygren J. M., Jovinge S., Breitbach M., Sawen P., Roll W., Hescheler J., Taneera J., Fleischmann B. K., Jacobsen S. E. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*2004 May;10(5):494-501.
- 78.Ohki Y., Heissig B., Sato Y., Akiyama H., Zhu Z., Hicklin D. J., Shimada K., Ogawa H., Daida H., Hattori K., Ohsaka A. Granulocyte colony-stimulating factor promotes neovascularization by releasing vascular endothelial growth factor from neutrophils. *FASEB J*2005 Dec;19(14):2005-7.
- 79.Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Limana F., Jakoniuk I., Quaini F., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*2001 Aug 28;98(18):10344-9.
- 80.Pahujaa M., Anikin M., Goldberg G. S. Phosphorylation of connexin43 induced by Src: regulation of gap junctional communication between transformed cells. *Exp Cell Res*2007 Dec 10;313(20):4083-90.
- 81.Pal R. Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: a good candidate for cell therapy applications. *Cell Biol Int*2009 Mar;33(3):325-36.
- 82.Papayannopoulou T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*2004 Mar 1;103(5):1580-5.
- 83.Parcellier A., Tintignac L. A., Zhuravleva E., Hemmings B. A. PKB and the mitochondria: AKTing on apoptosis. *Cell Signal*2008 Jan;20(1):21-30.
- 84.Rajasingh J., Bord E., Hamada H., Lambers E., Qin G., Losordo D. W., Kishore R. STAT3-dependent mouse embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes: analysis of molecular signaling and therapeutic efficacy of cardiomyocyte precommitted mES transplantation in a mouse model of myocardial infarction. *Circ Res*2007 Oct 26;101(9):910-8.
- 85.Riley P. The "natural selection" of muscle for cardiac repair. *Circ Res*2010 Jan 8;106(1):4-6.
- 86.Saga Y., Kitajima S., Miyagawa-Tomita S. *Mesp1* expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med*2000 Nov;10(8):345-52.
- 87.Schneider A., Kruger C., Steigleder T., Weber D., Pitzer C., Laage R., Aronowski J., Maurer M. H., Gassler N., Mier W., Hasselblatt M., Kollmar R., Schwab S., Sommer C., Bach A., Kuhn H. G., Schabitz W. R. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal

- ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 2005 Aug;115(8):2083-98.
- 88.Scobioala S., Klocke R., Kuhlmann M., Tian W., Hasib L., Milting H., Koenig S., Stelljes M., El-Banayosy A., Tenderich G., Michel G., Breithardt G., Nikol S. Up-regulation of nestin in the infarcted myocardium potentially indicates differentiation of resident cardiac stem cells into various lineages including cardiomyocytes. *FASEB J* 2008 Apr;22(4):1021-31.
- 89.Sheridan W. P., Morstyn G., Wolf M., Dodds A., Lusk J., Maher D., Layton J. E., Green M. D., Souza L., Fox R. M. Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *Lancet* 1989 Oct 14;2(8668):891-5.
- 90.Shimoji K., Yuasa S., Onizuka T., Hattori F., Tanaka T., Hara M., Ohno Y., Chen H., Egasgira T., Seki T., Yae K., Koshimizu U., Ogawa S., Fukuda K. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 2010 Mar 5;6(3):227-37.
- 91.Smith A. G. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435-62.
- 92.Sucharov C. C., Mariner P., Long C., Bristow M., Leinwand L. Yin Yang 1 is increased in human heart failure and represses the activity of the human alpha-myosin heavy chain promoter. *J Biol Chem* 2003 Aug 15;278(33):31233-9.
- 93.Suzuki T., Hoshi H., Mitsui Y. Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. *FEBS Lett* 1990 Jul 30;268(1):149-51.
- 94.Takahama H., Minamino T., Hirata A., Ogai A., Asanuma H., Fujita M., Wakeno M., Tsukamoto O., Okada K., Komamura K., Takashima S., Shinozaki Y., Mori H., Mochizuki N., Kitakaze M. Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 2006 Jun;20(3):159-65.
- 95.Takano H., Qin Y., Hasegawa H., Ueda K., Niitsuma Y., Ohtsuka M., Komuro I. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006 Mar;84(3):185-93.
- 96.Takano H., Ueda K., Hasegawa H., Komuro I. G-CSF therapy for acute myocardial infarction. *Trends Pharmacol Sci* 2007 Oct;28(10):512-7.
- 97.Tian S. S., Lamb P., Seidel H. M., Stein R. B., Rosen J. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1994 Sep 15;84(6):1760-4.
- 98.Tian S. S., Tapley P., Sincich C., Stein R. B., Rosen J., Lamb P. Multiple signaling pathways induced by granulocyte colony-stimulating factor involving activation of JAKs, STAT5, and/or STAT3 are required for regulation of three distinct classes of immediate early genes. *Blood* 1996 Dec 15;88(12):4435-44.
- 99.Ueda K., Takano H., Hasegawa H., Niitsuma Y., Qin Y., Ohtsuka M., Komuro I. Granulocyte colony stimulating factor directly inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury through Akt-endothelial NO synthase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Jun;26(6):e108-13.

100. Wang D. L., Chen J. J., Shin N. L., Kao Y. C., Hsu K. H., Huang W. Y., Liew C. C. Endothelin stimulates cardiac alpha- and beta- myosin heavy chain gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Mar 31;183(3):1260-5.
101. Wang L., Rudert W. A., Loutaev I., Roginskaya V., Corey S. J. Repression of c-Cbl leads to enhanced G-CSF Jak-STAT signaling without increased cell proliferation. *Oncogene* 2002 Aug 8;21(34):5346-55.
102. Zhang H., Lou D., Shan Z. [Correlation of expression of connexin 43 and cardiomyocyte hypertrophy]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 1998 Dec;27(6):436-8.
103. Zhao X., Dai W., Zhu H., Zhang Y., Cao L., Ye Q., Lei P., Shen G. Epidermal growth factor (EGF) induces apoptosis in a transfected cell line expressing EGF receptor on its membrane. *Cell Biol Int* 2006 Aug;30(8):653-8.
104. Zohnhofer D., Ott I., Mehilli J., Schomig K., Michalk F., Ibrahim T., Meisetschlager G., von Wedel J., Bollwein H., Seyfarth M., Dirschinger J., Schmitt C., Schwaiger M., Kastrati A., Schomig A. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006 Mar 1;295(9):1003-10.

Danksagungen

Ich möchte mich herzlich bei...

... Frau Prof. Dr. med. Sigrid Nikol für die Vergabe des sehr interessanten
Forschungsthemas, die Bereitstellung der Versuchslaboratorien, Ihre
vorbildliche Betreuung und die Begutachtung meiner Dissertation
bedanken.

... Herrn Priv. Doz. Dr. med. Steffen Koschmieder für die Übernahme des
Zweitgutachtens bedanken.

... Herrn Dr. rer. nat. Rainer Klocke für die allzeit umfassende und hervorragende
Betreuung, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die wissenschaftliche
versierte Fachberatung und das ausführliche Korrekturlesen dieser Arbeit
bedanken.

... Herrn Dr. rer. nat. Christian Andresen für die engagierte und ausgezeichnete
wissenschaftliche Betreuung und das umfangreiche Korrekturlesen dieser Arbeit
bedanken.

... Herrn Dr. med. Sergiu Scobioala für die sehr gute wissenschaftliche Anleitung und
die stets erheiternden Gespräche bedanken.

... der gesamten Arbeitsgruppe Nikol und der Integrierten Funktionellen Genomik in
Münster für das nette Arbeitsumfeld, die konstruktiven Gespräche und die stets
vorhandene Hilfsbereitschaft bedanken.

... meinem Bruder Philipp, meiner Mutter Hildegard und meinem Vater Lothar für die
innige, moralische und finanzielle Unterstützung während des Entstehungsprozesses
meiner Doktorarbeit und für die Dauer meines Medizinstudiums bedanken.

... meinem Paolchen für die fortwährende, allumfassende liebevolle Unterstützung in guten
sowie in schlechten Zeiten bedanken.

8. Anhang

8.1 Marker

8.1.1 DNA-Marker

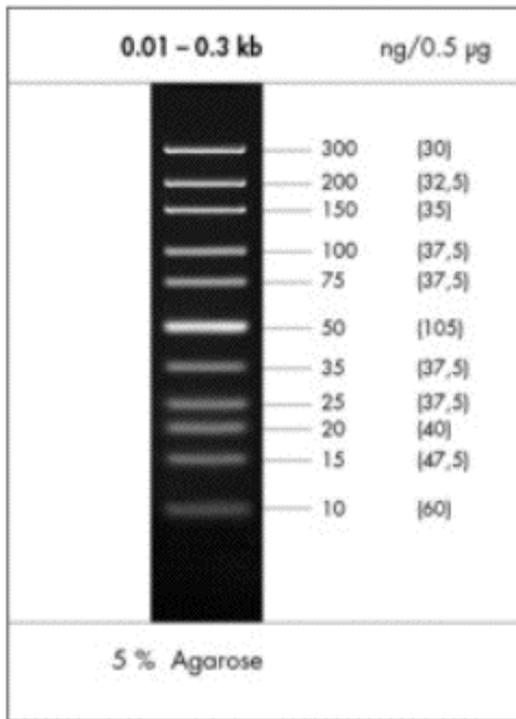


Abb. 17: peqGOLD Ultra Low Range DNA-Leiter I, PaqLab

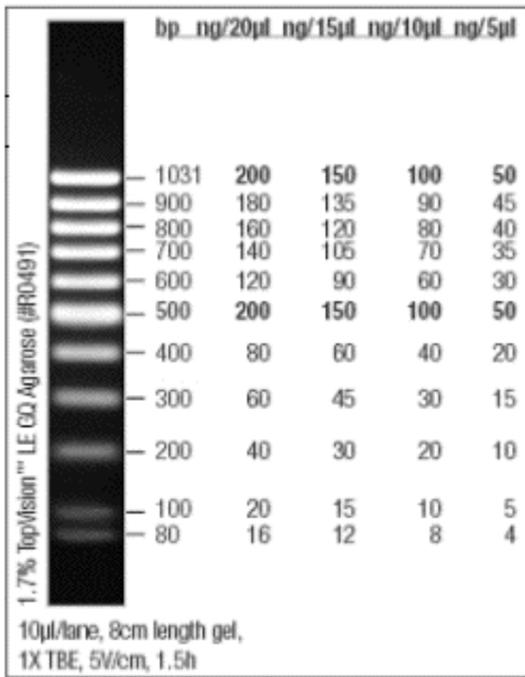


Abb. 18: MassRuler DNA Ladder, Low Range, Fermentas GmbH

8.1.2 Protein-Marker

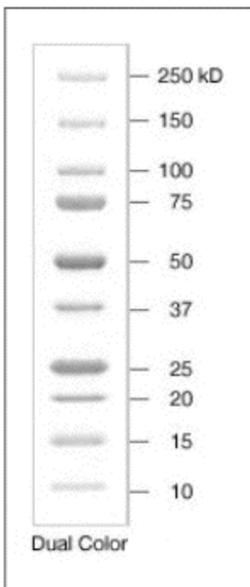


Abb. 19: Precision Plus Protein™ Standards Dual Color, Bio-Rad Laboratories

8.2 Genehmigungen der tierexperimentellen Arbeit

DIE
OBERBÜRGERMEISTERIN

STADT  MÜNSTER

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTELÜBER-
WACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 108
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung
Münster,
02.03.1999

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Institut für Pharmakologie
und Toxikologie
z.H. Herrn Prof. Dr. J. Neumann
Domagkstr. 12

48149 Münster

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
25.02.99

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401

TIERSCHUTZGESETZ

hier: **Genehmigung zur Zucht und Haltung von Versuchstieren für den Versuch A 31/97**

Sehr geehrter Herr Professor Neumann,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Aufstockungen der bereits am 20.11.1997 genehmigten Tierzahl bis zu

1.500 Ratten (vorher 900) sowie 1.500 Mäusen (vorher 500) pro Jahr.

Die Erlaubnis wird unter folgenden Auflagen erteilt:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Mitarbeiter Ihres Institutes zuständig.
2. Über die Zucht und den Verbleib der Tiere sind Aufzeichnungen zu machen und mindestens drei Jahre lang aufzubewahren.
3. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.
4. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen
5. Der Tierschutzbeauftragte der Uni, Herr Dr. Lücke, ist über die Zucht und Haltung zu informieren.

Die Genehmigung gilt bis zur Beendigung des obigen Versuches.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 49 001 700
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 35-461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 012 305 100
Bankhaus Lampe Wandler Kto.-Nr. 306 032

(BLZ 450 601 00)

(BLZ 450 000 00)

(BLZ 445 100 46)

(BLZ 400 101 11)

(BLZ 480 501 51)

Commerzbank Münster

Deutsche Bank Münster

Deutsche Bank Münster

Westbank Münster eG

Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 332 210 000

Kto.-Nr. 0470 005

Kto.-Nr. 834 446 400

Kto.-Nr. 4 200 800

Kto.-Nr. 61 226

(BLZ 450 400 20)

(BLZ 450 700 55)

(BLZ 450 400 47)

(BLZ 401 600 55)

(BLZ 450 500 03)

Zentrale Verbindungen

§ Hauptvermittlung (0251) 492 0

Telefax (0251) 492-3700

Telefax 77914556

E-Mail

Stadtverhoering@stadt-muenster.de

Landesamt für Natur,
Umwelt und Verbraucherschutz
Nordrhein-Westfalen



LANUV NRW, Postfach 10 10 52, 45610 Recklinghausen

Herrn
Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universität Münster
Domagkstraße 12
48129 Münster

Tierschutz;

Anzeige nach § 8a Abs. 1 und 2 Tierschutzgesetz (TSchG)

- a) Zuständigkeitsverordnung vom 26. September 1989 (GV NW 1989 S. 508)
- b) Ihre Anzeige vom 24.09.2009; eingegangen am 28.09.2009

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Müller,

Ihre o. g. Anzeige zu dem Versuchsvorhaben

„Mechanismen der kardialen und vaskulären Funktion“

wird hiermit bestätigt.

Verantwortlicher Versuchsleiter: Herr Prof. Dr. med. Frank U. Müller

Stellvertretender Versuchsleiter: Herr Dr. rer. nat. Matthias D. Seidl

Weitere beteiligte Personen: die auf der Seite 3 unter Punkt 6.3 in Ihrem Antrag aufgeführten Personen – vorbehaltlich einer Ausnahmegenehmigung gem. § 9 Abs. 1 Satz 4 TSchG insoweit sie erforderlich ist -

Art und Zahl der Tiere: 4500 Mäuse, 900 Ratten und 45 Meerschweinchen

Dauer des Versuchsvorhabens: bis zum 30.09.2012

Ort: Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Münster

Auskunft erteilt:

Herr Salert

Direktwahl 02361/305-3709

Fax 02361/305-3439

poststelle@lanuv.nrw.de

Aktenzeichen

8.87-51.05.20.09.192

bei Antwort bitte angeben

Ihre Nachricht vom:

Ihr Aktenzeichen:

Datum: 30.09.2009

Hauptsitz:

Leibnizstraße 10

45659 Recklinghausen

Telefon 02361 305-0

Fax 02361 305-3215

poststelle@lanuv.nrw.de

www.lanuv.nrw.de

Dienstgebäude:

Hauptsitz Recklinghausen

Öffentliche Verkehrsmittel:

Ab Recklinghausen Hbf mit

Buslinie 236 oder 237 bis

Haltestelle "LANUV" und 5 Min.

Fußweg oder mit Buslinie SB 20

bis Haltestelle "Hohenhorster

Weg" und 15 Min. Fußweg in

Richtung Trabrennbahn bis

Leibnizstraße

Bankverbindung:

Landeskasse Düsseldorf

Konto-Nr.: 41 000 12

West LB AG

(BLZ 300 500 00)

BIC-Code: WELADED0

IBAN-Code: DE 41 3005

0000 0004 1000 12