

**Aus der Klinik für Innere Medizin III –
Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Böhm**

**Untersuchungen zum Einfluss des Hepatocyte Growth Factors auf
die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2007

vorgelegt von

Christian Ukena

Geb. am 19.09.81 in Bonn

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

1. Dr. med. H. Kilter
2. Dr. med. C. Roggia

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

Unterschrift der die Versicherung an Eides statt aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden Beamten

Für Julia

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG.....	5
1.1	ZUSAMMENFASSUNG - DEUTSCH	5
1.2	ZUSAMMENFASSUNG - ENGLISCH	7
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	BEDEUTUNG VON STAMMZELLEN FÜR DIE THERAPIE KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN	9
2.2	EIGENSCHAFTEN UND BEDEUTUNG VON STAMM- UND VORLÄUFERZELLEN.....	11
2.3	KARDIOMYOZYTÄRE DIFFERENZIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN	13
2.4	HEPATOCTYCE GROWTH FACTOR	16
2.5	FRAGESTELLUNG DER VORGELEGTEN ARBEIT	19
3	MATERIAL UND METHODIK.....	21
3.1	ZELLKULTIVIERUNG EMBRYONALER STAMMZELLEN	21
3.1.1	<i>Embryonale Stammzellen der Maus.....</i>	<i>21</i>
3.1.2	<i>Kultivierung der undifferenzierten Stammzellen.....</i>	<i>21</i>
3.1.3	<i>Differenzierung</i>	<i>24</i>
3.1.4	<i>Verwendete Medien.....</i>	<i>26</i>
3.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	27
3.2.1	<i>Bestimmung der Schlagfrequenz.....</i>	<i>27</i>
3.2.2	<i>Pharmakologische Stimulationen.....</i>	<i>27</i>
3.3	UNTERSUCHUNG DER GEN – EXPRESSION.....	27
3.3.1	<i>Isolation der RNA.....</i>	<i>27</i>
3.3.2	<i>Reverse Transkription</i>	<i>28</i>
3.3.3	<i>Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion.....</i>	<i>28</i>
3.4	IMMUNCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....	31
3.5	STATISTIK.....	31
3.6	VERWENDETE SUBSTANZEN	32
4	ERGEBNISSE.....	33
4.1	MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....	33
4.2	FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG	36
4.3	PHARMAKOLOGISCHE STIMULATIONEN	38
4.4	GEN – EXPRESSIONSANALYSEN	41
4.4.1	<i>Einfluss der HGF Konzentration auf die mRNA – Expression kardialer Gene während der frühen Differenzierung.....</i>	<i>41</i>
4.4.2	<i>mRNA – Expression kardialer Gene zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten.....</i>	<i>44</i>
4.4.3	<i>mRNA – Expression nicht – kardialer Gene zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten..</i>	<i>49</i>
4.4.4	<i>mRNA Expression kardialer Gene unter Serum – reduzierten Kulturbedingungen.....</i>	<i>51</i>

4.5	IMMUNFÄRBUNGEN	53
4.6	SIGNALTRANSDUKTIONSANALYSEN.....	55
5	DISKUSSION	60
5.1	KARDIALE DIFFERENZIERUNG IN ANWESENDHEIT VON HGF	60
5.2	ANALYSE DER NICHT – KARDIALE DIFFERENZIERUNG	63
5.3	BEURTEILUNG DER KARDIOMYOGENESE UNTER SERUM – REDUZIERTEN KULTURBEDINGUNGEN	64
5.4	MECHANISMUS DER DURCH HGF VERMITTELTEN KARDIOMYOZYTÄREN DIFFERENZIERUNG.....	65
5.5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS	71
7	PUBLIKATIONEN / DANK	81
7.1	PUBLIKATIONEN	81
7.2	DANKSAGUNGEN	82
8	LEBENS LAUF.....	83

ABKÜRZUNGEN

Ø	Durchmesser
68 – NFL	Neurofilament Protein (68 kDa)
Abb.	Abbildung
Alpha MHC	Alpha Myosin Heavy Chain
Alpha SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
Beta MHC	Beta Myosin Heavy Chain
BMSC	Knochenmarksstammzellen
bp	Basenpaare
BT	Beta – Tubulin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Zirka
cm	Zentimeter
d	Tag
D – MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Embryoid Body
ESC	Embryonale Stammzellen
FLK – 1	Fetal Liver Kinase - 1
h	Stunde(n)
hESC	Humane embryonale Stammzellen
HGF	Hepatocyte Growth Factor
IVF	In-vitro-Fertilisation
MEF	Embryonale Fibroblasten der Maus
mESC	Embryonale Stammzellen der Maus
MLC2v	Ventricular Myosin Light Chain
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	Messenger – Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Experimente

n.s.	nicht signifikant
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
Tab	Tabelle
U	Einheit der Enzymaktivität
μl	Mikroliter
VE – Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
Vgl.	Vergleiche
Vs.	Versus

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Zusammenfassung - Deutsch

Der Ersatz abgestorbener Herzmuskelzellen durch aus Stammzellen gewonnene Kardiomyozyten ist ein vielversprechendes Therapiekonzept der chronischen Herzinsuffizienz. Die entscheidende Limitation dieses Ansatzes liegt in der qualitativ geringen und prolongierten kardiomyozytären Differenzierung von embryonalen Stammzellen. Mechanismen, die die Differenzierung von embryonalen Stammzellen in Kardiomyozyten verstärken und beschleunigen, sind daher von großer Bedeutung.

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) ist ein pleiotropes Zytokin, das Proliferation, Migration und Überleben in unterschiedlichen Zelltypen reguliert. HGF und der dazugehörige Rezeptor werden bereits während der frühen Kardiogenese exprimiert, allerdings ist die Bedeutung von HGF für die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen noch unklar.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung von HGF für die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus. Dazu wurden Zellkultursysteme für die kardiomyozytäre Differenzierung von embryonalen Stammzellen der Maus etabliert. Die so gewonnenen Zellen wurden immunhistochemisch und funktionell charakterisiert und die Expression kardialer Gene in Gegenwart unterschiedlicher HGF Konzentrationen mittels RT – PCR analysiert. Es zeigte sich, dass die kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA 4, denen eine entscheidende Bedeutung für die kardiomyozytäre Differenzierung zukommt, verstärkt in Gegenwart einer HGF Konzentration von 20 ng/ml exprimiert werden. Zu fortgeschrittenen Differenzierungsstadien zeigte sich unter dieser HGF Konzentration auch eine verstärkte mRNA Expression von Genen des kardialen Kontraktionsapparates wie α -, β – MHC und MLC2v. Durch Immunfärbung der aus differenzierenden ESCs bestehenden Zellaggregate (Embryoid Bodies) konnte gezeigt werden, dass sich durch 20 ng/ml HGF der Anteil der Zellen, die sich positiv für das myofibrilläre Strukturprotein Troponin T färbten, um 50 % gegenüber unbehandelten Kontrollen vergrößerte. Darüber hinaus erhöhte HGF die Zahl der Embryoid Bodies mit kontrahierenden Kardiomyozyten signifikant ohne die Kontraktionsfrequenz oder die Effekte einer positiv oder negativ chronotropen Stimulation zu

beeinflussen. Nicht – kardiale Genprodukte zeigten durch HGF Stimulation kein verändertes Expressionsverhalten.

Die durch HGF verstärkte Expression der kardialen Gene Nkx2.5 und GATA 4 wurde in Anwesenheit der Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) Inhibitoren Wortmannin und LY294002 aufgehoben, während das inaktive Homolog LY303511 die Effekte von HGF nicht beeinflusste. Ferner zeigte sich in einer Ko – Immunfärbung, dass mit HGF stimulierte Embryoid Bodies mehr Kardiomyozyten positiv für die phosphorylierte Isoform der Proteinkinase Akt, einem wichtigen Zielprotein der PI3K, anfärbten. HGF aktiviert demnach den PI3K/Akt Signaltransduktionsmechanismus in embryonalen Stammzellen. Dieser Effekt scheint die Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten zu verstärken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig, dass HGF ein wichtiger Wachstumsfaktor für die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen ist und könnte für die *in vitro* Generierung von differenzierten Kardiomyozyten von großer Bedeutung sein, wie es für einen klinischen Einsatz bei kardialen Erkrankung notwendig ist.

1.2 Zusammenfassung - Englisch

Replacement of damaged heart tissue by stem cell derived cardiomyocytes is a promising therapy approach in the treatment of ischemic heart failure. But the clinical use is limited by the small amount of embryonic stem cells (ESC) which differentiate into cardiomyocytes. Therefore, new strategies to improve the cardiac commitment of ESCs are of great importance.

Hepatocyte Growth Factor (HGF) is a pleiotropic cytokine regulating proliferation, migration and survival in different cell types. HGF and its cognate receptor are already expressed during early cardiogenesis but its role in cardiac differentiation of embryonic stem cells remains unclear.

In the present study the role of HGF in cardiac differentiation of murine embryonic stem cell was investigated. Differentiation of murine embryonic stem cells into the myocardial cell phenotype was established by cell culture techniques. These cells were immunohistochemically, morphologically and pharmacologically analysed and expression of cardiac genes in presence of different HGF concentrations was analysed by RT – PCR. ESCs treated with 20 ng/ml HGF showed a significantly up – regulation of the cardiac transcription factors Nkx2.5 and GATA 4 which are essential for cardiac differentiation. Furthermore the mRNA expression of structural cardiac genes like Alpha – and Beta MHC and MLC2v were significantly enhanced in presence of 20 ng/ml HGF. Immunostaining of the ESCs derived clusters (embryoid bodies) showed that HGF treatment significantly increased the area stained for the specific cardiac marker Troponin T by 50 % compared to untreated controls. Moreover, HGF increased significantly the number of embryoid bodies presenting one or more beating clusters affecting neither the beating frequency nor the effects of positive or negative chronotropic stimulation. HGF treatment did not affect the expression of non cardiac gene products.

The HGF induced increase in the expression of the cardiac genes Nkx2.5 and GATA 4 was completely blocked in presence of the Phosphatidylinositol 3 – kinase (PI3K) inhibitors Wortmannin and LY294002 while the inactive homolog LY303511 did not affect the HGF effect. Moreover, the co – staining for Troponin T and phospho – Akt showed that the

proportion of cardiac cells with a positive signal for phospho – Akt was significantly increased for the HGF treated cells. These results provided evidence that HGF treatment increased the cardiac differentiation of ESCs by activating the PI3K / Akt pathway.

The present work demonstrates that HGF is an important growth factor for the cardiac differentiation of embryonic stem cells and may therefore be critical for the in vitro generation of differentiated cardiomyocytes as required for clinical use of embryonic stem cells in cardiac diseases.

2 EINLEITUNG

2.1 Bedeutung von Stammzellen für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigsten Todesursachen in Industrieländern dar. Ischämische Herzerkrankungen sind für mehr als 50 % der kardiovaskulären Todesursachen verantwortlich und sind die führende Ursache für das Auftreten einer Herzinsuffizienz (Thom T et al, 2006).

Der Myokardinfarkt als akute Manifestation einer ischämischen Herzerkrankung führt zu einem irreversiblen Verlust von Kardiomyozyten durch einen thrombotischen Verschluss eines Koronargefäßes. Allein in Deutschland erleiden jedes Jahr 280000 Menschen einen Myokardinfarkt (Hamm CW et al, 2004). Abhängig von der Lokalisation und Ausprägung des Infarkts kann es zu einem myokardialen Remodeling und einer Einschränkung der Pumpfunktion des Herzens und somit zur Herzinsuffizienz kommen. Die Behandlung der ischämisch bedingten Herzinsuffizienz besteht in der frühen Phase aus der Reperfusion durch Koronarangioplastie oder Thrombolyse und in der Folgezeit aus der medikamentösen Therapie. Allerdings gibt es bisher noch keine klinische Möglichkeit, die verlorenen gegangenen Kardiomyozyten durch funktionsfähiges Gewebe zu ersetzen. Einzig im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz besteht die Möglichkeit der Herztransplantation, was allerdings durch die geringe Zahl der Spenderorgane limitiert ist (Hoppe UC et al, 2005).

Ein faszinierendes neues Therapiekonzept ist der Ersatz des geschädigten Herzgewebes durch Kardiomyozyten, die aus Stammzellen gewonnen werden könnten. Sowohl embryonale als auch adulte Stammzellen können in vivo und in vitro zu Kardiomyozyten differenzieren (Orlic D. et al. 2002). Im Tiermodell wurde nach einem Myokardinfarkt eine Verbesserung der Herzfunktion durch Transplantation undifferenzierter Stammzellen aus dem Knochenmark gezeigt (Orlic D. et al., 2001). Auch in klinischen Studien wurde bereits die intrakoronare Transplantation von Knochenmarksstammzellen (BMSC) untersucht (Lunde K et al, 2006, Schächinger V et al, 2006).

Die Ergebnisse von Schächinger V et al (2006) zeigten eine geringe, jedoch signifikante Verbesserung der mittels Ejektionsfraktion gemessenen linksventrikulären Funktion um 2.5% durch intrakoronarer Applikation von Progenitorzellen aus dem Knochenmark. Insbesondere Patienten mit einer reduzierten Ejektionsfraktion (unter 49%) hatten den größten Vorteil. Andererseits zeigte die Studie von Lunde K et al (2006), in der mononukleäre Knochenmarkszellen transplantiert wurden, keine Verbesserung der linksventrikulären Funktion.

Diesen widersprüchlichen Ergebnissen können unterschiedliche Ursachen zu Grunde liegen. Einerseits differenzieren Stammzellen nur zu einem geringen Anteil zu Kardiomyozyten. Das größte Differenzierungspotential haben embryonale Stammzellen, von denen *in vitro* 3 bis 5 Prozent zu Kardiomyozyten differenzieren (Boheler K et al, 2002). Bei der Transplantation von BMSCs ist es zudem fraglich, ob die Verbesserung der linksventrikulären Funktion überhaupt durch einen echten Zellersatz oder aber durch einen parakrinen Effekt der Knochenmarkszellen erreicht wird. Darüber hinaus ist ein Effekt einer BMSC Transplantation wesentlich von der Isolierungsmethode der BMSC abhängig, die die Funktionalität der Zellen beeinflusst (Seeger FH et al, 2007). Dies erklärt zum Teil die widersprüchlichen Ergebnisse der klinischen Studien (Lunde K et al, 2006, Schächinger V et al, 2006), in denen unterschiedliche Isolierungsmethoden genutzt wurden. Weiterhin können Stammzellen zu nicht gewünschten Zelltypen differenzieren, zum Beispiel in Narbengewebe und könnten so die Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt zusätzlich verschlechtern (Wang JS. et al., 2001). Außerdem verbleiben bei intrakoronarer Transplantation nur maximal 2.6 % der Stammzellen tatsächlich im Herzen (Hofmann M et al, 2005). Die Zahl ist insofern beachtenswert, da sich die transplantierten Stammzellen auch in andere Organe absiedeln können und dort womöglich Teratome bilden könnten (Trounson, 2002).

Daher erscheint die intrakoronare Applikation von differenzierten Kardiomyozyten, die aus Stammzellen gewonnen wurden, günstiger zu sein. Hierfür scheinen sich vor allem embryonale Stammzellen zu eignen, da sie das größte Potential zur kardiomyozytären Differenzierung besitzen. Um die Differenzierung zu Kardiomyozyten zu verstärken, müssen allerdings die optimalen Wachstumsfaktoren und Signaltransduktionsmechanismen der Kardiomyogenese erforscht werden. Erst dann wäre eine erfolgreiche klinische Anwendung möglich.

2.2 Eigenschaften und Bedeutung von Stamm- und Vorläuferzellen

Stammzellen sind durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und Selbsterneuerung („self – renewal“) und durch ihr Potential zu unterschiedlichen Zelltypen zu differenzieren definiert. Man unterscheidet zwischen embryonalen und adulten Stammzellen sowie Vorläuferzellen (Progenitorzellen). Embryonale Stammzellen (ESC) sind pluripotente Zellen, die aus der inneren Zellmasse eines Embryos im Blastozysten Stadium gewonnen werden. Sie haben ein großes Differenzierungspotential und können zu allen Zelltypen der drei embryonalen Keimblätter differenzieren. Adulte Stammzellen finden sich im postembryonalen Organismus in unterschiedlichen Geweben wie Knochenmark, Darm oder Haut und zeigen ein verglichen zu ESCs eingeschränktes Differenzierungspotential, weswegen sie als multipotent eingestuft werden (Passier R et al, 2003). Hiervon abzugrenzen sind Vorläuferzellen, die Abkömmlinge der adulten Stammzelle darstellen. Deren Differenzierungsvermögen ist oftmals auf bestimmte Gewebe reduziert, weswegen sie als uni-, bi- oder tripotent eingestuft werden.

1981 gelang es zwei unterschiedlichen Forschergruppen gleichzeitig, murine embryonale Stammzellen aus einer Blastozyste in Zellkultur zu etablieren (Evans MJ et al, 1981; Martin GR, 1981). In vitro erhalten embryonale Stammzellen ihr undifferenziertes Stadium, wenn sie in Anwesenheit des Leukemia Inhibitory factors (LIF) kultiviert werden oder mit embryonalen Fibroblasten kokultiviert werden, die diesen Faktor sezernieren (Smith AG et al, 1988). In Abwesenheit von LIF und embryonalen Fibroblasten differenzieren Stammzellen und bilden in vitro so genannte Embryoid Bodies. Dies sind dreidimensional Aggregate unterschiedlicher Zelltypen. Durch diese Aggregation kommt es zu Zellinteraktionen, was für die Differenzierung zu den verschiedenen Zelltypen mit Ausnahme der Neurogenese benötigt wird (Gepstein L et al, 2002).

Diese Embryoid Bodies gleichen dem frühen Embryo nach Implantation (Sachinidis A et al, 2003). Die Zellen des Embryoid Bodies sind Derivate der embryonalen Keimblätter Meso -, Ento - und Ektoderm (Doetschman TC et al, 1985). Bisher konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen zu Kardiomyozyten, Hämatopoetischen Zellen, Dottersackzellen, Skelett- und glatte Myozyten, Adipozyten, Chondrozyten, endotheliale Zellen, Melanozyten, Neuronen, Glia und Pankreasinzelnzellen differenzieren (Odorico JS et al, 2001).

Einerseits eignen sich ESC zur Studie der Embryonalentwicklung unterschiedlicher Zelltypen und Gewebe. Mit dem ESC Modell können die frühesten molekularen Schritte der Differenzierung analysiert werden. Dies ermöglicht neue Einblicke in das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren und Zellen bei der embryonalen Organogenese. Andererseits verhofft man sich von Stammzellen einen therapeutischen Nutzen. Hierbei haben embryonale gegenüber adulten Stammzellen große Vorteile aufgrund ihrer stärker ausgeprägten Fähigkeit zur Proliferation und ihres größeren Differenzierungspotentials. Stammzellen bieten nicht nur wie schon oben dargelegt beim Myokardinfarkt die Möglichkeit zur Zellersatztherapie, sondern auch bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen. Patienten mit Morbus Parkinson könnten mit ESCs, die zu dopaminergen Neuronen differenzieren, therapiert werden. Dies konnte schon erfolgreich im Maus Modell gezeigt werden (Kim JH et al, 2002). Ferner scheinen embryonale Stammzellen auch zur Therapie des juvenilen Diabetes mellitus geeignet zu sein. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einer irreversiblen Autoimmundestruktion der Insulin produzierenden β – Zellen des Pankreas (Classen, 2004). Murine ESCs können in vitro zu β – Zellen mit exokriner Funktion differenzieren, die bei Transplantation in Diabetes erkrankte Mäuse eine Hyperglykämie normalisieren können (Leon Quinto T et al, 2004).

Neben diesen dargestellten Erkrankungen gibt es zahlreiche andere Autoimmun-, neurologische, dermatologische und endokrine Erkrankungen, bei denen eine Zellersatztherapie mit ESCs sinnvoll wäre (siehe Übersichtsarbeit von Wobus A et al, 2005).

2.3 Kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen

Das Herz ist das erste mesodermale Organ, das im Embryo gebildet wird (Sachinidis A et al, 2002). Die Kardiogenese ist dabei ein komplexer und noch nicht vollständig verstandener Vorgang. Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über die wesentlichen Schritte der embryonalen Herzentwicklung.

Das kardiovaskuläre System entsteht ab dem 7. Tag bei der Maus und beim Menschen ab der dritten Woche der Embryonalentwicklung. Im Mesoderm differenzieren aus Blutinseln zwei Endokardschläuche, die die Vorläufer der Herzanlage bilden (Schiebler TH, 1999). Aus den Endokardschläuchen entsteht ab dem 8. Entwicklungstag der Herzschlauch, der aus Atrium primitivum, Ventriculus primitivus und Bulbus cordis primitivum (Ausflußtrakt) besteht. Durch das schnelle Längenwachstum des Herzschlauches in dieser Phase, biegt sich der Herzschlauch s-förmig und so kommt es zur Bildung der Herzscheife. Mit der Herzscheife wird die Voraussetzung für die Umwandlung des seriellen in zwei parallele Kreisläufe geschaffen. Im weiteren Verlauf kommt es durch Fusionierungen und Septierungen zur Unterteilung des ursprünglichen Schlauches in ein vierkammeriges Herz. Die Kardiogenese ist bis zur 8. Woche beim Menschen und ca. bis zum 15. Tag bei der Maus abgeschlossen (Schiebler TH, 1999).

Sowohl in der physiologischen Embryogenese als auch im Modell der embryonalen Stammzellen kommt es während der frühen kardiomyozytären Differenzierung zu einer entwicklungskontrollierten Expression herzspezifischer Genprodukte, Proteine, Ionenkanäle und Aktionspotentiale. Die frühesten Marker kardiomyozytärer Vorläuferzellen sind die Transkriptionsfaktoren GATA 4 und Nkx2.5.

GATA 4 gehört zur GATA – Familie von Transkriptionsfaktoren und ist das früheste detektierbare Gen in kardialen Vorläuferzellen. Es kodiert für ein Zinkfingerprotein, das als Transkriptionsfaktor die Expression kardialer Gene reguliert (Molkentin JD, 2000). Ein Defekt in diesem Gen beeinträchtigt zwar nicht die Ausbildung kardialer Vorläuferzellen, besitzt aber durch Missbildung des Herzschlauches eine hohe frühembryonale Letalität (Kuo CT et al, 1997).

Der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 wird ebenfalls in kardialen Progenitorzellen in frühesten Entwicklungsstufen (während der Formation der kardiogenen Zone) exprimiert (Schultheiss et al, 1995). Ein Verlust des Nkx2.5 Gens beeinflusst die Schleifenbildung während der Kardiogenese und führt zu kongenitalen Herzfehlern (Lyons I et al, 1995; Schott JJ et al, 1998). Die kardialen Transkriptionsfaktoren aktivieren synergistisch die Genexpression der kontraktilen Proteine. Hierzu gehören unter anderem das Aktin, die MHC – und MLC – Proteine, die das Myosin bilden und die Troponine. Diese Proteine bilden den kontraktilen Apparat und sind essentiell für die Funktionalität der Kardiomyozyten

Im fortgeschrittenen Differenzierungsstadium beginnen die Kardiomyozyten im Embryoid Body rhythmisch zu kontrahieren und exprimieren spezifische Ionenkanäle. Elektrophysiologische Analysen haben ergeben, dass sich in vitro unterschiedliche Herzzelltypen ausbilden: Während man im frühen Entwicklungsstadium Schrittmacherzellen findet, werden später auch atriale und ventrikuläre Zellen ausgebildet (Hescheler J. et al., 1997).

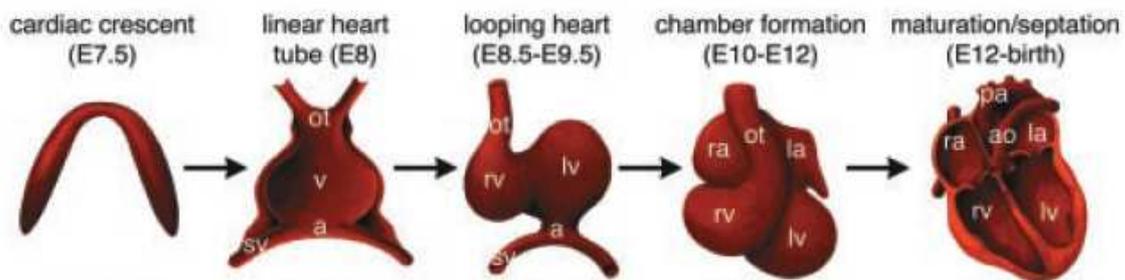


Abb. 2.1 – Übersicht über die Kardiogenese der Maus

Wesentliche Schritte der Herzentwicklung: 1. Formation der kardiogenen Zone an Tag (E) 7.5; 2. Ausbildung des Herzschlauches an E8; 3. Schleifenbildung und Initiation der Kammerformation an den Tagen 8.5 bis 9.5; 4. Kammerformation an E10 – E12 und 5. Kammermaturation, Septation und Klappenbildung. Ao: Aorta; a: Vorhof; la: Linker Vorhof; ra: Rechter Vorhof; rv: Rechter Ventrikel; lv: Linker Ventrikel; ot: Ausflußtrakt; sv: Sinus venosus; pa: Pulmonalarterie. (Modifiziert nach Bruneau B, 2002)

3 – 5 % der ESC differenzieren unter normalen Kultivierungsbedingungen zu Kardiomyozyten (Boheler K et al, 2002). Allerdings lässt sich dieser Anteil durch Zugabe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und synthetischen Chemikalien erhöhen (Heng BC et al, 2003). Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören unter anderem der Fibroblast – Growth – Factor (FGF), der Transforming Growth Factor – Beta One (TGF- β 1) und der Insulin – like – Growth Factor I (IGF I). Letzterer ist essentiell sowohl für ein normales embryonales Wachstum als auch für die Kardiogenese (Fishman MC et al, 1997). In vitro induziert IGF I die kardiomyozytäre Differenzierung über Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (Sachinidis A et al, 2002).

Aber auch einige synthetische Chemikalien zeigen Effekte. Wobus et al. (1997) konnten zeigen, dass Retinolsäure, ein Derivat des Vitamin A, die kardiomyozytäre Differenzierung vor allem zum ventrikulären Zelltyp konzentrations- und zeitabhängig verstärkt. Ebenso induziert Dimethylsulfoxid (DMSO) die Expression von GATA 4 und Nkx2.5 über eine erhöhte Expression des Prodynorphin Gens (Ventura C et al, 2000). Das Prodynorphin Gen kodiert für Dynorphin B, einem endogenen κ – Opioid. In Abwesenheit von DMSO führte die Zugabe von Dynorphin B ebenfalls zu GATA 4 und Nkx2.5 Expression. Dies lässt darauf schließen, dass endogene Opiode an der Kardiogenese beteiligt sind und dass DMSO diese Signaltransduktionskaskade aktivieren kann.

Eine Übersicht von Substanzen, die die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen verstärken können, findet sich in der Arbeit von Heng BC et al (2003).

2.4 Hepatocyte Growth Factor

Der Hepatocyte Growth Factor (HGF) wurde erstmals 1984 als Mitogen für Hepatozyten in Seren normaler und hepatektomierter Ratten gefunden (Nakamura T et al, 1984). HGF wurde später als ein heterodimeres Molekül bestehend aus einer 69 – kDA α – Kette und einer 34 – kDA β – Kette identifiziert, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind.

Während der Embryogenese ist HGF von wichtiger Bedeutung. Der HGF Rezeptor wird bereits in undifferenzierten embryonalen Stammzellen exprimiert (Schuldiner M et al, 2000). Ein Defekt im HGF Gen oder dessen Rezeptors führt zur frühen embryonalen Letalität durch gestörte Organogenese der Leber und der Plazenta (Stern CD, et al 1990; Funakoshi H et al, 2003). Zudem scheint HGF an der Kardiogenese beteiligt zu sein, da HGF und sein Rezeptor in kardialen Progenitorzellen als auch in adulten Kardiomyozyten exprimiert werden (Rappolee D. et al., 1996).

Der HGF Rezeptor ist ein c – met Proto – oncogene Produkt bestehend aus einer 50 kDA α – Kette und einer 145 – kDA β – Kette. Die α – Kette ist die extrazelluläre Bindungsstelle für HGF, während die β – Kette eine transmembranöse Untereinheit darstellt, die eine intrazelluläre Tyrosin Kinase Domäne besitzt. Die Aktivierung dieser Tyrosinkinase führt zur Phosphorylierung von Tyrosin, was wiederum zu einer Aktivierung unterschiedlicher intrazellulärer Signalmoleküle, unter anderem MEK/ERK und PI3 Kinase/Akt führt (Weidner et al, 1993), die die Effekte von der Zellmembran an den Zellkern vermitteln. Hauptsächlich in Leber und Pankreas gebildet führt HGF je nach Zelltyp zu einer Vielzahl zellulärer Reaktionen, unter anderem Mitogenese, Motogenese, Morphogenese, Angiogenese und Anti – Apoptose (Funakoshi H et al, 2002).

Die normale Serumkonzentration des HGF ist beim Menschen 0.3 – 0.4 ng/ml. Diese kann allerdings bei unterschiedlichen Erkrankungen deutlich ansteigen. So werden nach einem akuten Myokardinfarkt HGF Konzentration von 9.4 bis 13.1 ng/ml gemessen (Matsumori A. et al., 1996). Außerdem kommt es zu einer verstärkten Expression des c – met Rezeptors im Randzonenbereich des Infarkts (Ueda H. et al, 2001).

Ein kardioprotektiver Effekt des HGFs konnte an Ratten demonstriert werden, bei denen endogenes HGF durch einen spezifischen Antikörper neutralisiert wurde. Wurde in diesen Ratten künstlich ein Myokardinfarkt ausgelöst, kam es zu einem vergrößertem Infarktgebiet und zu einer Mortalitätssteigerung um 50% (Nakamura T. et al., 2000). Zusätzlich scheint HGF angiogenetisch zu wirken und so zusätzlich zur Kardioprotektion beizutragen (Morishita R et al, 2004). Diese Effekte konnten auch bei der Transplantation mesenchymaler Stammzellen, die HGF überexprimieren, beobachtet werden, wodurch es zur Verbesserung der myokardialen Funktion nach Myokardinfarkt kam (Duan HF et al, 2003). Die Autoren begründeten die Funktionsverbesserung durch Regeneration nekrotisierter Kardiomyozyten und durch verbesserte Koronardurchblutung.

Diese Kardioprotektion scheint über den MEK - ERK Pathway und nachfolgender Phosphorylierung von GATA 4 reguliert zu sein (siehe Abb. 2.2). Phosphoryliertes GATA 4 verstärkt die Expression des anti - apoptotische Proteins Bcl - X_L und verhindert dadurch die durch oxidativen Stress induzierte Apoptose in Kardiomyozyten (Kitta K. et al., 2003).

In einer Studie von Schuldiner et al. (2000) wurden die Effekte von 8 Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen untersucht. Hier wurde gezeigt, dass HGF die Expression unterschiedlicher Genprodukte des Mesoderms, Ektoderms und Endoderms verstärkte. Allerdings gibt es bisher noch keine Studien, in denen die kardiomyozytäre Differenzierung in Gegenwart von HGF hinreichend untersucht wurde.

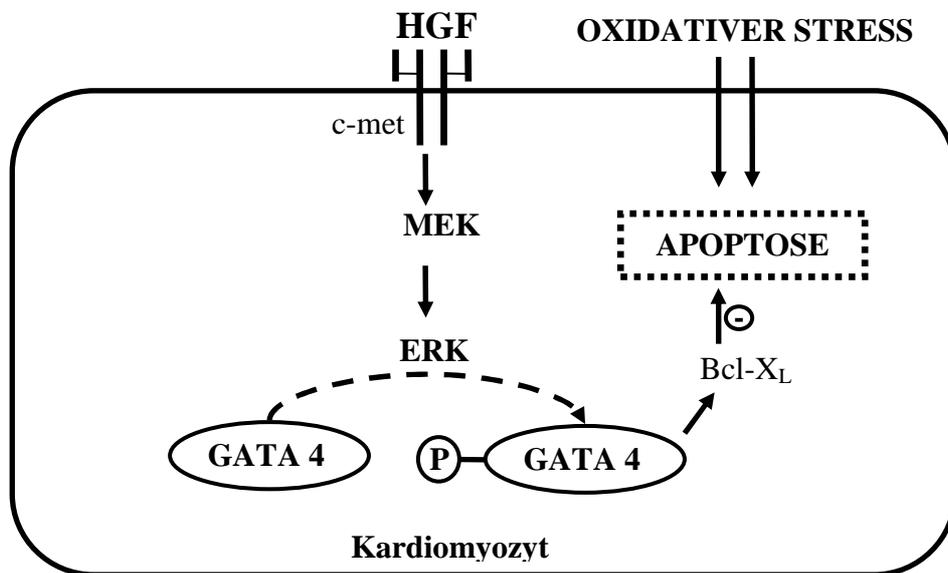


Abb. 2.2 - Mechanismus der durch HGF vermittelten Anti – Apoptose

Bindung von HGF an dessen Rezeptor c - met führt im Kardiomyozyten mittels des intrazellulären MEK / ERK Signaltransduktionsweges zur Phosphorylierung von GATA4, welches die Expression des anti – apoptotischen Proteins Bcl-X_L verstärkt (nach Kitta K et al, 2003 und Ueda H et al, 2001).

2.5 Fragestellung der vorgelegten Arbeit

Bisher gibt es noch keine Daten über den Effekt des Hepatocyte Growth Factors (HGF) auf die Differenzierung embryonaler Stammzellen (ESC). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll daher die Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen der Maus in Anwesenheit von HGF untersucht werden. Dabei sollen im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Stimulation der ESC mit HGF auf das Auftreten und die Frequenz von kontrahierenden Kardiomyozyten in den differenzierenden Zellaggregaten (Embryoid Bodies)? Weiterhin sollte die chronotrope Antwort auf pharmakologische Stimulationen analysiert werden.

Embryoid Bodies in An- und Abwesenheit von HGF werden an den Differenzierungstagen 7 bis 14 lichtmikroskopisch auf das Auftreten kontrahierender Kardiomyozyten geprüft und gegebenenfalls die Frequenz bestimmt. Am 10. Differenzierungstag werden kontrahierende Embryoid Bodies \pm HGF mit dem β – Adrenorezeptor Agonist Isoprenalin, dem muskarinergen Agonisten Carbachol und dem If – Kanal Blocker Ivabradine stimuliert und die chronotrope Antwort bestimmt.

2. Welchen Einfluss hat HGF in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Expression herzspezifischer Genprodukte?

Dies wird anhand embryonaler Stammzellen des 7. Differenzierungstages, die in Anwesenheit von 0, 3, 10, 20 und 30 ng/ml HGF kultiviert wurden, untersucht. Ein semiquantitativer Nachweis kardialer mRNA wird mittels reverser Transkription und Polymerasenkettenreaktion durchgeführt. Die untersuchten kardialen Gene sind Nkx2.5, GATA 4, Troponin T, Alpha – und Beta – MHC.

3. Welchen Einfluss hat eine Stimulation der ESC mit HGF auf die Expression kardialer und nicht - kardialer Genprodukte in unterschiedlichen Differenzierungsstadien hat?

Dies wird anhand von ESC \pm HGF an den Differenzierungstagen 8, 9, 10, 12 und 14 untersucht. Ein semiquantitativer Nachweis kardialer und nicht - kardialer Gene wird mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Die untersuchten kardialen Gene sind Nkx2.5, GATA 4, Troponin T, ANF, MLC2v, Alpha – und Beta – MHC. Als nicht – kardiale mesodermale Gene wird FLK-1, VE-Cadherin und α – SMA analysiert. Als ektodermaler Marker dient 68-NFL und als endodermaler Marker Albumin.

4. Über welche Signaltransduktionsmechanismen induziert HGF gegebenenfalls eine kardiomyozytäre Differenzierung? Dabei soll insbesondere geklärt werden, ob HGF in embryonalen Stammzellen den Phosphatidylinositol 3-kinase / Akt Mechanismus aktiviert.

Hierfür werden embryonale Stammzellen in Gegenwart eines PI3K Inhibitor \pm HGF kultiviert. Um die PI3K zu inhibieren werden der fungale Metabolit Wortmannin und der synthetische Hemmstoff LY294002 genommen. Als Kontrolle dient LY303511, welches das inaktive Homolog von LY294002 ist. Es werden die mRNA – Expressionen von Nkx2.5, GATA 4, Alpha - und Beta - MHC mittels qualitativer RT – PCR analysiert.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Zellkultivierung embryonaler Stammzellen

3.1.1 Embryonale Stammzellen der Maus.

Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um klonale embryonale Stammzellen der Linie ES – D3 (ATCC, cat. Number CRL-1934). Sie wurden aus der Blastozyste einer 129/Sv+c/+p Maus (*Mus musculus*) entnommen und zur Lanzzeltaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert. Sämtliche Experimente wurden mit Zellen der 30. – 45. Passage durchgeführt.

Die Zellkulturarbeiten wurden an sterilen Werkbänken (Herasafe, Heraeus) mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Zur Prüfung des Zellwachstums diente ein Lichtmikroskop (CK2, Olympus). Die Zellen wurden in Gewebekulturschalen (Ø 6 und 10 cm) im Brutschrank (HeraCell 150, Heraeus) bei 37° C in einer Wasserdampf gesättigten 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

3.1.2 Kultivierung der undifferenzierten Stammzellen

Um die embryonalen Stammzellen in einem undifferenzierten Status zu halten, wurden diese mit inaktivierten embryonalen Fibroblasten der Maus (Charles River Laboratories Inc.) in Gegenwart von Leukemia Inhibitory Factor (LIF) kokultiviert. LIF ist ein Glykoprotein, das zur Familie der Interleukin 6 Zytokine gehört. Murine ESC verbleiben im undifferenzierten Stadium durch die LIF – abhängige Aktivierung des JAK / STAT3 Signaltransduktionsmechanismus (Niwa H et al, 1998).

Kultivierung der undifferenzierten ESC, Tag 1:

Embryonale Stammzellen wurden mit embryonalen Fibroblasten der Maus (MEF) kokultiviert. Zu diesem Zweck wurden die MEF 48 Stunden zuvor in Zellkulturschalen (\varnothing 10 cm) ausplattiert und im Brutschrank kultiviert. Nach lichtmikroskopischer Prüfung auf Konfluenz, wurden die MEF zur Hemmung der mitotischen Aktivität 2 Stunden mit Mitomycin C (0.01 mg/ml) im Brutschrank inkubiert. 3 Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm) wurden mit einer Gelatinelösung für 30 min benetzt. Anschließend wurde die Gelatinelösung entfernt und mit 2.5 ml MEF Medium aufgefüllt. Nach der 2 – stündigen Inkubation wurde die mit Mitomycin C inkubierte MEF – Platte mit PBS gespült (3 x 10 ml) und für 30 Sekunden mit einer Trypsin Lösung (2 ml) versetzt. Dann wurden die MEF mit 2 ml Medium versetzt, abgeschabt und resuspendiert. Von dieser Suspension wurden jeweils 0,5 ml in die 3 mit Gelatine beschichtete Platten gegeben und diese so genannten „Feeder Layer“ Platten für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde das Wachstum der Fibroblasten lichtmikroskopisch geprüft und eine dieser Feeder - Layer – Schalen mit 2 ml ES – Medium befüllt. Embryonalen Stammzellen wurden aufgetaut, in 5 ml ES – Medium zentrifugiert (1000 U/min, 5 min), der Überstand entfernt, das Sediment mit 1 ml ES – Medium mit der Pipette resuspendiert und zur Feeder – Layer – Schale gegeben. Weitere MEF wurden durch Trypsinierung subkultiviert und für 48 h inkubiert.

Kultivierung der undifferenzierten ESC, Tag 2:

Das ES - Medium der Stammzellen wurde gewechselt und die Zellen für 1 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die ESC im Verhältnis 1:2 auf die Feeder Layer Schalen des Vortages gesplittet. Dazu wurde 1ml Trypsin – EDTA Lösung (1:1 Verhältnis) für 30 Sekunden auf die ESC gegeben. Die Trypsin Lösung wurde entfernt, mit 1 ml ES – Medium inaktiviert, die Zellen von der Schale abgeschabt und mittels einer Pipette resuspendiert. Jeweils 0.5 ml dieser Suspension wurden dann auf die zwei mit 2.5 ml ES – Medium beschichteten Feeder Layer gegeben und 24 h im Brutschrank kultiviert.

Kultivierung der undifferenzierten ESC, Tag 3:

Das ES – Medium der ESC wurde gewechselt und die Zellen 2 h inkubiert. Subkultivierte MEF wurden wie schon am ersten ESC – Kulturtag mitotisch gehemmt (0.01 mg/ml Mitomycin C, 2h), durch Trypsinierung auf 4 mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen (Ø 6 cm) ausplattiert und 2 h inkubiert, um sie als Feeder Layer für die ESC zu nutzen. Die ESC wurden trypsiniert (Trypsin : EDTA 1:1) und im Verhältnis 1:2 auf die Feeder Layer Platten verteilt.

Kultivierung der undifferenzierten ESC, Tag 4:

Stammzellen in diesem Kultivierungsstadium wurden zur Differenzierung eingesetzt (siehe 3.1.3). Nicht benötigte ESC wurde eingefroren. Dazu wurden jede Zellkulturschalen mit PBS gespült, trypsiniert (1 ml Trypsin – EDTA), abgeschabt, in ES Medium resuspendiert (5ml) und in entsprechenden Gefäßen zentrifugiert (1000 U/min, 5min). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt, das Sediment in 1 ml Freezing Medium resuspendiert und in einem Cryo tube gefüllt. Das Einfrieren erfolgte in einem Freezing Container (Sigma) im -80°C Tiefkühlschrank, wodurch eine Kühlung von 1°C pro Minute erreicht wurde. Nach 24 Stunden wurden die Cryo tubes in flüssigen Stickstoff umgesetzt.

3.1.3 Differenzierung

Die Differenzierung der embryonalen Stammzellen wurde mittels „Hanging drop“ Methode durchgeführt (Siehe Abbildung 3.1).

Differenzierung Tag 0, Start der Differenzierung:

Undifferenzierte ESC des 4. Kultivierungstages wurden mit PBS gespült, trypsiniert (Trypsin – EDTA 1:1), mit 2 ml Differenzierungsmedium verdünnt, mittels Neubauer Kammer gezählt und zu einer Konzentration von 20000 Zellen / ml mit Differenzierungsmedium verdünnt. Je nach Bedingung wurde HGF in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Tropfen von 20 μ l (entsprechend 400 Zellen) wurden auf den Deckel einer Petrischale (\varnothing 10 cm) gegeben, die mit 10 ml PBS gefüllt war, um eine Austrocknung zu verhindern (vgl. Abb. 1). Diese „Hanging Drops“ wurde dann für 48 h im Brutschrank kultiviert.

Differenzierung Tag 3:

Die formierten Embryoid Bodies, die aus Zellen aller drei Keimblätter bestehen, wurden mit Differenzierungsmedium von den Deckeln gespült und in neue Petrischalen (\varnothing 10 cm) transferiert. Die Petrischalen wurden mit Differenzierungsmedium zu einem Gesamtvolumen von 10 ml aufgefüllt und gegebenenfalls HGF hinzugefügt. Diese Suspension wurde für 72 h im Brutschrank kultiviert.

Differenzierung Tag 5:

Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm) wurden mit Gelatine beschichtet und mit Differenzierungsmedium (3ml) \pm HGF aufgefüllt. Jeweils 20 Embryoid Bodies wurde aus der Suspension mittels einer Pipette in eine mit Gelatine beschichtete Schale transferiert und im Brutschrank kultiviert. Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel mit entsprechender HGF Zugabe.

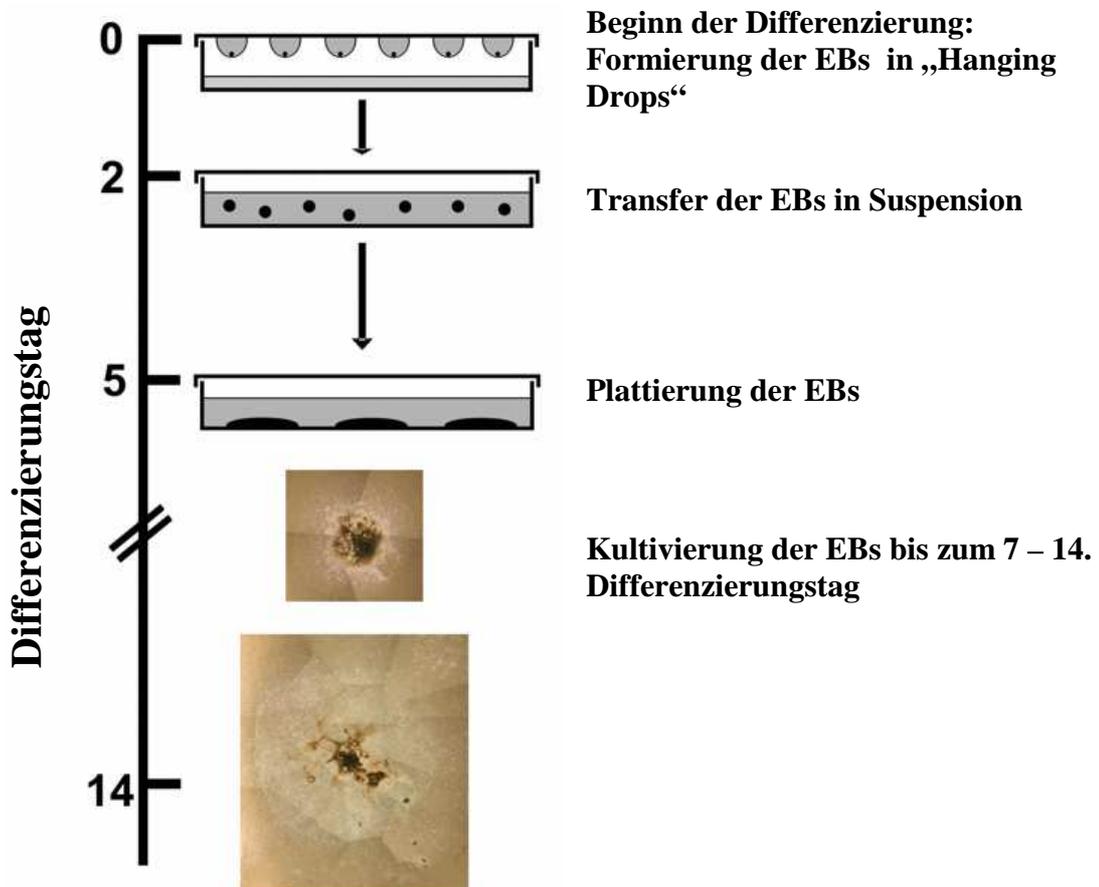


Abb. 3.1: Protokoll zur Differenzierung embryonaler Stammzellen in vitro

Die Differenzierung der ESCs wurde in Abwesenheit von LIF und MEF in hängenden Tropfen von je 400 Zellen induziert. Die so formierten Embryoid Bodies wurden nach 2 Tagen in Suspension transferiert und nach weiteren 3 Tagen in Gelatine beschichtete Zellkulturschalen ausplattiert. Die ESC wurde bis zum maximal 14. Differenzierungstag mit regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert.

3.1.4 Verwendete Medien

PBS:

Destilliertes Wasser mit 171 mM NaCl, 3.4 mM KCl, 1.84 mM KH_2PO_4 , 10.14 mM Na_2HPO_4

MEF Medium:

D-MEM (+ 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX™ I + Pyruvate) mit 15 % Foetal Bovine Serum, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin

ES – Medium:

D-MEM (+ 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX™ I + Pyruvate) mit 15 % Foetal Bovine Serum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0.1 mM Nicht Essentielle Aminosäuren, 10 µM Beta – MEOH und 10 ng/ml LIF

Differenzierungsmedium:

D-MEM (+ 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX™ I + Pyruvate) mit 20 % Foetal Bovine Serum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0.1 mM Nicht Essentielle Aminosäuren und 10 µM Beta – MEOH

Freezing Medium:

D-MEM (+ 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX™ I + Pyruvate) mit 20 % Foetal Bovine Serum, 8% DMSO, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0.1 mM Nicht Essentielle Aminosäuren, 10 µM Beta – MEOH und 10 ng/ml LIF

Trypsin Lösung:

7.2 U/ml Trypsin Pulver in PBS gelöst

Gelatine Lösung:

0.1 % Gelatine Pulver in PBS gelöst

3.2 Funktionelle Charakterisierung

3.2.1 Bestimmung der Schlagfrequenz

Das Auftreten kontrahierender Kardiomyozyten in den Embryoid Bodies wurde lichtmikroskopisch unter 10 - facher Vergrößerung untersucht.

Die Frequenz der schlagenden Zellen wurde ermittelt, indem die die Kontraktionen für 60 Sekunden gezählt wurden. Es wurden insgesamt 900 Embryoid Bodies ausgezählt.

3.2.2 Pharmakologische Stimulationen

Die kontrahierenden Kardiomyozyten der Embryoid Bodies wurden in vitro mit den Substanzen Isoprenalin, Carbachol und Ivabradine stimuliert. Dabei wurde das jeweilige Pharmakon in der entsprechenden Konzentration in das Kulturmedium der Zellen gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Kontraktionsfrequenz der Embryoid Bodies gezählt.

3.3 Untersuchung der Gen – Expression

3.3.1 Isolation der RNA

Zur Messung der mRNA - Expression wurde die Gesamt – RNA aus den Zellen isoliert. Die Embryoid Bodies wurden mittels einer kommerziell erhältlichen RNA – Isolationslösung (peqGold RNAPure) von der Zellkulturschale abgeschabt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert.

Durch Zugabe von Chloroform wurden die Proteine abgetrennt. Die RNA wurde durch eine Isopropanolpräzipitation konzentriert und durch 75% Ethanol gereinigt. Anschließend wurden die RNA Pellets in RNase- freiem Wasser aufgelöst.

3.3.2 Reverse Transkription

Die RNA – Expression kann durch Polymerase Kettenreaktion erfasst werden, in dem man von der isolierten RNA eine reverse Transkription herstellt, wodurch die RNA in die komplementäre DNA umgeschrieben wird. Zur Synthese einer einzelsträngigen cDNA wurde ein kommerziell erhältliches Reverse Transkriptase Kit genutzt (Omniscript[®] Reverse Transcription, Qiagen). Es wurden 2 µg Gesamt – RNA in die Reaktion eingesetzt. Zusätzlich enthielt das Reaktionsgemisch (20 µl) einen Oligo-dT Primer (1 µM), je 500 µM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP, 10 U RNase Inhibitor, 4 U Omniscript Reverse Transkriptase, den mit dem Enzym erhältlichen Reaktionspuffer und RNase – freies Wasser. Dieses Reaktionsgemisch wurde zuerst für 60 min in einem Wasserbad bei 37° C inkubiert, dann 5 min in einem Heizblock bei 93° C erhitzt und schließlich im Eisbad abgekühlt.

3.3.3 Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase – Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zum Nachweis gering exprimierter mRNA und DNA Spezies. Hierzu bedient man sich spezifischer Oligonukleotide, die als Primer im Überschuss in eine Polymerase – DNA – Synthesereaktion eingesetzt werden. Das relevante RNA / DNA – Fragment fungiert als Matrize für die Primer.

Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen der Reaktion wiederholt sich dieser Vorgang und produziert exponentiell neue DNA – Fragmente. Die Quantität der aus der PCR resultierenden cDNA ist von der eingesetzten Menge an RNA, der Zyklenzahl, den jeweiligen Bedingungen in jedem Reaktionsgefäß, den angewendeten Temperaturen und von der Expression der interessierenden RNA abhängig. Daher müssen sämtliche genannten Bedingungen konstant gehalten werden, um verschiedene Probe vergleichen zu können und um Rückschlüsse auf die Expression zu erlangen. Dies wird zusätzlich durch einen externen Standard kontrolliert. Der externe Standard ist ein Gen, welche unter Standardbedingungen in den jeweiligen Zellen nicht reguliert wird. Ein solches Gen in embryonalen Stammzellen ist das β – Tubulin.

Ein Aliquot der Reversen Transkriptase – Reaktion (1µl) wurde in die PCR eingesetzt. Weiterhin bestand der Reaktionsansatz aus 1.5 U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris, 50 mM KCL pH 8.8, DMSO (5% Endkonzentration), je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 0.4 µM der verwendeten Oligonukleotid – Primer (siehe Tabelle 3.1). Der Ansatz wurde mit RNase – freiem H₂O auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Da die Reaktion in einem Thermozykler mit Heizdeckel (Px2 Thermal Cyclor, Thermo Electron Corporation) durchgeführt wurde, konnte auf eine Ölschicht verzichtet werden. Das Temperaturprofil zur Amplifikation sah wie folgt aus:

- Initialisierung: 95° C, 5 min
- Denaturierung: 95 °C, 40 s
- Annealing: siehe Tabelle 3.1, 40 s
- Elongation: 72° C, 40 s
- Endphase: 72° C, 10 min

Denaturierung, Annealing und Elongation wurde für den jeweiligen Oligonukleotid – Primer in der Tabelle 3.1 angegebenen Zyklenzahl durchgeführt. Für die Primer der mRNA von MLC2v, FLK-1, VE – Cadherin, 68 – NFL, Alpha – SMA und Albumin dauerte die Denaturierungs- und Annealingperiode jeweils 45 s und die Elongationsperiode 1 min. Die PCR – Zyklen – Zahlen wurden so gewählt, dass sich die Reaktion im exponentiellen Bereich befand. Um eine Kontamination der RNA mit genomischer DNA zu überprüfen, wurden jeweils RNA Proben ohne Reverse Transkription zur PCR genommen.

Primer	Primersequenz	AT	Z	L
<i>Beta – Tubulin</i>	For 5' –TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC-3'	60 ° C	21	317
	Rev 5' –GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC-3'			
<i>Nkx 2.5</i>	For 5' –CGA CGG AAG CCA CGC GTG CT-3'	60 ° C	28	181
	Rev 5' –CCG CTG TCG CTT GCA CTT G-3'			
<i>GATA 4</i>	For 5' –CTC GAT ATG TTT GAT GAC TTC T-3'	54 ° C	25	345
	Rev 5' –CGT TTT CTG GTT TGA ATC CC-3'			
<i>Alpha – MHC</i>	For 5' –GGA AGA GTG AGC GGC GCA TCA AGG-3'	64 ° C	28	301
	Rev 5' –CTG CTG GAG AGG TTA TTC CTC G-3'			
<i>Beta – MHC</i>	For 5' –GCC AAC ACC AAC CTG TCC AAG TTC-3'	64 ° C	28	205
	Rev 5' –TGC AAA GGC TCC AGG TCT GAG GGC-3'			
<i>ANF</i>	For 5' –AGG ATT GGA GCC CAG AGT GGA CTA GG-3'	64 ° C	28	203
	Rev 5' –TGA TAG ATG AAG GCA GGA AGC GGT-3'			
<i>Troponin T</i>	For 5' –CTG AGA CAG AGG AGG CCA AC-3'	58 ° C	30	231
	Rev 5' –TTC TCG AAG TGA GCC TCG AT-3'			
<i>MLC 2v</i>	For 5' –GCC AAG AAG CGG ATA GAA G-3'	54 ° C	34	499
	Rev 5' –CTG TGG TTC AGG GCT CAG TC-3'			
<i>FLK – 1</i>	For 5' –CCT ACC CCA CAC ATT ACA TGG-3'	57 ° C	28	199
	Rev 5' –TTT TCC TGG GCA CCT TCT ATT-3'			
<i>VE -Cadherin</i>	For 5' –CCC GTC TTT ACT CAA TCC ACA-3'	57 ° C	28	197
	Rev 5' –GGG TTT GAT GAT ACC CTC GTT-3'			
<i>68 - NFL</i>	For 5' –CCA GGA AGA GCA GAC AGA GGT-3'	59 ° C	28	302
	Rev 5' –GTT GGG AAT AGG GCT CAA TCT-3'			
<i>Alpha – SMA</i>	For 5' –ACT ACT GCC GAG CGT GAG ATT-3'	55 ° C	27	448
	Rev 5' –GTA GAC AGC GAA GCC AAG ATG-3'			
<i>Albumin</i>	For 5' –GTC TTA GTG AGG TGG AGC AT-3'	58 ° C	35	568
	Rev 5' –ACT ACA GCA CTT GGT AAC AT-3'			

Tabelle 3.1 – Oligonukleotid – Primersequenzen für RT – PCR. AT: Annealing Temperatur; Z: Zyklenzahl; L: Länge [bp]; Alpha MHC: alpha myosin heavy chain; Beta-MHC: beta myosin heavy chain; ANF: Atrialer natriuretischer Faktor; MLC2v: myosin light chain 2 ventricular; FLK-1: Fetal liver kinase 1; VE-Cadherin: Vascular endothelial cadherin; 68-NFL: neurofilament protein (68 kDA); Alpha-SMA: vascular smooth alpha-actin.

3.3.4. Gelelektrophorese der DNA

Jeweils 16 µl der PCR – Produkte wurden mit 4 µl DNA Gel Ladepuffer versetzt und in einem 1 % Agarosegel, das Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) enthielt, aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit einem Tris – Acetat – Elektrophoresepuffer (TAE) (0.04 M Tris – Acetat, 0.001 M EDTA (pH 8.0)) angesetzt, welcher sich ebenfalls in der Gelelektrophoresekammer befand. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 70 V. Pro Slot wurden 20 µl PCR – Produkt – Ladepuffer – Gemisch aufgetragen. Der DNA Ladder (100-850 bp, Invitrogen) wurde entsprechend der Herstellerangaben angesetzt und in einem Volumen von 7 µl pro Slot aufgetragen.

3.3.5. Densitometrie und Fotografie

Die Fotografien der Agarosegele wurden mit Hilfe des UVP ImageStore 7500 – Systems (Sony) erstellt. Die Ethidiumbromid – gefärbten Agarosegele wurden über UV – Durchlicht mit der Videokamera des Systems fotografiert und die Fotos als TIFF – Dateien auf Diskette gespeichert. Die Fotos wurden mit dem Programm UVP Labworks Analysis Software ausgewertet.

Bei den gezeigten Fotos erfolgte eine Bildbearbeitung mit dem Programm Corel Photo-Paint 12, die sich auf die Auswahl und Ausrichtung des Bildausschnitts beschränkte. Andere Manipulationen wurden an den Bildern nicht vorgenommen.

3.4 Immunchemische Färbungen

Die Immunfärbung ist eine Methode, mit der Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht werden können.

Embryoid Bodies, die in vitro am 5. Differenzierungstag auf Deckgläser plattiert wurden, wurden für 10 min mit einer PBS Lösung mit 3,7% Paraformaldehyd fixiert. Danach wurde sie zweimalig mit eiskaltem PBS gespült, mit PBS Lösung mit 0.1% Igepal und 1% BSA 30 min lang bei Raumtemperatur geblockt und anschließend mit Anti-Troponin T (Verdünnung 1:200) ± Anti-phospho-Akt (Verdünnung 1:100) als Primärantikörper für 2h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C mit dem entsprechenden Sekundärantikörper, wurde die zelluläre Lokalisation der Proteine unter einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert. Die Quantifizierung der gefärbten Fläche erfolgte mittels der Lucia G Software (Laboratory imaging) und wurde auf die Gesamtfläche der Embryoid Bodies normalisiert.

3.5 Statistik

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels des Student's T-Test oder ANOVA bestimmt. Statistische Signifikanz wurde für $p < 0.05$ angenommen.

3.6 Verwendete Substanzen

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen
Agarose Pulver	Gibco
Anti – Phospho – Akt Antikörper	Cell Signaling
Anti – Troponin T Antikörper	Roche Diagnostics
Beta – Mercaptoethanol	Serva
Carbachol	Sigma – Aldrich
Chloroform	Merck KGaA
Dimethylsulfoxide, minimum 99.5% GC	Sigma - Aldrich
Di – Natriumhydrogenphosphat wasserfrei	Merck KGaA
DNA Molecular weight marker	Invitrogen
Ethanol	Merck KGaA
Ethidiumbromid	Serva
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma - Aldrich
Gelatine from porcine skin	Fluka
Hepatocyte Growth Factor	Acris
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA
Kaliumchlorid	Merck KGaA
Gelatine 1%	Fluka
Gibco D-MEM + 4500 mg/l Glucose + GlutaMAX™ I + Pyruvate	Invitrogen
Gibco Foetal Bovine Serum	Invitrogen
Gibco MEM Non-Essential Amino Acids (100X)	Invitrogen
IGEPAL	Sigma - Aldrich
Isoprenalin	Sigma - Aldrich
Isopropanol	Merck KGaA
Ivabradine	Servier
LY294002	Alexis Biochemicals
LY303511	Alexis Biochemicals
Mitomycin C	Serva
Monoclonal Anti – Rabbit IgG FITC	Sigma - Aldrich
Natriumchlorid	VWR International
Omniscrypt Reverse Transkriptase Kit	Qiagen
Paraformaldehyd	Sigma - Aldrich
PeqGOLD dNTP – Mix	Peqlab
PeqGOLD Universal Agarose	Peqlab
PeqGOLD RNAPure	Peqlab
Penicillin – Streptomycin	Invitrogen
Primer für PCR	MWG Biotech
Recombinat Mouse Leukemia Inhibitory Factor	Chemicon International
SAWADY Taq – DNA – Polymerase	Peqlab
Trishydroxymethylaminomethanacetat (Tris-Acetat)	Sigma - Aldrich
Trypsin 1:250 from bovine pancreas	Sigma - Aldrich
Wortmannin	Calbiochem

4 ERGEBNISSE

4.1 Morphologische Untersuchungen

Die Morphologie der undifferenzierten Stammzellen und der Embryoid Bodies wurden mittels lichtmikroskopischer Aufnahmen untersucht. Abbildung 4.1a zeigt die undifferenzierten embryonalen Stammzellen in Kokultur mit embryonalen Fibroblasten. Zu beachten ist die gleichmäßige Morphologie der Stammzellen. In der Abbildung 4.1b sieht man den aus differenzierenden Stammzellen entstandenen Embryoid Body am 7. Differenzierungstag. Unter 10 – facher Vergrößerung fällt die unterschiedliche Morphologie der Zellen auf, was die Koexistenz mehrerer Zelltypen demonstriert.

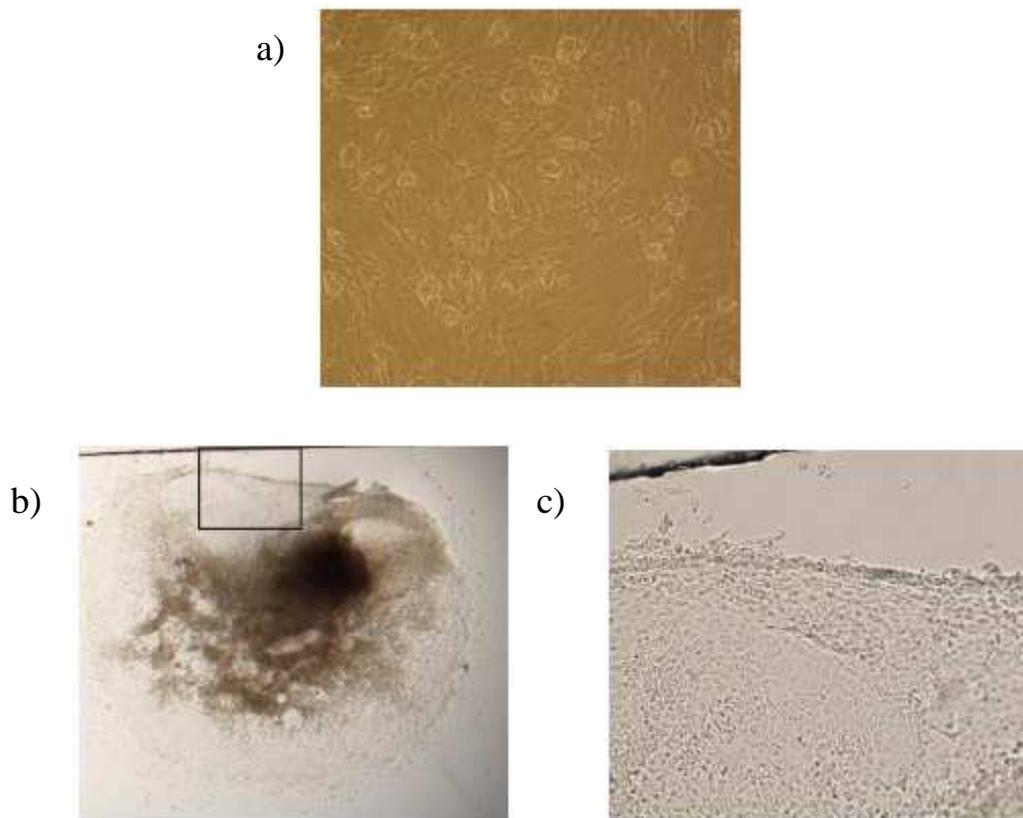


Abb. 4.1 – Morphologie von undifferenzierten und differenzierten embryonalen Stammzellen.
a) Undifferenzierte mESC in Kokultur mit embryonalen Fibroblasten (10x). b) Embryoid Body am 7. Differenzierungstag (2x). c): Differenzierte Stammzellen (10x) aus dem markierten Bereich des EB.

Um zu untersuchen, ob HGF die Morphologie und das Wachstum der Embryoid Bodies beeinflusst, wurde exemplarisch ein Embryoid Body aus der Kontrollbedingung und ein Embryoid Body in Gegenwart von 20 ng/ml HGF an mehreren Differenzierungstagen lichtmikroskopisch fotografiert. Da die Embryoid Bodies ab dem 7. Differenzierungstag zu groß für die 4 – fach Vergrößerung des Mikroskops waren, wurden mehrere einzelne Bilder gemacht und diese dann mittels einer Bildbearbeitungssoftware zusammengefügt.

Abbildung 4.2 zeigt die Fläche der beiden Embryoid Bodies während ihrer Differenzierung. Man erkennt, dass die Flächenzunahme beider Embryoid Bodies ähnlich ist. Bis zu dem 10. Differenzierungstag nimmt die Fläche zu und bleibt während der folgenden Tage konstant. In Abbildung 4.3 sind die Fotografien der EBs an den Differenzierungstagen 6, 8, 10 und 12 zu sehen. Embryoid Bodies beider Bedingungen bilden charakteristischerweise einen zentralen Bereich nekrotischer Zellen. Erfahrungsgemäß befinden sich die kontrahierenden Kardiomyozyten häufig in Nähe der zentralen Nekrose. Einen morphologischen Unterschied durch die Anwesenheit von HGF konnte in den Embryoid Bodies nicht festgestellt werden.

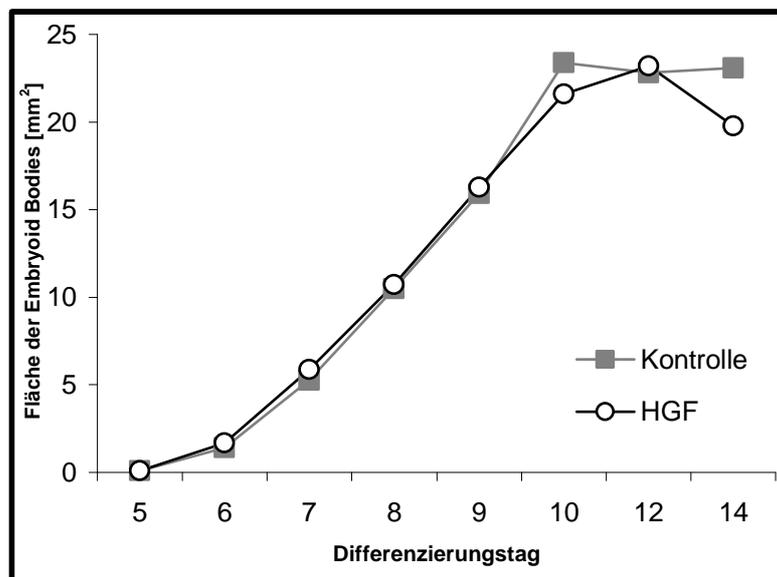


Abb. 4.2 - Fläche der Embryoid Bodies [mm²].
Kontrolle: EB ohne HGF; HGF: EB + 20 ng/ml HGF; n = 1.

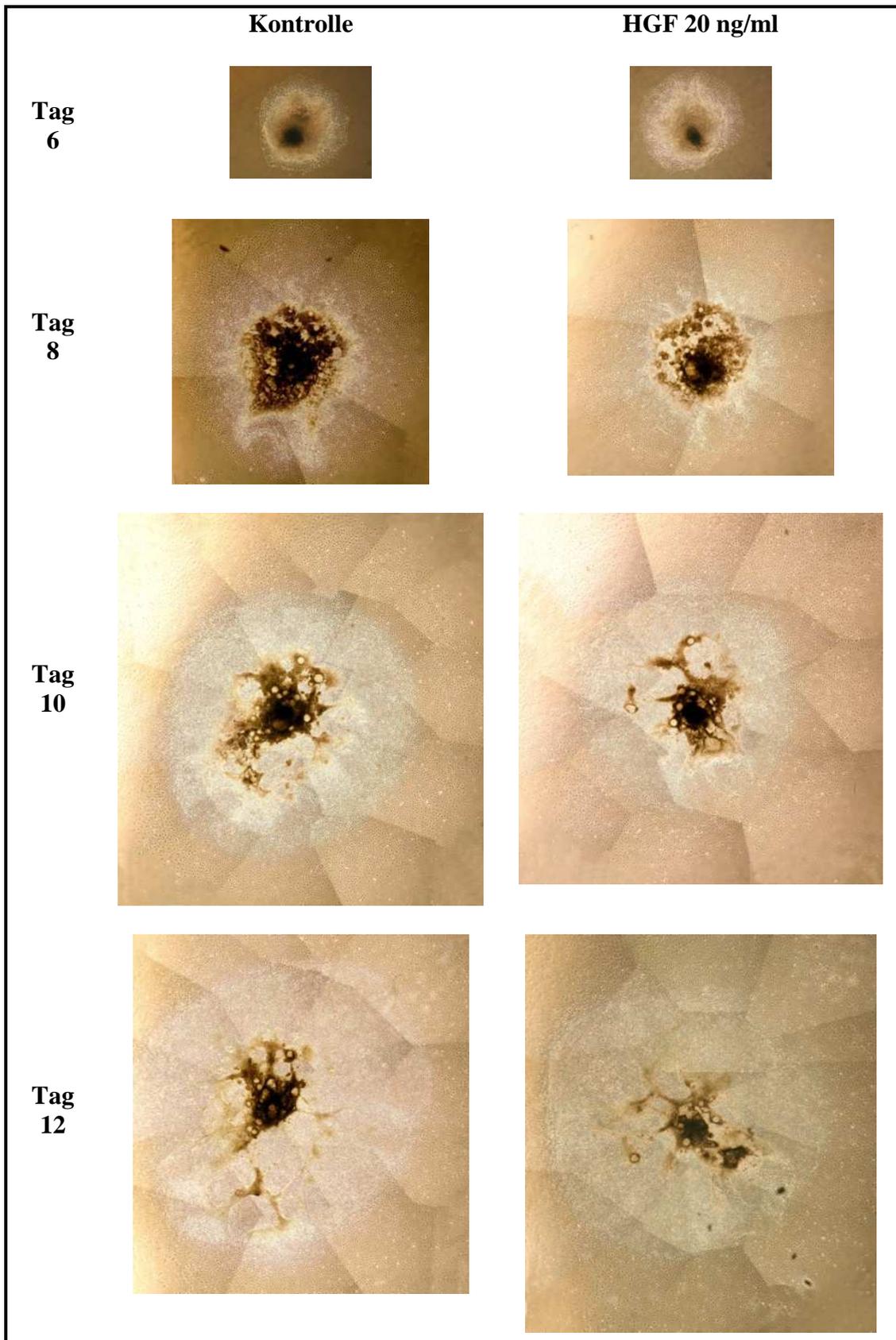


Abb. 4.3 – Lichtmikroskopische Bilder (4 x).

Kontrolle: EB ohne HGF; HGF: EB + 20 ng/ml HGF; Tag: Differenzierungstag.

4.2 Funktionelle Charakterisierung

4.2.1. Kontrahierende Kardiomyozyten

Die zu Kardiomyozyten differenzierten Zellen im Embryoid Body zeigen im fortgeschrittenen Differenzierungsstadium (ab Tag 9) spontan rhythmische Kontraktionen.

In Abbildung 4.4 ist der Prozentsatz der Embryoid Bodies mit mindestens einem spontan kontrahierenden Areal während der ersten 14 Differenzierungstage dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Anzahl der EB mit einem oder mehreren solcher Areale in Gegenwart von 20 ng/ml HGF bereits an dem 9. Differenzierungstag mehr als doppelt so hoch war, verglichen mit der Kontrollbedingung (44.1 % vs. 15.4 %, $p < 0.05$). Dieser Trend setzte sich bis zum 12. Differenzierungstag fort, an dem 93.1 % der mit HGF behandelten Embryoid Bodies spontan kontrahierten verglichen mit nur 64.1 % der Kontroll – EB ($p < 0.05$).

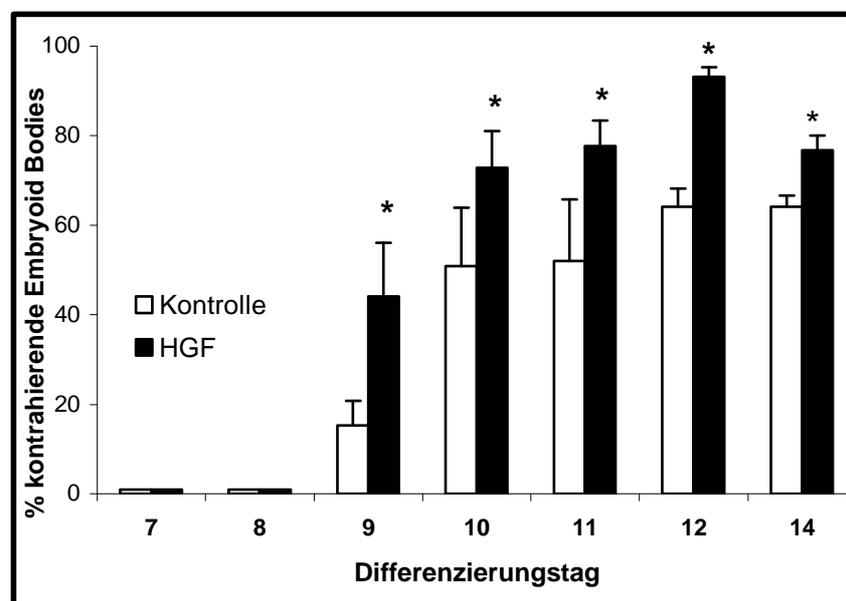


Abb. 4.4 - Lichtmikroskopische Analyse:

Anteil der Embryoid Bodies mit einem oder mehreren kontrahierenden Zellansammlungen an den Differenzierungstagen 7 bis 14.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

Abbildung 4.5 zeigt die Frequenz dieser kontrahierenden Areale sowohl für die mit HGF behandelten als auch für die unbehandelten Embryoid Bodies. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Schlagfrequenz festgestellt werden. Kardiomyozyten beider Bedingungen kontrahierten mit einer Frequenz von 34 – 50 Schlägen pro Minute.

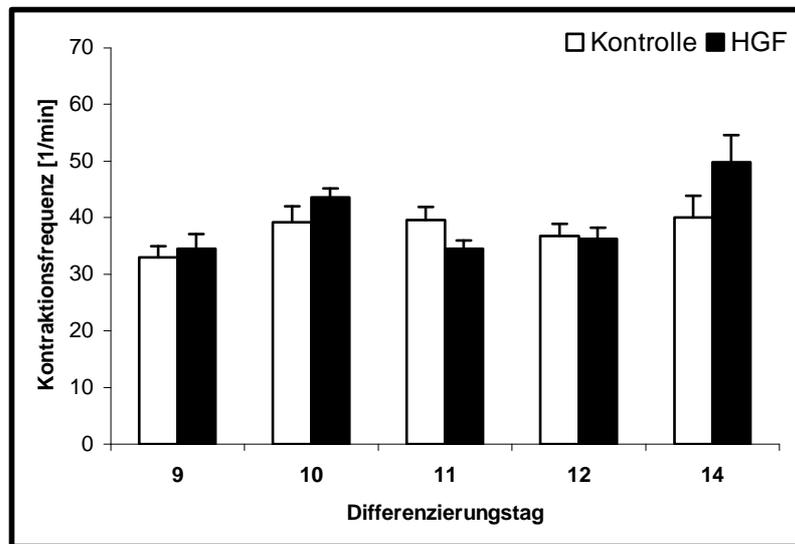


Abb. 4.5 - Lichtmikroskopische Analyse:

Kontraktionsfrequenz der kontrahierenden EB an den Differenzierungstagen 9, 10, 11, 12, 14. Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF.

4.3 Pharmakologische Stimulationen

Embryoid Bodies mit kontrahierenden Kardiomyozyten wurden am 10. Differenzierungstag *in vitro* mit dem β – Adrenorezeptor Agonisten Isoprenalin, dem muskarinergen Agonisten Carbachol und dem If – Kanal Blocker Ivabradine stimuliert. Es wurden jeweils EB mit 20 ng/ml HGF mit unbehandelten EBs als Kontrollen verglichen.

In Abbildung 4.6 ist die Kontraktionsfrequenz gegenüber der Isoprenalinkonzentration (0.001 - 10 μ M) aufgetragen. Sowohl unbehandelte als auch mit HGF (20 ng/ml) stimulierte Kardiomyozyten zeigten eine signifikante Zunahme der Kontraktionsfrequenz auf steigende Isoprenalinkonzentrationen. Es ergab sich kein Unterschied innerhalb der beiden Gruppen

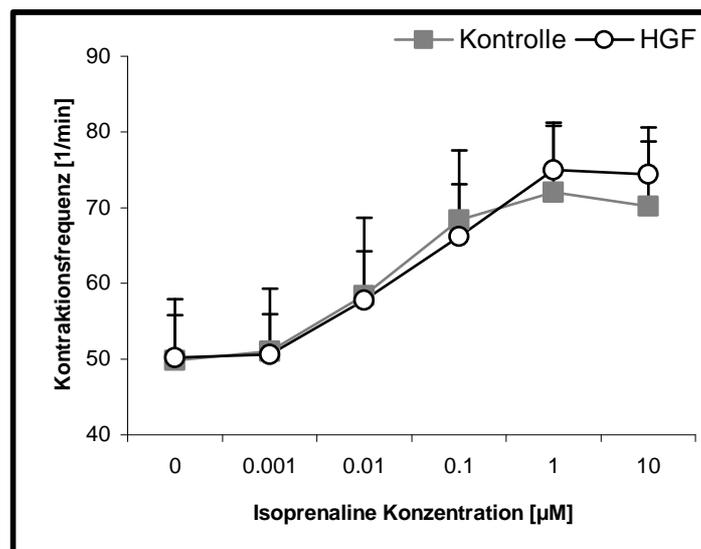


Abb. 4.6 - Lichtmikroskopische Analyse:

Kontraktionsfrequenz der kontrahierenden EB nach Stimulation mit Isoprenalin (0.001 – 10 μ M).

Kontrolle: ESC + 0 ng/ml HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF. n = 10. (* $p < 0.05$ vs. 0 μ M Isoprenalin).

Carbachol ist ein Agonist am muskarinergen Acetylcholinrezeptor, der am Herzen negativ inotrop und negativ chronotrop wirkt. Durch Stimulation mit Carbachol in steigenden Konzentrationen (0.01 – 10 μM) nahm die Kontraktionsfrequenz der Embryoid Bodies in beiden Bedingungen konzentrationsabhängig um 12 – 16 Kontraktionen pro Minute ab (s. Abb. 4.7).

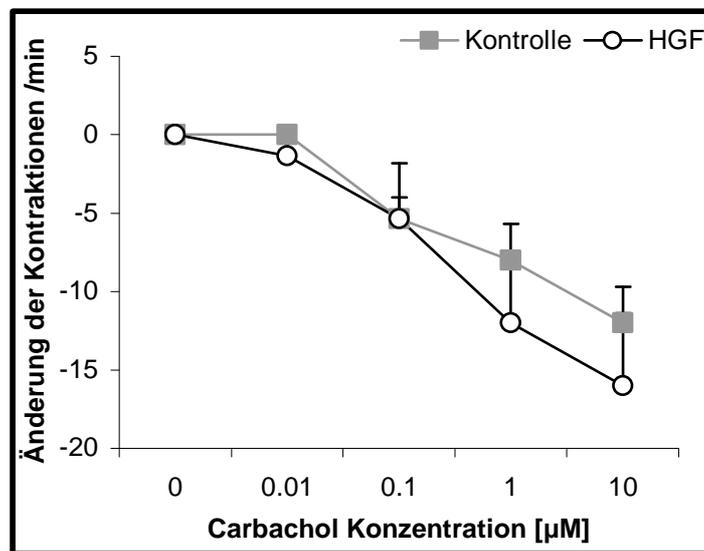


Abb. 4.7 - Lichtmikroskopische Analyse:

*Kontraktionsfrequenz der kontrahierenden EB nach Stimulation mit Carbachol (0.01 – 10 μM).
Kontrolle: ESC ohne HGF, HGF: ESC + 20 ng/ml HGF. n = 3.*

Ivabradine blockiert den I_f – Ionenkanal, der in den Schrittmacherzellen des Herzen vorkommt. Dieser Kanal leitet Natrium und Kalium und ist für die langsame Depolarisation der Schrittmacherzellen zuständig. Blockade dieses Kanals führt zu einer negativen Chronotropie (Baruscotti M. et al., 2005). Die Stimulation der ESC mit Ivabradine zeigte eine dosisabhängige negative Chronotropie sowohl in Gegenwart von HGF als auch in der Kontrollbedingung (s. Abb. 4.8). Der negativ chronotrope Effekt von Ivabradine ist dabei deutlich stärker ausgeprägt als der einer muskarinergen Stimulation mit Carbachol (-12 vs. -26 Kontraktionen/min in Kontrollen, $p < 0.05$; -16 vs. -25 Kontraktionen/min in Gegenwart von HGF, $p < 0.05$).

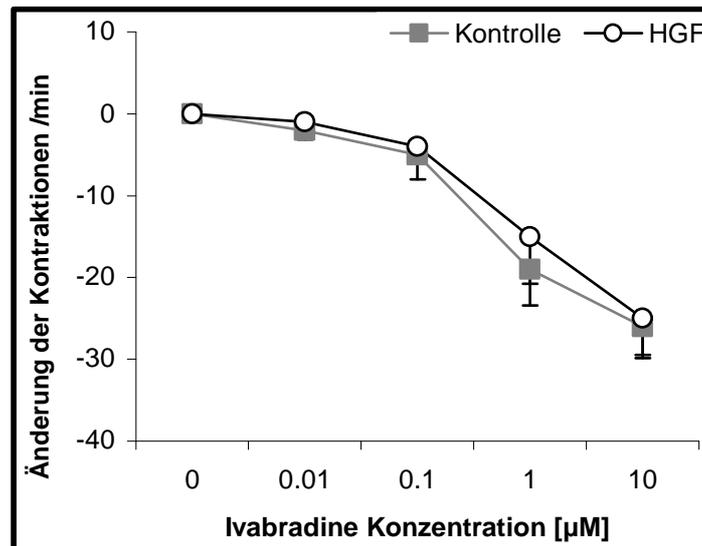


Abb. 4.8 - Lichtmikroskopische Analyse:

Kontraktionsfrequenz der kontrahierenden EB nach Stimulation mit Ivabradine (0.01 - 10 μM).
Kontrolle: ESC ohne HGF, HGF: ESC + 20 ng/ml HGF. n = 4.

Die kontrahierenden Areale der Embryoid Bodies zeigten auf pharmakologische Stimulation eine entsprechende chronotrope Antwort sowohl in den unbehandelten Kontrollen als auch in Gegenwart von HGF. Signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe konnten in keinem der durchgeführten Experimente festgestellt werden.

4.4 Gen – Expressionsanalysen

4.4.1 Einfluss der HGF Konzentration auf die mRNA – Expression kardialer Gene während der frühen Differenzierung

Die kardiomyozytäre Differenzierung der embryonalen Stammzellen wurde mittels der Expression spezifischer kardialer Gene untersucht. Der Einfluss von HGF in Konzentrationen von 3, 10, 20 und 30 ng/ml auf die Genexpression wurde mit unbehandelten Kontrollen verglichen. Am 7. Differenzierungstag wurde die Expression der kardialen Gene Nkx2.5, GATA 4, Alpha – MHC, Beta – MHC sowie Troponin T mittels RT – PCR analysiert.

Abbildung 4.9 zeigt die mRNA Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA 4. ESC, die mit HGF in einer Konzentration von 10 ng/ml behandelt wurden, zeigten eine um 59 % stärkere Expression von Nkx2.5 gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($p < 0.05$). Bei einer Konzentration von 20 ng/ml HGF zeigte sich eine auf 220% gesteigerte Nkx2.5 Expression verglichen mit der Kontrolle ($p < 0.01$). Höhere Konzentrationen (30 ng/ml) zeigten keine weitere Zunahme der Expression von Nkx2.5. Diese Tendenzen zeigten sich in schwächer Ausprägung auch für die Expression GATA 4. Stammzellen in Gegenwart von 20 ng/ml HGF exprimierten GATA 4 mRNA um 19 % stärker als die Kontrolle ($p < 0.05$).

In Abbildung 4.10 ist die mRNA Expression der kardialen Proteine α – MHC, β – MHC und Troponin T dargestellt. Dies sind die kardialen Isoformen des kontraktilel Apparates und sind kennzeichnend für Kardiomyozyten. α – MHC – mRNA wurde zu diesem frühen Differenzierungszeitpunkt in keiner der Untersuchungsbedingungen exprimiert. Sowohl die mRNA von β – MHC als auch von Troponin T zeigte keine signifikant verstärkte Expression in den HGF Bedingungen zu diesem Differenzierungszeitpunkt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Hepatocyte Growth Factor zu einer verstärkten Expression kardialer Transkriptionsfaktoren in früh – differenzierten Kardiomyozyten führt. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration des HGF und ist in einer Konzentration von 20 ng/ml maximal.

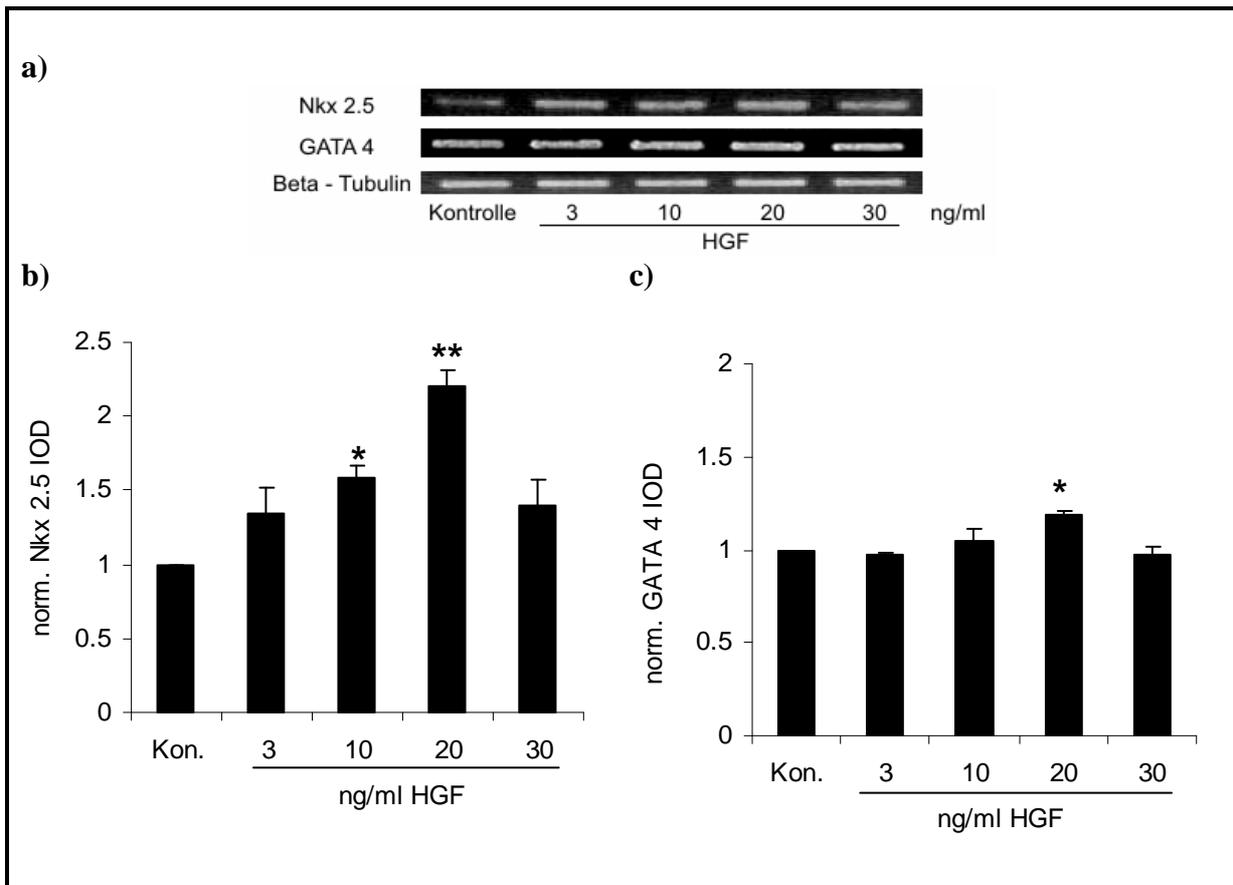


Abb. 4.9 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA – Expression eines repräsentativen Experimentes. b) Densitometrische Quantifizierung der Nkx2.5 mRNA (normalisiert auf β - Tubulin + Kontrolle); $n = 3$. c) Densitometrische Quantifizierung der GATA 4 mRNA (normalisiert auf β - Tubulin + Kontrolle); $n = 3$.

Kon.: Kontrolle: ESC ohne HGF; * $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

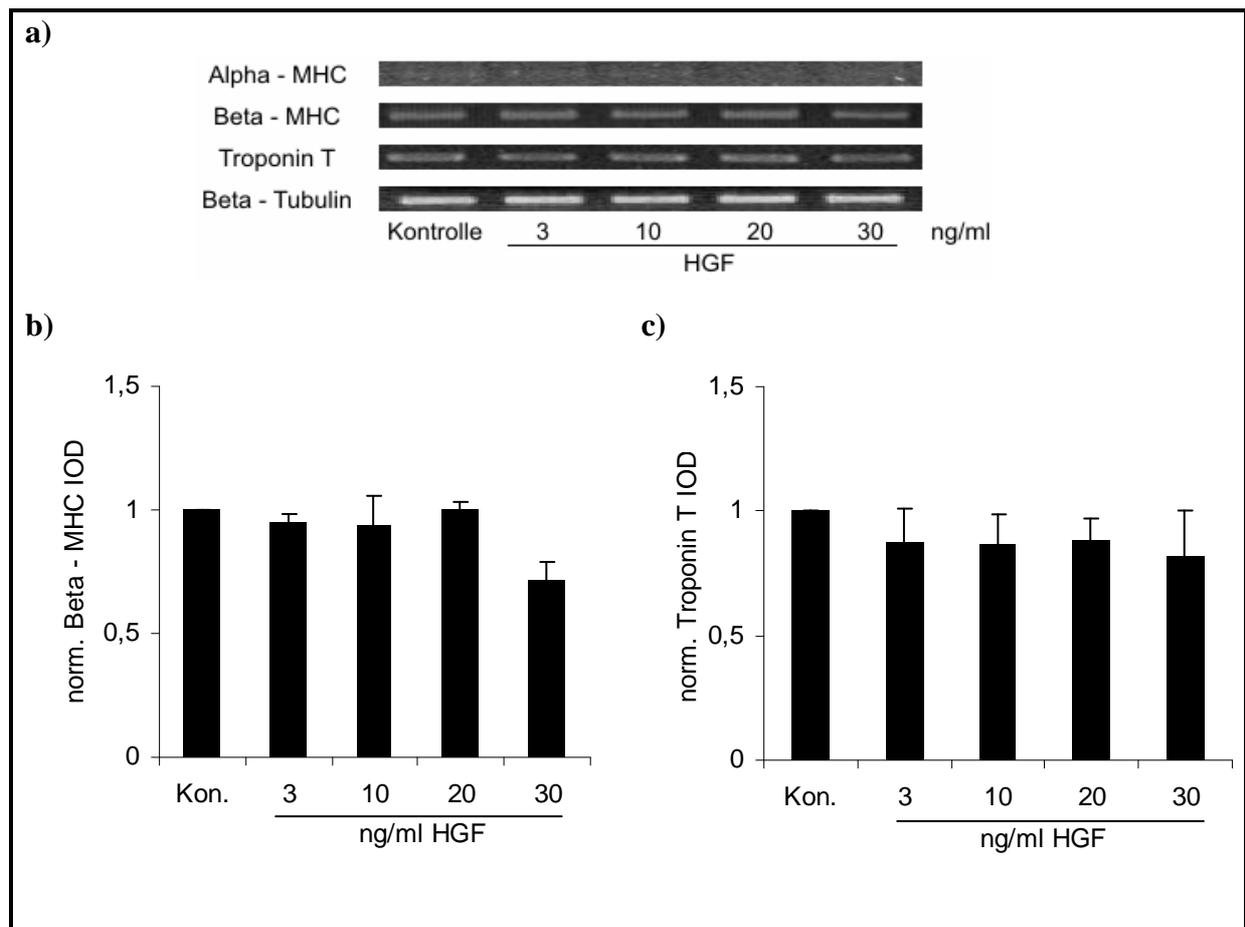


Abb. 4.10 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expression eines repräsentativen Experimentes. b) Densitometrische Quantifizierung der β - MHC mRNA (normalisiert auf β - Tubulin + Kontrolle); $n = 3$. c) Densitometrische Quantifizierung der Troponin T mRNA (normalisiert auf β - Tubulin + Kontrolle); $n = 3$.

Kon.: Kontrolle: ESC ohne HGF.

4.4.2 mRNA – Expression kardialer Gene zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten

Ziel der folgenden Experimente war es, die Effekte von HGF auf die Expression kardialer Gene zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten zu untersuchen. Aufgrund der Ergebnisse aus Kapitel 4.4.1 wurden Stammzellen in Gegenwart von 20 ng/ml HGF mit unbehandelten Stammzellen als Kontrolle an den Differenzierungstagen 8, 9, 10, 12 und 14 untersucht. Die Expression folgender Gene wurde mittels semiquantitativer RT – PCR bestimmt: Nkx2.5, GATA 4, Troponin T, α – MHC, β – MHC, ANF und MLC2v.

Vergleichbar mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1 zeigte die Expression der Nkx2.5 mRNA (Abb. 4.11) eine signifikante Steigerung in mit HGF behandelten Zellen zur frühen Differenzierung (Tag 8: $p < 0.05$, HGF 20 ng/ml vs. Kontrolle). Eine zweite Steigerung der Nkx2.5 Expression ließ sich zur fortgeschrittenen Differenzierung in Gegenwart von HGF nachweisen (Tag 10 + 12: $p < 0.01$, HGF 20 ng/ml vs. Kontrolle). Ein ähnliches Expressionsverhalten wurde für GATA 4 mRNA beobachtet: EB in Gegenwart von HGF exprimierten GATA 4 zweigipfelig verstärkt (Tag 8 + 10: $p < 0.05$, HGF 20 ng/ml vs. Kontrolle). Zusammen mit den Ergebnissen aus dem Abschnitt 4.4.1 zeigte sich, dass 20 ng/ml HGF die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren bereits zur frühen Differenzierung signifikant verstärkt.

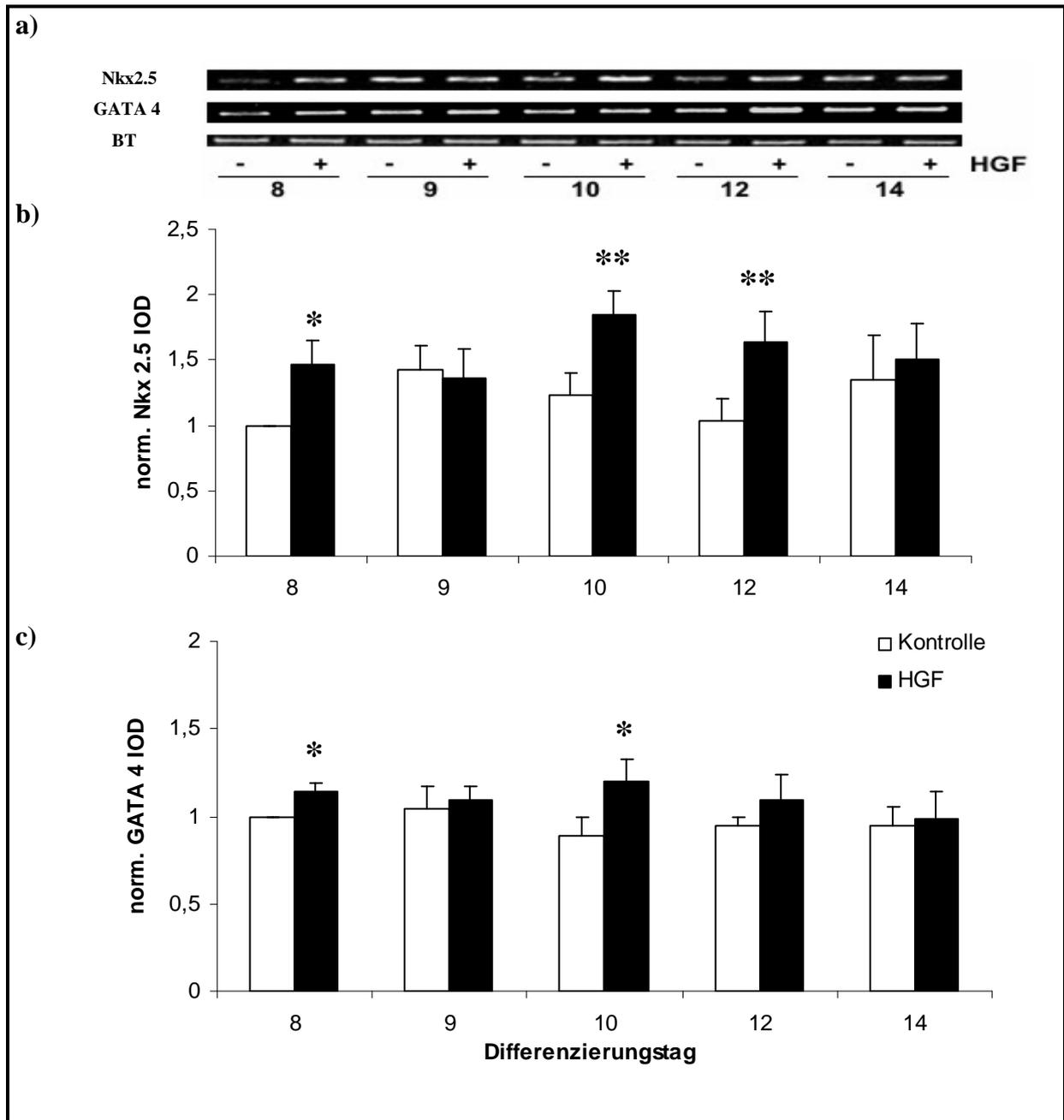


Abb. 4.11 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Nkx2.5 mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin Expression + Kontrolle Tag 8); $n = 4$. c) Densitometrische Quantifizierung der GATA 4 mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin Expression + Kontrolle Tag 8); $n = 4$.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF; BT = β -Tubulin;

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

Abbildung 4.12 zeigt die Genexpression der kardialen Strukturproteine Troponin T, α – und β – MHC. Diese Gene zeigten mit der Differenzierungszeit der ESCs eine zunehmende Expression. Die α – MHC mRNA wurde erstmals ab dem 9. Differenzierungstag detektiert. ESC in Gegenwart von HGF exprimierten die α – und β – MHC mRNA zur fortgeschrittenen Differenzierung (Tag 10) signifikant stärker verglichen mit der Kontrolle ($p < 0.05$). HGF hatte keinen signifikanten Effekt auf die Genexpression von Troponin T zu den untersuchten Differenzierungszeitpunkten. Es zeigte sich jedoch ein Trend mit einer zunehmenden Expression ab Tag 14 in Gegenwart von HGF. Dieser erreichte aber nicht das Signifikanzniveau.

Weiterhin wurde die Ausbildung unterschiedlicher Herzzelltypen mittels ANP als atrialen und MLC2v als ventrikulären Marker analysiert (s. Abb. 4.13). Das atrial natriuretic Peptide (ANP) ist ein Peptidhormon, welches in Kardiomyozyten des Vorhofs synthetisiert wird.

Die mRNA des Atrial Natriuretic Peptide (ANP) und der ventrikulären Myosin Lightchain (MLC2v) wurde in beiden Bedingungen erst zur späteren Differenzierung exprimiert (Abb. 4.13). Es zeigte sich dabei eine signifikante Verstärkung dieser Gene in den mit HGF behandelten Embryoid Bodies. ANP wurde an Tag 12 in HGF behandelten ESCs um 217% stärker exprimiert verglichen mit entsprechenden Kontrollzellen. Die MLC2v Expression war in der HGF Bedingung an dem 10. Differenzierungstag um 45% gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigert. Dieser Trend setzte sich in der späteren Differenzierung fort.

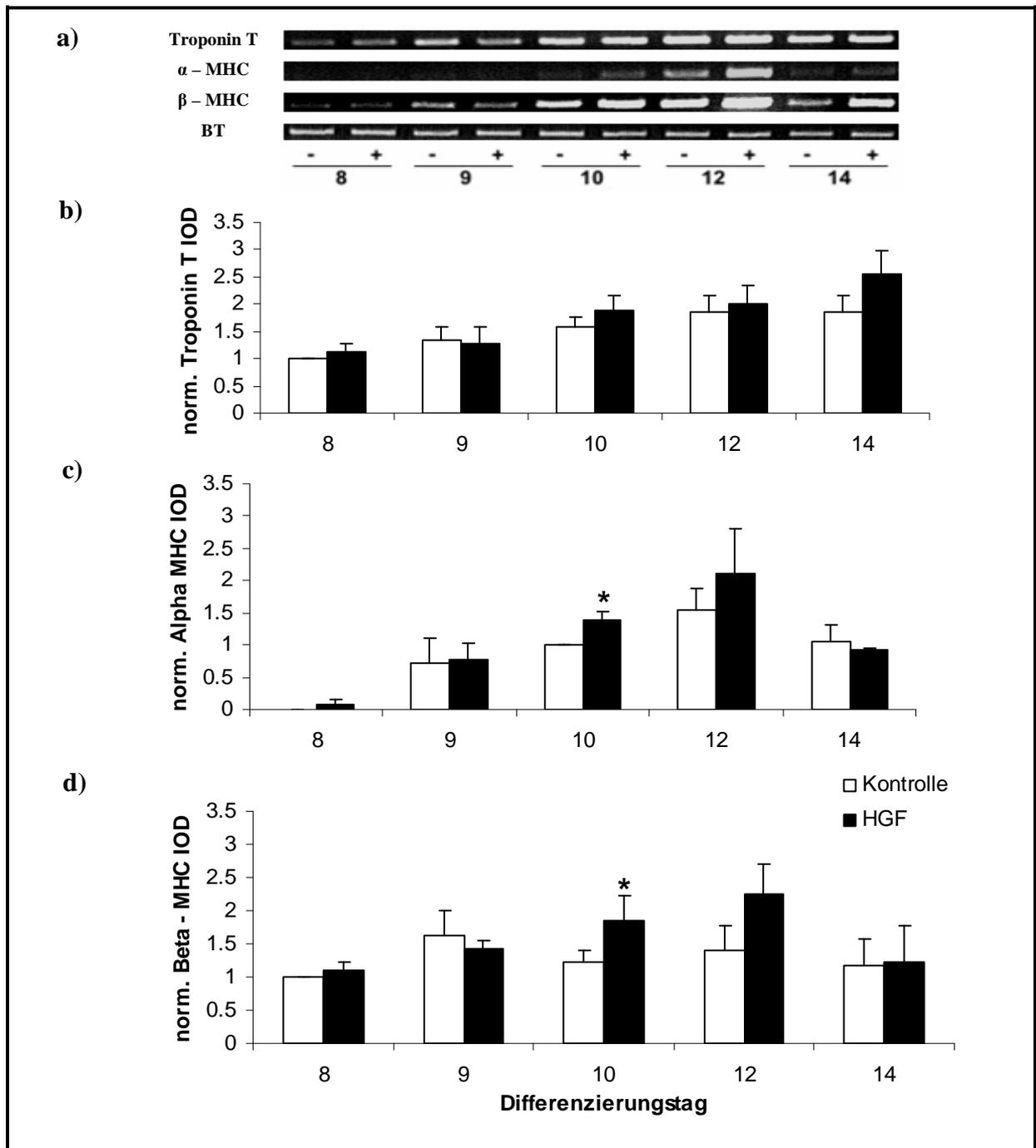


Abb. 4.12 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Troponin T mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 4$. c) Densitometrische Quantifizierung der α -MHC mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 10); $n = 4$. d) Densitometrische Quantifizierung der β -MHC mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 4$. Kontrolle: ESC + 0 ng/ml HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF; BT: β -Tubulin.
 * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

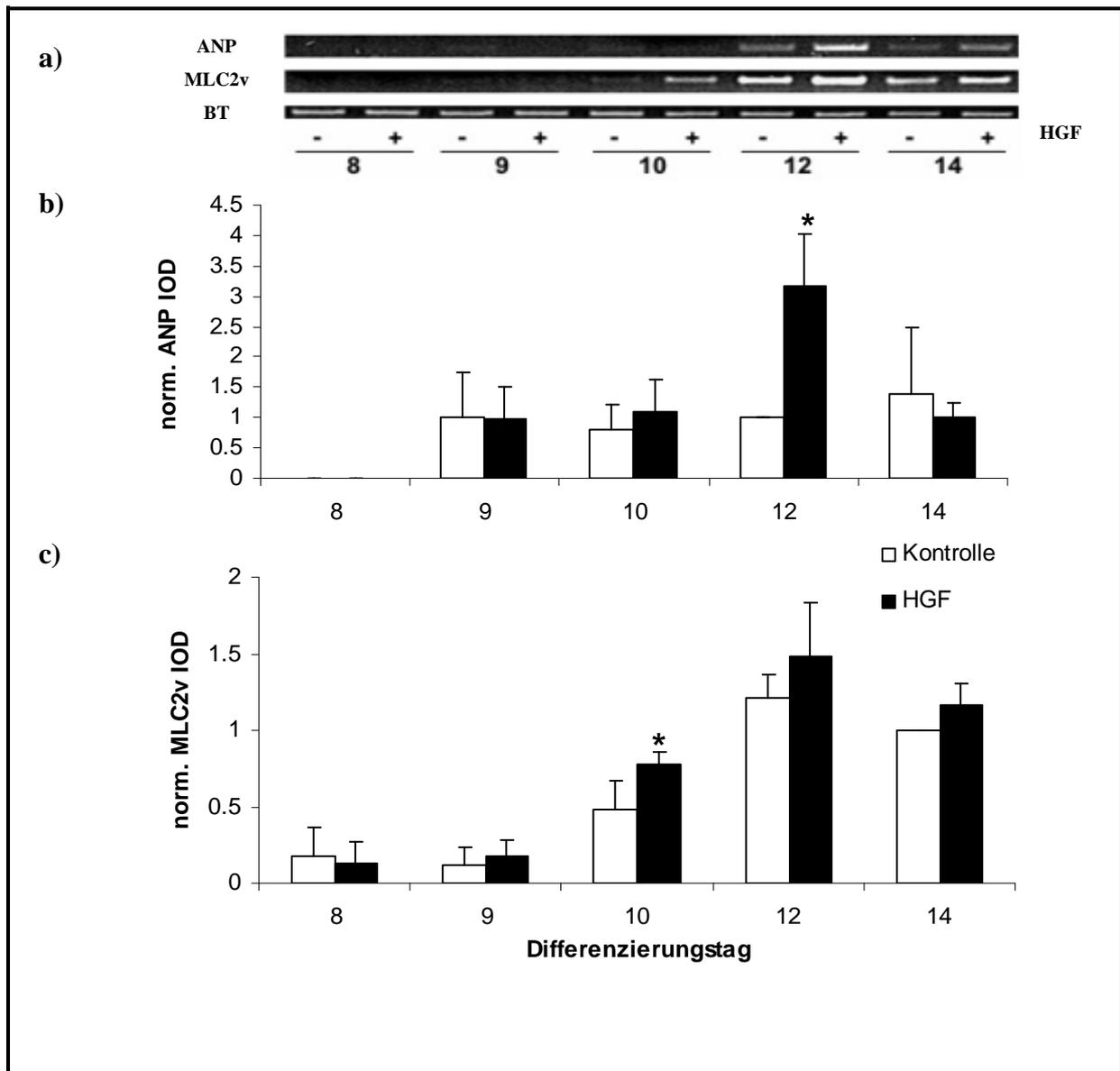


Abb. 4.13 - RT – PCR - Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der ANP mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 12); n = 4. c) Densitometrische Quantifizierung der MLC2v mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 14); n = 4.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF = ESC + 20 ng/ml HGF.

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle

4.4.3 mRNA – Expression nicht – kardialer Gene zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten

Der Hepatocyte Growth Factor spielt während der Embryogenese eine zentrale Rolle und ist unter anderem an epithelialen – mesenchymalen Interaktionen und der Organogenese der Leber (Weidner et al, 1993), der Haut und der Niere beteiligt (Sonnenberg E et al, 1993; Santos OF et al, 1994).

Daher wurde untersucht, ob HGF einen Einfluss auf die Expression nicht-kardialer Gene in ESC hat (Abb. 4.14). Als mesodermale Gene wurden Fetal Liver Kinase – 1 (FLK – 1), Vascular endothelial Cadherin (VE – Cadherin) und Alpha Smooth Muscle Actin (Alpha SMA) analysiert. FLK – 1 ist der Rezeptor für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und einer der frühesten Marker für endotheliale und hämatopoetische Zellen (Kabrun A et al., 1997). VE – Cadherin ist eine für Gefäßendothelzellen spezifische Form des Cadherin, ebenso ist Alpha – SMA eine für vaskuläre Zellen spezifische Isoform des Aktins. Keines der genannten mesodermalen Gene zeigte eine signifikant gesteigerte Expression durch HGF (Abb. 4.14).

Um die ektodermale Differenzierung zu analysieren, wurde die mRNA – Expression des Neurofilament Proteins 68 kDA (68 – NFL), ein für neuronales Gewebe kennzeichnendes Protein, bestimmt. Es zeigte sich, dass dieses Gen zur fortgeschrittenen Differenzierung verstärkt in Anwesenheit von HGF exprimiert wurde. Die mRNA von Albumin als endodermalen Marker zeigte keine signifikante Regulation durch HGF.

Die untersuchten Gene zur Analyse der nicht – kardialen Differenzierung zeigten keine signifikant veränderte Regulation in den mit HGF behandelten ESCs verglichen mit den Kontrollen zu den angegebenen Differenzierungszeitpunkten.

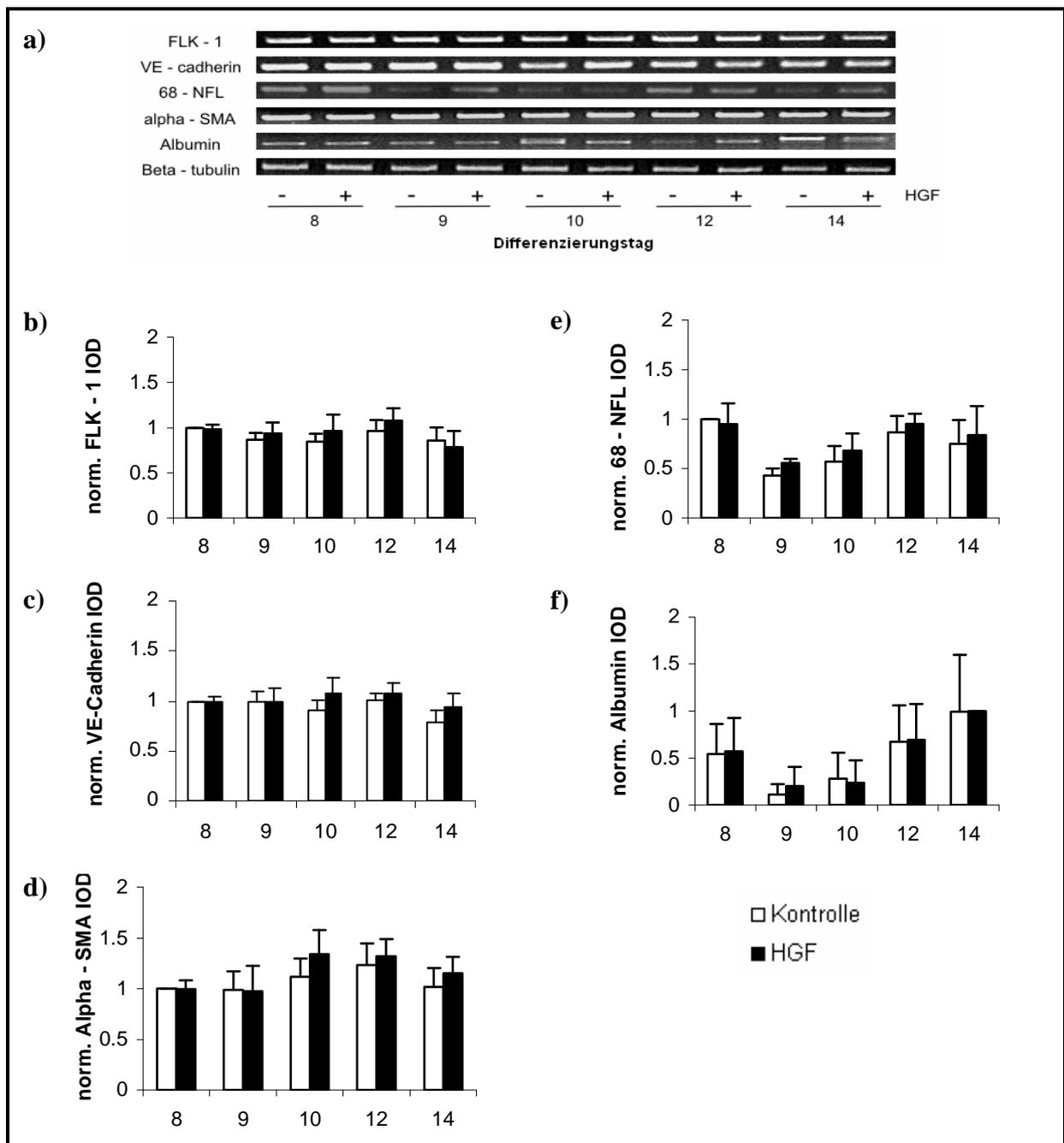


Abb. 4.14. RT – PCR – Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der FLK – 1 mRNA Expression (normalisiert auf β – Tubulin + Kontrolle Tag 8); n = 4. c) Densitometrische Quantifizierung der VE - Cadherin mRNA Expression (normalisiert auf β – Tubulin + Kontrolle Tag 8); n = 4. d) Densitometrische Quantifizierung der Alpha - SMA mRNA Expression (normalisiert auf β – Tubulin + Kontrolle Tag 8); n = 4. e) Densitometrische Quantifizierung der 68 - NFL mRNA Expression (normalisiert auf β – Tubulin + Kontrolle Tag 8); n = 4. f) Densitometrische Quantifizierung der Albumin mRNA Expression (normalisiert auf β – Tubulin + HGF Tag 14); n = 4.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF = ESC + 20 ng/ml HGF.

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle

4.4.4 mRNA Expression kardialer Gene unter Serum – reduzierten Kulturbedingungen

Kultivierung der Stammzellen mit Tierserum bedeutet eine hohe Variabilität des Kulturmediums und eine mögliche Kontamination mit Pathogenen (Heng BC et al, 2003). Dies liegt darin, dass die Zusammensetzung des Serums nur schlecht definiert ist und so verschiedene Faktoren Einfluss auf die Differenzierung haben. Um diese unbekannt Variablen zu minimieren, wurde in den folgenden Experimenten der Serumanteil des Kulturmediums um 75% reduziert (auf insgesamt 5% FBS in Differenzierungsmedium). Allerdings haben ESC in Serum – reduzierten und Serum – freien Bedingungen einen niedrigeren mitotischen Index und werden apoptotisch (Heng BC et al, 2003). Dies zeigte sich darin, dass in diesen Experimenten die Embryoid Bodies kleiner waren und es nicht zum Auftreten kontrahierender Kardiomyozyten kam.

Unter diesen Serum – reduzierten Kultivierungsbedingungen wurde die Expression kardialer Gene in Stammzellen \pm 20 ng/ml HGF an den Differenzierungstag 8, 9, 10, 12 und 14 untersucht. Abbildung 4.15 zeigt die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA 4, sowie der kardialen Strukturproteine Alpha - und Beta – MHC und Troponin T. Insgesamt zeigte sich eine abgeschwächte Expression der kardialen Gene sowohl in den Kontrollen als auch in den mit HGF behandelten Zellen. Während die mRNA von Alpha MHC zu keinem Zeitpunkt der Differenzierung exprimiert wurde, nahm die Expression der Beta – MHC mRNA mit fortschreitender Differenzierung ab. Eine signifikant gesteigerte Expression in Gegenwart von HGF zeigte sich nur für die mRNA des Transkriptionsfaktors Nkx2.5 (Tag 8 HGF vs. Kontrolle, $p < 0.05$).

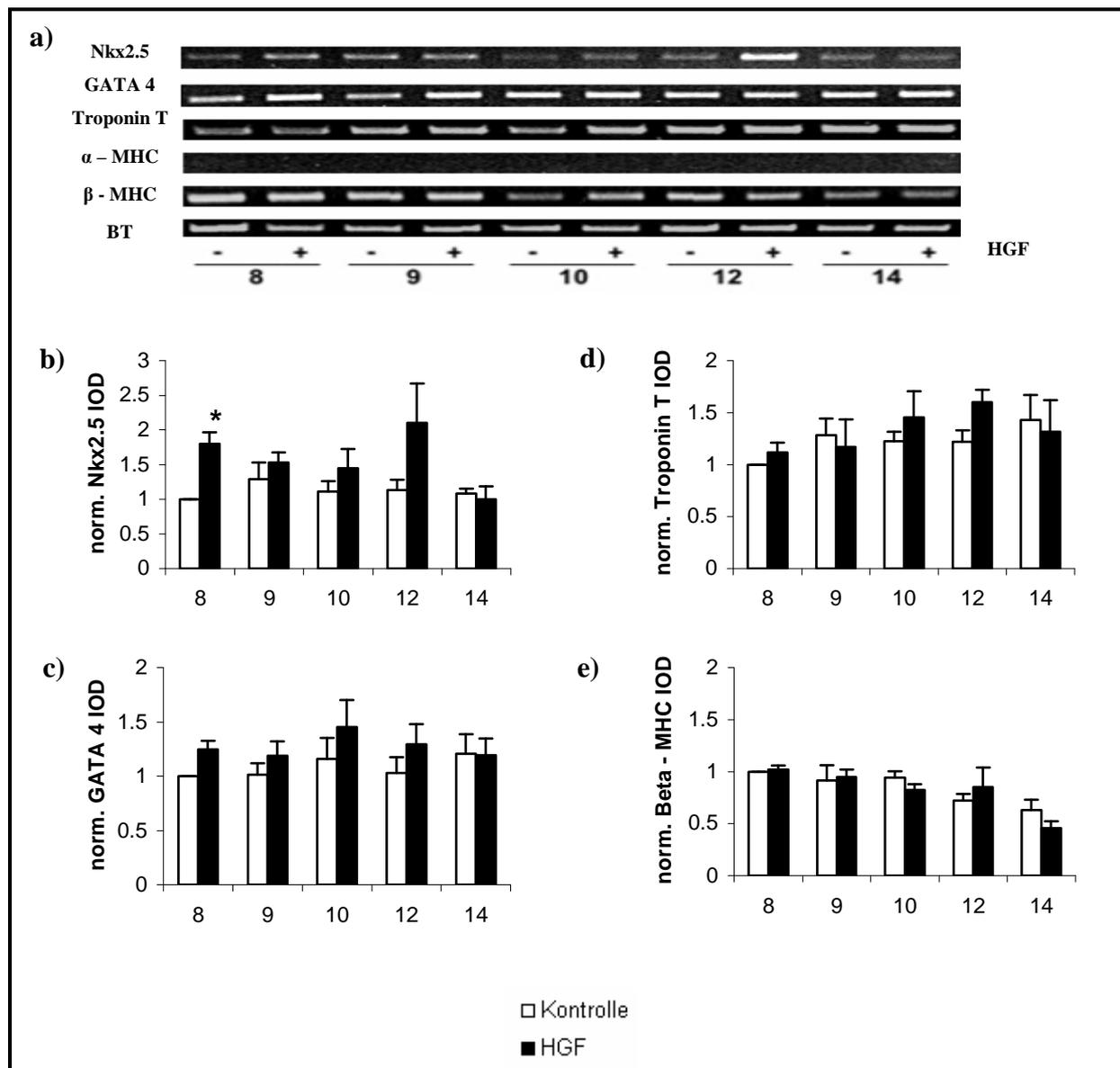


Abb. 4.15 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expressionen von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Nkx2.5 mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 3$. c) Densitometrische Quantifizierung der GATA 4 mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 3$. d) Densitometrische Quantifizierung der Troponin T mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 3$. e) Densitometrische Quantifizierung der β -MHC mRNA Expression (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle Tag 8); $n = 3$.

Kon. = Kontrolle = ESC ohne HGF; HGF = ESC + 20 ng/ml HGF; BT = β -Tubulin;

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

4.5 Immunfärbungen

Die Analyse der Expression kardialer Gene zeigte eine verstärkte mRNA – Expression von Markern der kardiomyozytären Differenzierung. Es bleibt jedoch zu klären, ob dies zur Translation der entsprechenden Proteine führt.

Um dies zu überprüfen, wurden Immunfärbung gesamter Embryoid Bodies mit einem Troponin T Antikörper durchgeführt. Sowohl für die HGF – als auch für die Kontroll – Bedingung wurden nur EB am 10. Differenzierungstag mit lichtmikroskopisch nachgewiesenen kontrahierenden Arealen zur Immunfärbung genommen. Abbildung 4.16 zeigt exemplarisch die Licht – und Fluoreszenzmikroskopischen Bilder jeweils eines EB \pm 20 ng/ml HGF. Troponin T positive Zellen zeigen eine grüne Fluoreszenz. Man erkennt eine Fluoreszenzanreicherung vor allem in der Mitte des EBs, nahe des nekrotischen Areals, wo auch erfahrungsgemäß die kontrahierenden Areale anzufinden sind.

Zur Auswertung der Bilder wurde die Anti – Troponin T positive Fläche in Relation zur Gesamtfläche der EB (Abb. 4.16c) gesetzt. Es zeigte sich, dass es zu einer signifikante Steigerung der Anti – Troponin T positiven Zellen in der HGF Bedingung gegenüber der Kontrolle kam (HGF 20 ng/ml: 4,63 % vs. Kontrolle: 3.07%, $p < 0.05$).

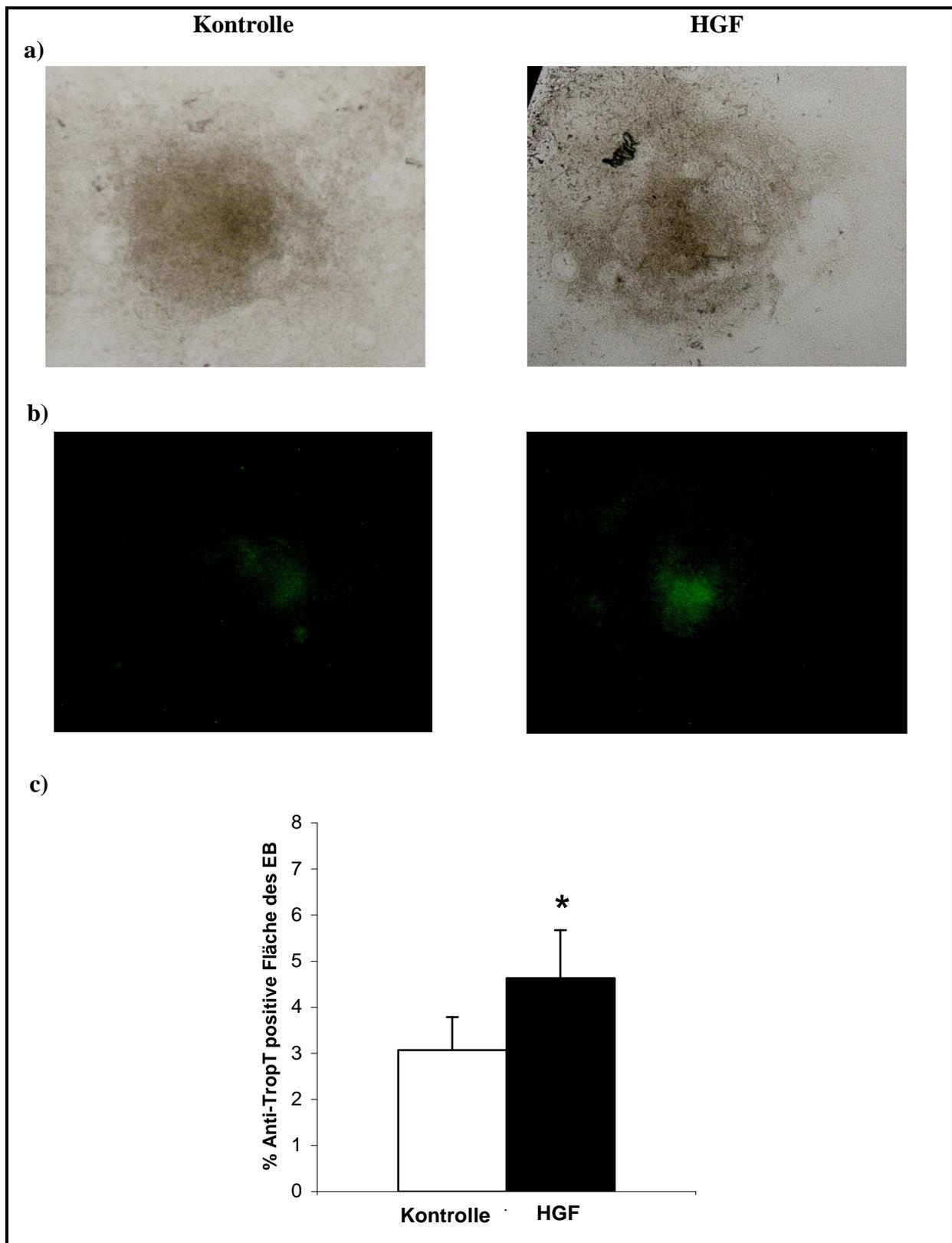


Abb. 4.16 – Immunfärbung:

a) Licht – und b) Fluoreszenzmikroskopische Bilder (4 x).

c) Quantitative Auswertung der Immunfärbung (n = 10).

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF.

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

4.6 Signaltransduktionsanalysen

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass durch Stimulation embryonaler Stammzellen mit HGF die Expression kardiomyozytärer Marker signifikant verstärkt werden kann. Ziel der folgenden Experimente war es, den molekularen Mechanismus der kardiomyozytären Differenzierung durch HGF zu untersuchen.

Die Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) ist ein Enzym, das an einer Vielzahl zellulären Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben entscheidend beteiligt ist (Cantley LC, 2002). Eine Involvierung der PI3K an der kardiomyozytären Differenzierung embryonaler Stammzellen wurde bereits nachgewiesen (Klinz F et al., 1999).

Da auch HGF die PI3K aktivieren kann (Weidner et al, 1993), wurde der Effekt von HGF auf die kardiomyozytäre Differenzierung in Gegenwart von Wortmannin untersucht. Wortmannin ist ein zellpermeabler, fungaler Metabolit, der die PI3K durch kovalente Bindung an der katalytischen Untereinheit p110 irreversibel inhibiert (Walker EH et al, 2000).

In Abbildung 4.17 ist die mRNA Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA 4 von unbehandelten Kontroll - ESCs \pm Wortmannin (200 nM) und von HGF behandelten ESCs \pm Wortmannin (200 nM) dargestellt. Es zeigte sich, dass die kardialen Transkriptionsfaktoren in Gegenwart von Wortmannin bereits in den Kontrollen reduziert exprimiert werden. Ebenso war die HGF induzierte Zunahme in der Genexpression von Nkx2.5 und GATA 4 in Anwesenheit von Wortmannin komplett aufgehoben. Diese Effekte wurden auch für die Alpha – und Beta – MHC mRNA Expression beobachtet (Abbildung 4.18).

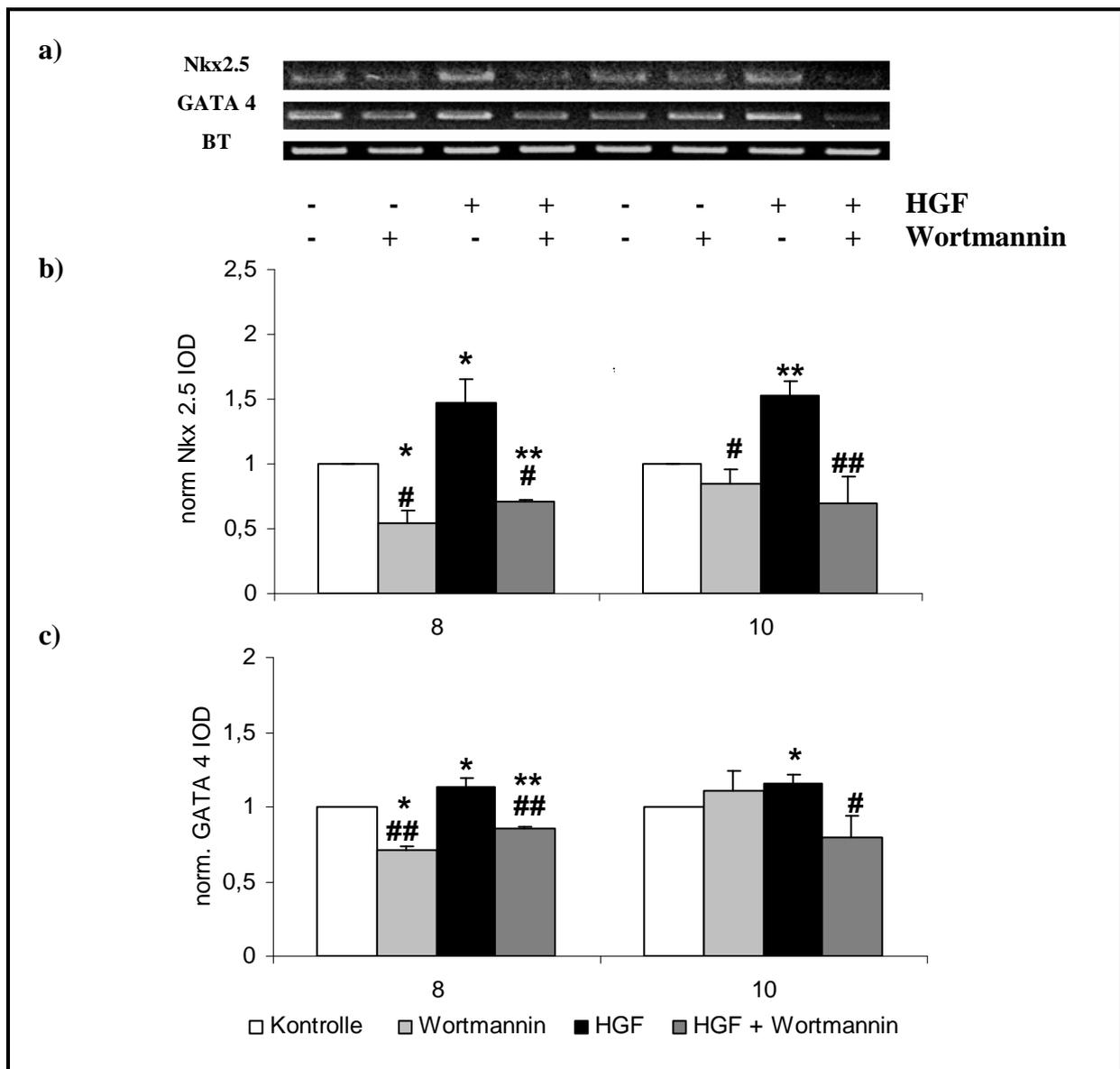


Abb. 4.17 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Nkx2.5 mRNA (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle) am 8. und 10. Differenzierungstag; n = 3. c) Densitometrische Quantifizierung der GATA 4 mRNA (normalisiert auf β -Tubulin + Kontrolle) am 8. und 10. Differenzierungstag; n = 3.

Kontrolle: ESC ohne HGF ohne Wortmannin; Wortmannin: ESC 200 nM Wortmannin; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF; HGF + Wortmannin: ESC + 20 ng/ml HGF + 200 nM Wortmannin; BT = β -Tubulin;

* p < 0.05 vs. Kontrolle; ** p < 0.01 vs. Kontrolle; # p < 0.05 vs. HGF; ## p < 0.01 vs. Kontrolle.

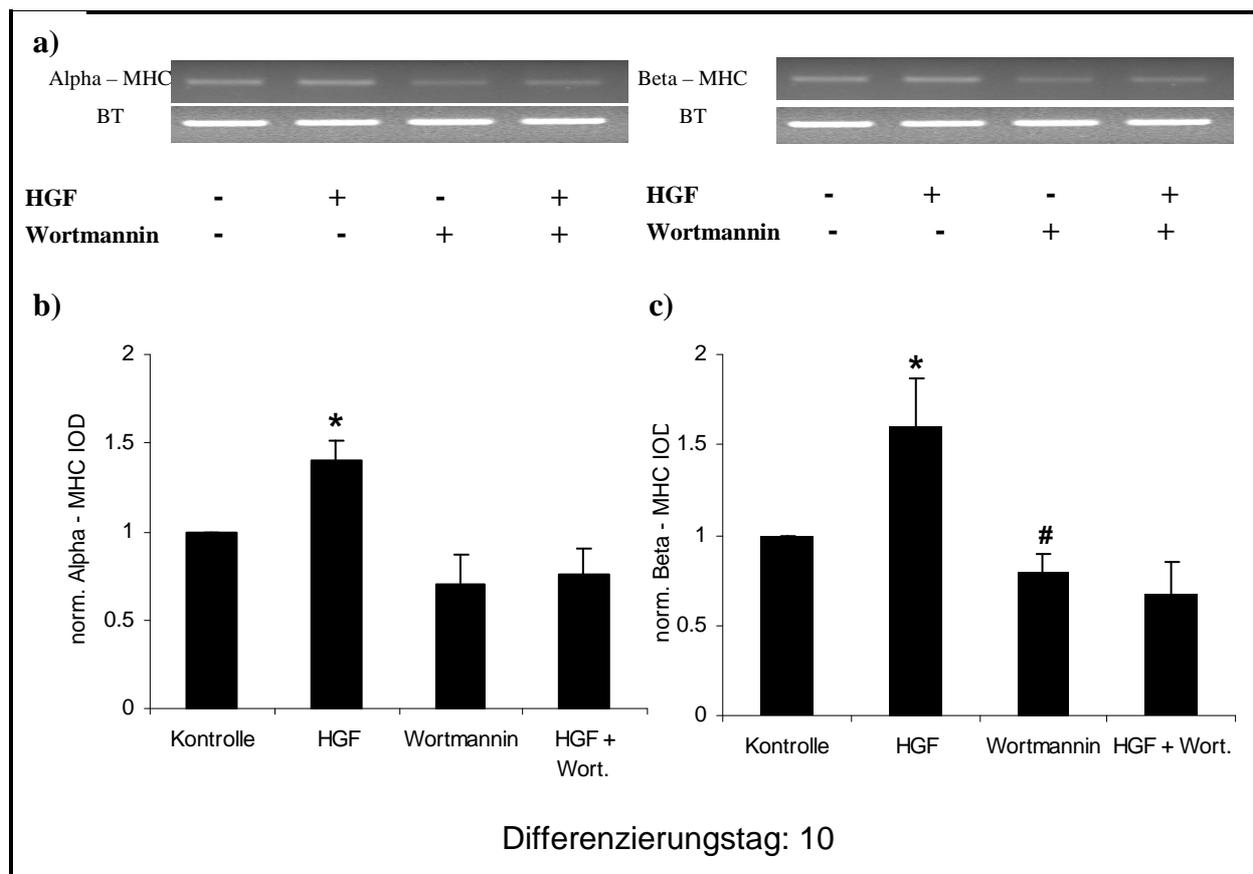


Abb. 4.18 - RT - PCR - Analysen:

a) mRNA Expression von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Alpha - MHC mRNA Expression (normalisiert auf β - Tubulin); $n = 3$. c) Densitometrische Quantifizierung der Beta - MHC mRNA Expression (normalisiert auf β - Tubulin); $n = 3$.

Wortmannin: ESC + 200 nM Wortmannin; HGF = ESC + 20 ng/ml HGF;

HGF + Wortmannin = ESC + 20 ng/ml HGF + 200 nM Wortmannin; BT = β - Tubulin;

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle, # $p < 0.05$ vs. HGF.

Da pharmakologische Inhibitoren wie z. B. auch Wortmannin jedoch nicht vollständig spezifisch sind, wurden Experimente mit einem unabhängigen PI3 - Kinase Inhibitor, dem LY294002, durchgeführt. LY294002 ist ein synthetischer PI3K Inhibitor, der die Untereinheit p110 blockiert und so eine Interaktion mit ATP verhindert (Vlahos CJ et al, 1994). Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, wurde der durch HGF (20 ng/ml) induzierte Anstieg der Nkx2.5 mRNA Expression durch LY294002 verhindert. Zu beachten ist, dass LY303511, das inaktive Homolog des LY294002, den Effekt des HGF nicht beeinflusste, was für einen spezifischen Effekt durch die Hemmung der PI3K Aktivität spricht. Eine entscheidende Funktion bei der Vermittlung der Effekte der PI3K im Myokard hat die Proteinkinase Akt.

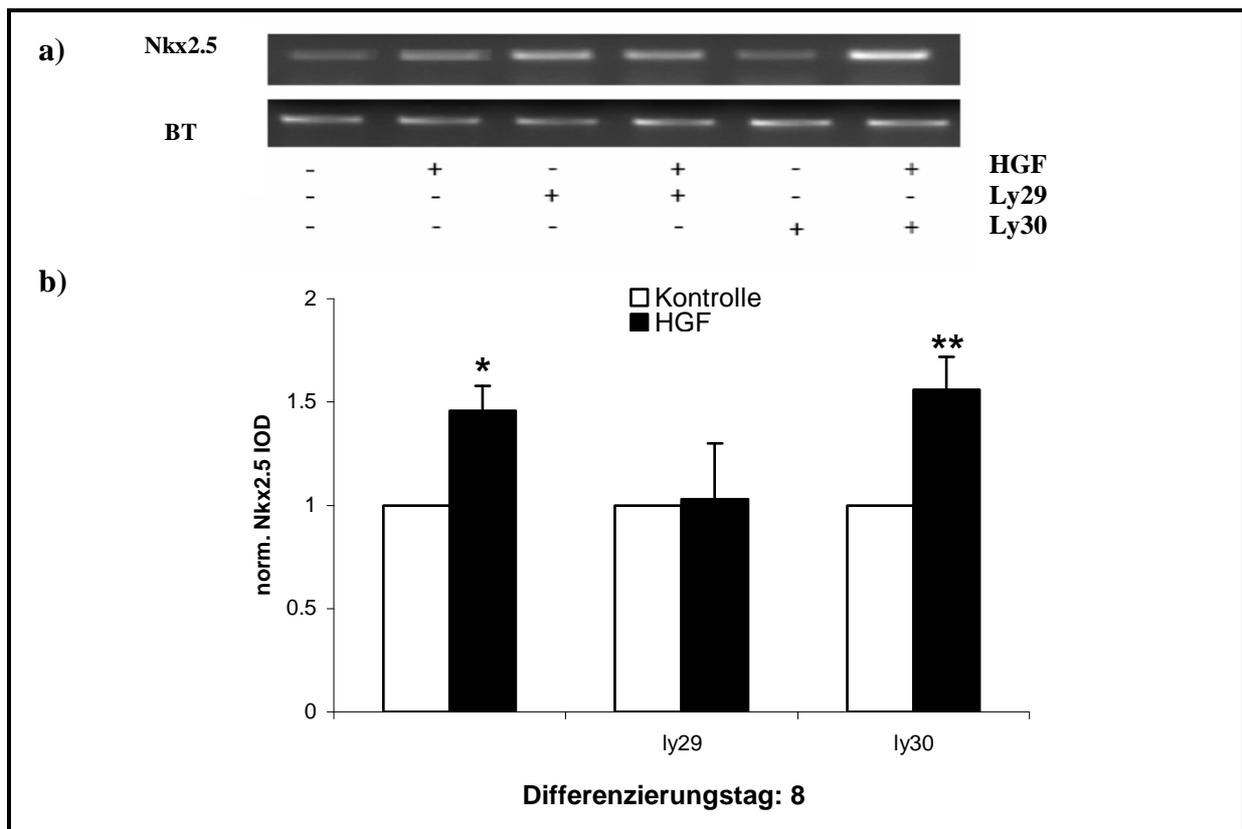


Abb. 4.19 - RT – PCR:

a) PCR Banden von repräsentativen Experimenten. b) Densitometrische Quantifizierung der Nkx2.5 mRNA (normalisiert auf β – Tubulin Expression + Kontrolle); $n = 3$.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF; Ly29: Kontrolle bzw. HGF + 20 μ M LY294002; Ly30: Kontrolle bzw. HGF + 20 μ M LY303511; BT = β – Tubulin;

* $p < 0.05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0.01$ vs. Kontrolle.

Um die Bedeutung des PI3K / Akt Signaltransduktionsmechanismus für die beschriebenen Effekte von HGF auf die kardiomyozytäre Differenzierung mit einer zusätzlichen unabhängigen Methode zu untersuchen, wurde eine Ko - Immunfärbung der Embryoid Bodies für Troponin T und p-Akt durchgeführt. Wie in Abbildung 4.20 zu sehen ist, färbte sich in der Kontrollbedingung 32.1 ± 5.85 % der Troponin T positiven Fläche auch positiv für p-Akt. Dieser Anteil betrug in der HGF Bedingung 60.4 ± 6.3 %, was eine signifikante Steigerung um 88% gegenüber der Kontrolle entspricht. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass HGF in embryonalen Stammzellen die kardiomyozytäre Differenzierung mittels Aktivierung des PI3K / Akt Pathways verstärkt.

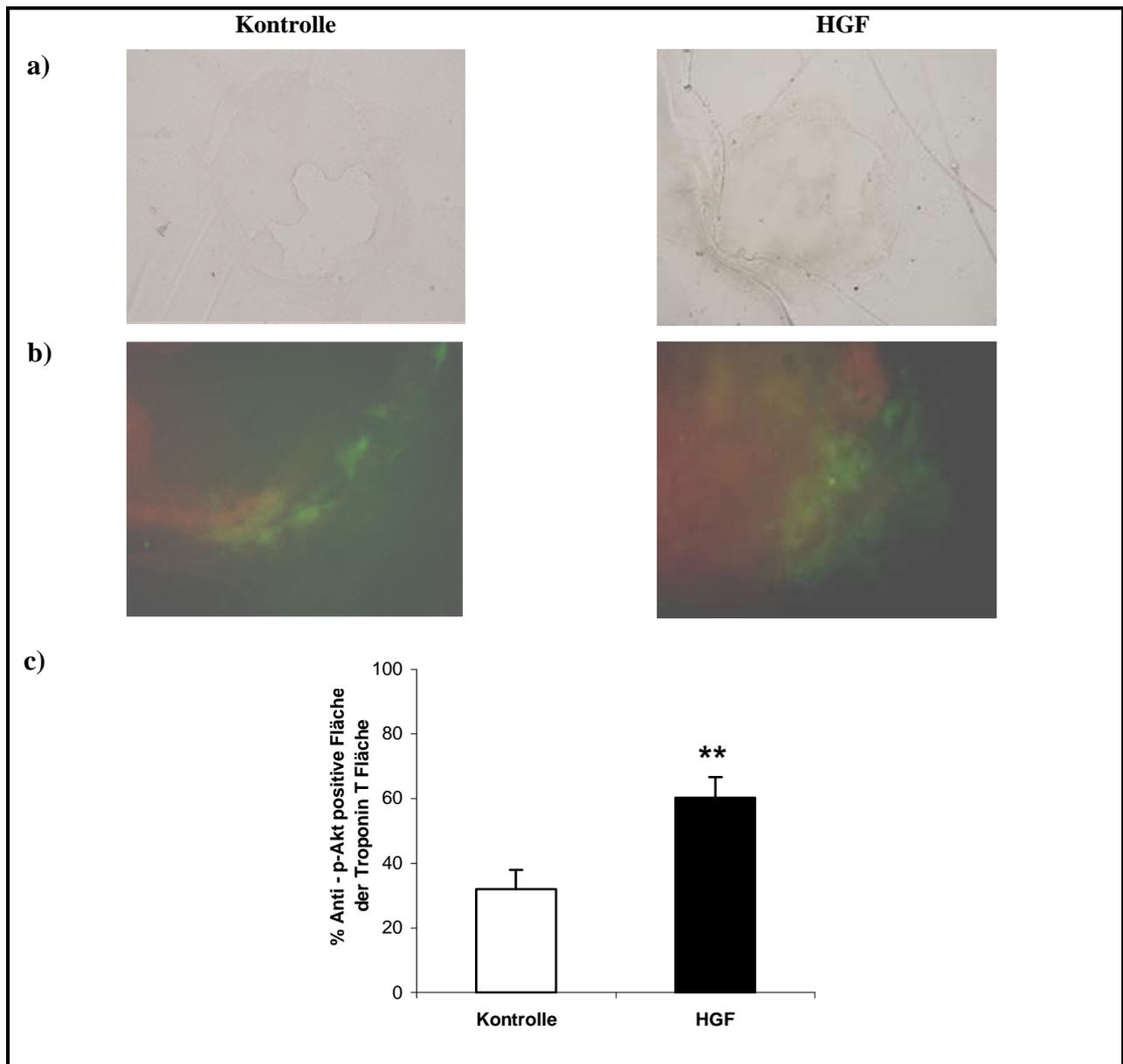


Abb. 4.20 – Ko - Immunfärbung der Embryoid Bodies für Troponin T (grüne Fluoreszenz) und p-Akt (rote Fluoreszenz).

a) Licht – und b) Fluoreszenzmikroskopische Bilder (4 x). c) Auswertung: Prozentualer Anteil der Anti – p-Akt positiven Fläche an der Troponin T Fläche; n = 10.

Kontrolle: ESC ohne HGF; HGF: ESC + 20 ng/ml HGF.

** p < 0.01 vs. Kontrolle.

5 DISKUSSION

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass dem Zytokin Hepatocyte Growth Factor eine protektive Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zukommt (Ueda H et al, 2001; Kitta K et al, 2003). Beim akuten Myokardinfarkt steigt die HGF – Konzentration (Matsumori A et al, 1996) und der c – met Rezeptor wird vermehrt in Kardiomyozyten exprimiert (Ueda H et al, 2001). Die Ausprägung des Infarkts wird durch die anti – apoptische und angiogenetische Wirkung des HGF reduziert (Nakamura T et al, 2000; Morishita R et al 2004). Während der Embryogenese wird HGF verstärkt während der Periode der Kardiogenese transkribiert (Rappolee DA et al, 1996). HGF könnte somit eine wichtige Rolle in dem komplexen Programm der kardialen Differenzierung haben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus in Gegenwart von HGF untersucht.

5.1 Kardiale Differenzierung in Anwesenheit von HGF

Die embryonalen Stammzellen der Maus zeigten in Gegenwart von HGF eine konzentrationsabhängige Verstärkung der Expression kardialer Gene. Der maximale Effekt wurde bei einer Konzentration von 20 ng/ml HGF erzielt. Diese Konzentration entspricht der Plasmakonzentration nach einem Myokardinfarkt (Funakoshi H et al, 2002) und scheint die optimale Wirkkonzentration zu sein. Höhere Konzentrationen zeigten in den vorliegenden Experimenten keine weitere Zunahme der Expressionen der kardialen Transkriptionsfaktoren.

Schon unter basalen Kultivierungsbedingungen konnte in differenzierenden embryonalen Stammzellen die Expression kardialer Gene gezeigt werden. Kardiale Transkriptionsfaktoren wurden dabei bereits während der frühen Differenzierung (Tag 7-8) exprimiert, gefolgt von der Genexpression kardialer Strukturproteine zu fortgeschrittenen Differenzierungszeitpunkten (Tag 10 – 14).

Stammzellen in Gegenwart von HGF zeigten während der frühen Differenzierung (Tag 7 - 8) eine gegenüber entsprechenden Kontrollen gesteigerte Expression der Transkriptionsfaktoren GATA 4 und Nkx2.5, die zu den frühesten detektierbaren Genen in kardialen Progenitorzellen gehören und die kardiomyozytäre Differenzierung induzieren. Ebenso exprimierten die ESCs, die mit HGF stimuliert wurden, die Gene der kardialen Strukturproteine (Alpha-, Beta – MHC, MLC2v, ANF) stärker als die unbehandelten Kontrollen.

Während die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren in unbehandelten ESCs in der späteren kardiomyozytären Differenzierung (Tag 10 – 14) konstant blieb, konnte man einen zweiten Anstieg der GATA 4 und Nkx2.5 mRNA in Gegenwart von HGF beobachten. Dies könnte ein methodischer Effekt sein, da das Kultivierungsmedium \pm HGF an den jeweils ungeraden Differenzierungstagen gewechselt wurde. Andererseits könnte es sich um eine erneute Induktion zur kardiomyozytären Differenzierung noch nicht differenzierter ESCs handeln.

Die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen, die eine vermehrte Expression von Markergenen einer kardiomyozytären Differenzierung in Gegenwart von HGF zeigten, stimmen mit den funktionellen Beobachtungen überein. HGF Stimulation führte während der Differenzierung nicht nur zu früher, sondern auch zu mehr kontrahierenden EB. Rappolee D et al (1996) zeigten, dass die Ventrikel spezifische Isoform des MLC (MLC2v) kurz vor dem Auftreten von Kontraktionen in ESC exprimiert wird. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das Auftreten von kontrahierenden Arealen in den EB mit einer gesteigerten Expression der MLC2v mRNA einhergeht. HGF steigerte dabei die Genexpression von MLC2v um 23 – 61% gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Diese Ergebnisse könnten den erhöhten Anteil kontrahierender EB in der HGF Bedingung erklären.

Die Expression β – adrenerger und muskarinerger Rezeptoren ist Zeichen des fortgeschrittenen Entwicklungsstadiums der differenzierenden Kardiomyozyten (Goldenthal MJ et al, 2003). Die positive chronotrope Antwort auf den β – Adrenorezeptoragonisten Isoprenalin sowohl in der Kontrollbedingung als auch in Gegenwart von HGF zeigte am 10. Differenzierungstag einen vergleichbaren Effekt. Gleiches gilt für die negativ chronotropen Effekt durch Stimulation mit dem muskarinergen Cholinozeptoragonisten Carbachol. Dies spricht dafür, dass die in Gegenwart von HGF differenzierten Kardiomyozyten funktionell intakt sind.

Es konnten weder unter nativen Kulturbedingungen noch durch pharmakologische Stimulation ein signifikanter Unterschied in der Kontraktionsfrequenz zwischen unbehandelten ESCs und ESCs in Gegenwart von HGF festgestellt werden.

Die Expression des I_f – Ionenkanal in von ESC abstammenden Kardiomyozyten, die in ihrer Morphologie und Elektrophysiologie Schrittmacherzellen ähnlich waren, wurde bereits beschrieben (Hescheler J. et al., 1997). Allerdings gibt es bisher noch keine Daten über die Wirkung des spezifischen I_f – Kanal - Inhibitors Ivabradine auf von ESCs abstammenden Kardiomyozyten. In dieser Arbeit konnte jetzt erstmals gezeigt werden, dass Ivabradine in differenzierenden ESCs bereits im frühen Differenzierungsstadium negativ chronotrop wirkt. Diese Effekte waren signifikant stärker ausgeprägt als die unter muskarinerger Stimulation durch Carbachol. Diese Ergebnisse legen nahe, dass dem I_f – Ionenkanal eine wesentliche Schrittmacherfunktion in differenzierenden ESCs zukommt. Es zeigte sich dabei kein Unterschied zwischen HGF behandelten und unbehandelten Zellen.

Der Prozentsatz der Stammzellen, die *in vitro* zu Kardiomyozyten differenzieren, beträgt laut Literatur zwischen 3% bis 5% (Boheler K et al, 2002). Troponin T, ein Protein des kontraktilen Apparates, ist kennzeichnend für Kardiomyozyten, weswegen es klinisch auch zur Myokardinfarkt Diagnostik genutzt wird. Die Immunfärbung in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass unter normalen Serumbedingungen der Troponin T positive Bereich $3.07 \pm 0.71\%$ des gesamten EB beträgt. Somit konnten die Ergebnisse von Boheler in den Experimenten bestätigt werden. In Anwesenheit von HGF betrug der Troponin T positiv gefärbte Bereich $4.63 \pm 1.05\%$ des Embryoid Bodies, was einer signifikanten Steigerung von 50.5 % gegenüber der Kontrolle entspricht.

Diese Daten legen nahe, dass eine Kultivierung von embryonalen Stammzellen in Gegenwart von HGF zu einem vermehrten Auftreten von Kardiomyozyten führt. Dies konnte sowohl an der verstärkten Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und Strukturgene als auch an der erhöhten Proteinexpression von Troponin T dargestellt werden. Die Funktionalität der in Gegenwart von HGF kultivierten Kardiomyozyten konnte *in vitro* an dem vermehrten und früheren Auftreten von kontrahierenden Arealen als auch an deren adäquaten Reaktion auf pharmakologische Stimulationen gezeigt werden.

5.2 Analyse der nicht – kardiale Differenzierung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass HGF die Differenzierung humaner ESCs in Zelltypen aller drei Keimblätter verstärkt (Schuldiner M et al, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob auch in diesem Modell die Differenzierung der ESCs zu nicht – kardialen Zellen durch HGF verstärkt wird. Dies wurde anhand einzelner repräsentativer Gene der verschiedenen embryonalen Keimblätter mittels RT – PCR untersucht.

HGF ist ein starkes Mitogen für Hepatozyten (Nakamura T et al, 1984), so dass eine verstärkte Expression der Albumin - mRNA als Marker für Hepatozyten nicht verwundert würde. Es konnte auch schon anhand von Knochenmarksstammzellen gezeigt werden, dass HGF die Differenzierung zu Hepatozyten induziert (OH SH et al, 2000). In den vorliegenden Experimenten konnte jedoch keine Regulation der Albumin mRNA durch HGF beobachtet werden. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied könnte an den für die hepatische Differenzierung zu frühen Zeitpunkten liegen, die untersucht wurden. Es kann anhand dieser Daten nicht ausgeschlossen werden, dass HGF zu späteren Zeitpunkten auch die Differenzierung von Hepatozyten beeinflusst.

In einer Studie von Kokuzawa J et al (2003) konnte eine neuronale Differenzierung von aus Mäuseembryos gewonnenen neuronalen Stammzellen, die mit HGF stimuliert wurden, dargelegt werden. Eine neuronale Differenzierung embryonaler Stammzellen in Gegenwart von HGF wurde bisher noch nicht beschrieben. Die Analyse der mRNA Expression von 68 – NFL deutet darauf hin, dass HGF die neuronale Differenzierung zumindest in der frühen Differenzierung nicht reguliert.

Die Analyse der endothelialen Marker Alpha – SMA, FLK – 1 und VE – Cadherin ergab überraschende Ergebnisse, da ein Effekt durch HGF Stimulation zu erwarten gewesen wäre. Mehrere Studien konnten zeigen dass HGF angiogenetisch wirkt und die Proliferation und Migration von Endothelzellen induziert (Bussolino F et al, 1992; Taniyama Y et al, 2001). In der vorliegenden Arbeit zeigten die untersuchten endothelialen Marker jedoch keine veränderte Expression durch HGF. Einschränkend gilt jedoch, dass auch hier die untersuchten Differenzierungszeitpunkte eine Rolle spielen könnten.

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von HGF in unterschiedlichen Zelltypen und der essentiellen Bedeutung während der Embryogenese erscheint es unwahrscheinlich, dass HGF in ESC ausschließlich die kardiale Differenzierung fördert. Die vorliegenden Daten legen jedoch nahe, dass HGF in der frühen Differenzierungsphase (Tag 7 -14) embryonaler Stammzellen eine wichtige Bedeutung vor allem für die kardiomyozytäre Differenzierung zukommt.

5.3 Beurteilung der Kardiomyogenese unter Serum – reduzierten Kulturbedingungen

Da die ESCs mit Tierserum kultiviert werden, dessen Zusammensetzung nur schlecht definiert ist, haben noch zahlreiche unbekannte Faktoren Einfluss auf die kardiomyozytäre Differenzierung. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob durch Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium die Effekte von HGF noch deutlicher werden. Es zeigte sich jedoch, dass die EB unter diesen serumreduzierten Kulturbedingungen bedeutend kleiner waren und es nicht zum Auftreten spontan kontrahierender Areale kam. Zudem zeigten die Genexpressionsanalysen, dass wesentliche Gene kardialer Strukturproteine nicht (Alpha MHC) oder nur reduziert (Beta – MHC) exprimiert wurden. Dies gilt auch für ESCs, die in Gegenwart von HGF differenzierten. Dies deutet darauf hin, dass die Kardiomyogenese in Serum – reduzierten Bedingungen sowohl unter basalen Bedingungen als auch in Gegenwart von HGF gestört war. Zum einen kann dies durch den niedrigeren mitotischen Index und die erhöhte Apoptoserate erklärt werden (Heng BC et al, 2003). Zum anderen könnten zusätzliche Faktoren für die kardiomyozytäre Differenzierung benötigt werden, die nicht in ausreichender Quantität in den serumreduzierten Kulturbedingungen vorhanden sind. Eine ausschließliche Stimulation mit HGF scheint für eine vollständige Differenzierung in funktionelle Kardiomyozyten nicht ausreichend zu sein.

5.4 Mechanismus der durch HGF vermittelten kardiomyozytären Differenzierung

Die Transkriptionsfaktoren GATA 4 und Nkx2.5 werden im präkardialen Mesoderm koexprimiert und aktivieren synergistisch herzspezifische Gene. Ihre essentielle Bedeutung für die kardiomyozytäre Differenzierung wurde in vielen Studien bewiesen (Merika M et al, 1993; Molkenstein JD et al, 1997, Schott JJ et al, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass embryonale Stammzellen in Gegenwart von HGF diese Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimieren. Dieser Effekt scheint über eine verstärkte Aktivierung des Phosphatidylinositol 3-kinase / Akt Signaltransduktionsweges vermittelt zu werden.

Die Phosphatidylinositol 3-kinasen (PI3K) ist eine Gruppe von Enzymen, die an einer Vielzahl zellulärer Schlüsselfunktionen wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben beteiligt sind. Am Herzen vermitteln vor allem die Klassen Ia der PI3K das postnatale Wachstum des Herzens und die physiologische Myokardhypertrophie bei körperlicher Aktivität. (McMullen JR et al, 2003). Die Klasse Ia PI3K interagieren mit Tyrosinkinase, die z. B. durch Insulin oder IGF – 1, aber auch durch HGF (Wang Y et al, 2004) aktiviert werden. Die aktivierte Klasse Ia PI3K phosphorylieren die Proteinkinase Akt, welche wiederum über Aktivierung vor allem der mammalian target of rapamycin (mTOR), der Glykogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) sowie verschiedener Anti – Apoptotischer Proteine die myokardialen Effekte vermittelt (Übersicht in Matsui T et al, 2005).

Eine Beteiligung der PI3K an der kardiomyozytären Differenzierung konnte bereits nachgewiesen werden (Sauer H et al, 2000). Auch in den vorliegenden Experimenten mit den PI3K Inhibitoren Wortmannin und LY294002 zeigten die embryonalen Stammzellen eine deutlich reduzierte Expression der Nkx2.5, GATA 4, Alpha – und Beta - MHC mRNA durch Inhibition der PI3K. Sauer et al begründen diese reduzierte Kardiomyogenese in Gegenwart eines PI3K Inhibitors damit, dass die PI3K direkt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reguliert. Zu den ROS werden unterschiedliche Sauerstoffradikale gezählt, die unter anderem als intrazelluläre Signalmoleküle die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen induzieren (Sauer H et al, 2000). In Anwesenheit eines PI3K Inhibitors kommt es zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären ROS Bildung und somit der kardiomyozytären Differenzierung.

Die Ergebnisse der hier dargestellten Experimente mit den PI3K Inhibitoren zeigten zudem, dass die Effekte von HGF auf die Expression der kardialen Markergene in Gegenwart eines PI3K Inhibitors gegenüber der unbehandelten Kontrolle aufgehoben waren. HGF scheint somit durch Aktivierung der PI3K die kardiomyozytäre Differenzierung zu verstärken. Ein vergleichbares Ergebnis ergab in dieser Arbeit auch die Immunfärbung der Embryoid Bodies mit einem Anti – pAkt – Antikörper. Mit dieser unabhängigen Methode, mit der die Phosphorylierung von Akt als wesentliches Zielprotein der PI3K untersucht wurde, zeigte sich durch HGF eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt in Arealen, die sich mit Troponin T anfärbten, also myokardialen Zellen entsprechen.

Chen J et al (2004) berichten, dass mittels PI3K aktiviertes Akt zur Phosphorylierung und somit zur Aktivierung des p300 führt. P300 ist ein transkriptionaler Koaktivator, der unter anderem die DNA Bindungsaktivität unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren erhöht. Für die embryonale Kardiogenese ist p300 von großer Bedeutung, wie die embryonale Letalität von homozygoten p300 Knock – Out Mäusen aufgrund gestörter Herzentwicklung zeigt (Shikama N et al, 2003). Im Modell der embryonalen Stammzellen konnte gezeigt werden, dass p300 während der kardiomyozytären Differenzierung GATA 4 acetyliert und so dessen DNA Bindungsaktivität erhöht (Kawamura T et al, 2005), wodurch die Expression weiterer kardialer Gene induziert wird.

In den vorliegenden Experimenten führte HGF Stimulation zu einer signifikant erhöhten Expression der mRNA von Nkx2.5 und GATA 4 durch Aktivierung des PI3K / Akt Signalweges. Dieser Effekt war für Nkx2.5 wesentlich stärker ausgeprägt als für GATA 4. Während der Kardiogenese wird Nkx2.5 direkt von GATA 4 reguliert (Brewer AC et al, 2005). Aufgrund der oben genannten Studien ist es denkbar, dass HGF über PI3K / Akt zur Phosphorylierung von p300 führt. Eine durch p300 erhöhte Bindungsaktivität von GATA 4 könnte die stärkere Nkx2.5 mRNA Expression erklären. Allerdings könnte es auch zu einer direkten Aktivierung von Nkx2.5 durch HGF kommen.

Abbildung 5.1 zeigt die möglichen Mechanismen der durch HGF induzierten kardiomyozytären Differenzierung.

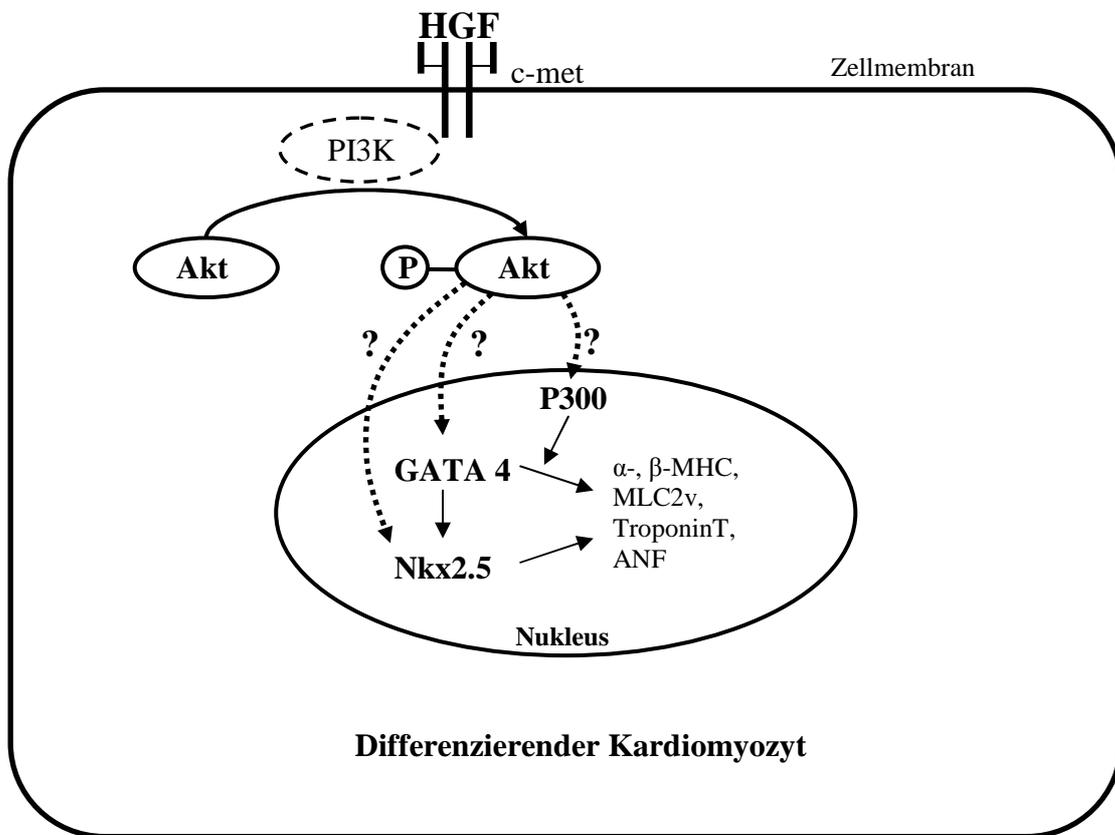


Abb. 5.1 – Schema eines möglichen Mechanismus der kardiomyozytären Differenzierung durch HGF

HGF interagiert mit dem c – met Rezeptor, dessen intrazelluläre Tyrosinkinase die Phosphatidylinositol 3 – Kinase aktiviert. Die PI3K phosphoryliert Akt, welches möglicherweise direkt die Expression der kardialen Transkriptionsfaktoren hochreguliert. Phospho – Akt könnte aber auch über eine Aktivierung des p300 die DNA Bindungsaktivität des GATA 4 erhöhen. Die Transkriptionsfaktoren führen zur verstärkten Expression der kardialen Strukturgene und nachfolgender Proteinsynthese.

Einschränkend bleibt zu erwähnen, dass nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass durch HGF vermittelte anti – apoptotische Effekte an den bereits kardiomyozytär differenzierenden Zellen zu den beschriebenen Effekten beitragen (siehe Abbildung 5.2). Für die Hypothese der durch HGF vermittelten Anti – Apoptose sprechen Studien, die dies bereits an adulten Kardiomyozyten nachgewiesen haben (Kitta K. et al, 2003, Wang Y et al, 2004). Über den genauen Signaltransduktionsmechanismus gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Kitta K et al (2003) konnten zeigen, dass dieser anti – apoptotischer Effekt von HGF über den MEK - ERK Signaltransduktionsmechanismus vermittelt wird (Vgl. Abb. 2.2). In der Studie von Wang Y et al wurde die HGF vermittelte Anti - Apoptose über eine Aktivierung der PI3K induziert. Auch in epithelialen (Liu Y et al, 1999) und neuronalen Zellen (Zhang L et al, 2000) hat HGF anti – apoptotische Effekte via PI3K / Akt. Allerdings gibt es auch Daten, wonach der PI3 – Kinase – AKT Signaltransduktionweg nicht in der HGF – abhängigen Antiapoptose in Kardiomyozyten involviert zu sein scheint (Nakamura T. et al., 2000).

Darüber hinaus reguliert die Aktivierung von Akt den Zellzyklus und führt zum Übergang von der G2 Phase zur M Phase (Kandel et al, 2002). Dies konnte auch schon an kardialen Vorläuferzellen gezeigt werden, wo Akt an der Proliferation kardialer Progenitorzellen beteiligt ist. (Gude N et al, 2006). Aufgrund dieser Daten wäre auch eine Zunahme der Proliferation von aus ESCs stammenden kardialen Progenitorzellen durch HGF möglich und nicht ein Effekt auf die kardiomyozytäre Differenzierung noch undifferenzierter ESCs. Für einen Effekt insbesondere auf die kardiomyozytäre Differenzierung der embryonalen Stammzellen sprechen jedoch die Beteiligung des HGF an der physiologischen Kardiogenese (Rappolee D. et al., 1996) und die Expression des c – met Rezeptor in undifferenzierten ESC (Schuldiner M et al, 2000).

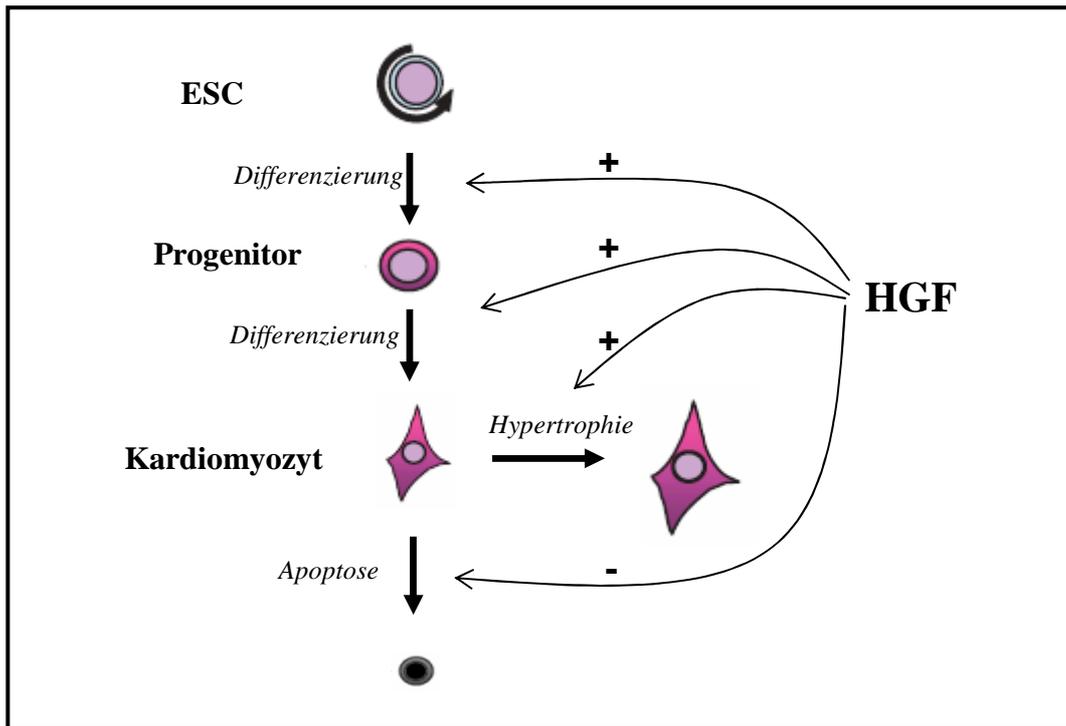


Abb. 5.2 – Mögliche Effekte des Hepatocyte Growth Factors

HGF kann an der Differenzierung embryonaler Stammzellen bzw. kardialer Progenitorzellen beteiligt sein, könnte aber auch hypertrophische bzw. anti – apoptotische Effekte für bereits differenzierten Kardiomyozyten haben (modifiziert nach Wobus AM, 2005).

5.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Ein Zellersatz durch Stammzellen stellt neue Therapiemöglichkeiten für eine Vielzahl unterschiedlicher Erkrankung wie Morbus Parkinson, Diabetes mellitus und dem Myokardinfarkt dar. Die Beschränkung für einen klinischen Einsatz bei kardiovaskuläre Erkrankungen ist unter anderem die nur wenig beeinflussbare Differenzierung der embryonalen Stammzellen und die daraus resultierende geringe Zahl an gewonnenen Kardiomyozyten und kardialen Vorläuferzellen.

Die vorliegende Arbeit legt nahe, dass eine Applikation des Hepatocyte Growth Factors zu einer vermehrten Generierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen führt. Stammzellen in Gegenwart von HGF zeigten eine verstärkte Expression sowohl der kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA 4 als auch kardialer Strukturgene und –proteine. Darüber hinaus erhöhte HGF die Zahl der Embryoid Bodies mit spontan kontrahierenden Arealen, die Kardiomyozyten entsprechen, signifikant ohne die Kontraktionsfrequenz oder die Effekte einer positiv oder negativ chronotropen Stimulation zu beeinflussen. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass HGF diese Effekte über eine Aktivierung des intrazellulären PI3K / Akt Signaltransduktionsmechanismus vermittelt.

In weiteren Untersuchungen gilt es zu klären, in welchem Stadium der Differenzierung HGF diese Effekte ausübt. Sowohl ein induktiver Effekt von HGF auf die Differenzierung von Stammzellen oder kardialen Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten als auch ein anti – apoptotischer Effekt bzw. eine verstärkte Proliferation kardiomyozytärer Vorläuferzellen erscheint möglich. Zudem ist die Bedeutung von HGF im Zusammenspiel mit anderen Molekülen, die die kardiomyozytäre Differenzierung verstärken (wie z.B. IGF-1), zu untersuchen. Eine Kombination verschiedener Substanzen könnte die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen zusätzlich potenzieren.

Weitere Studien zur Kardiogenese und den daran beteiligten Mechanismen sind erforderlich, um die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen zu verstehen und auch kontrollieren zu können, um in Zukunft Kardiomyozyten in ausreichender Anzahl für einen Zellersatz zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen zu gewinnen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D: Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ('funny') current. *Pharmacol Ther* 2005, 107: 59-79
2. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM: Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res.* 2002, 91: 189-201.
3. Brewer AC, Alexandrovich A, Mjaatvedt CH, Shah AM, Patient RK, Pizzey JA: GATA factors lie upstream of Nkx 2.5 in the transcriptional regulatory cascade that effects cardiogenesis. *Stem Cells Dev.* 2005, 14: 425-39.
4. Bruneau BG: Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* 2002, 90:509-519.
5. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM: Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol.* 1992, 119: 629-41.
6. Cantley LC: The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 2002, 296: 1655-57.
7. Classen M, Diehl V, Kochsiek K, Schmiegel W, Berdel WE, Böhm M: 17.1 Diabetes mellitus. *Innere Medizin.* Urban und Fischer 2004, 5. Auflage.
8. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985, 87: 27-45.

9. Duan HF, Wu CT, Wu DL, Lu Y, Liu HJ, Ha XQ Zhang QW, Wang H, Jia XX, Wang LS: Treatment of myocardial ischemia with bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hepatocyte growth factor. *Mol. Ther.* 2003, 8:467-474
10. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981, 292: 154-6.
11. Fishman MC, Chien KR: Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 1997, 124: 2099-2117.
12. Funakoshi H, Nakamura T: Hepatocyte growth factor: from diagnosis to clinical applications. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 327: 1-23.
13. Gepstein L: Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res.* 2002, 91: 866-76.
14. Goldenthal M, Marin – Garcia J: Stem cells and cardiac disorders: an appraisal. *Cardiovascular Research* 2003, 58: 369-377.
15. Gude N, Muraski J, Rubio M, Kajstura J, Schaefer E, Anversa P, Sussman M: Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ. Res.* 2006, 99: 381-388.
16. Hamm CW, Arntz HR, Bode C, Giannitsis E, Katus H, Levenson B, Nordt T, Neumann FJ, Tebbe U, Zahn R: Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS). *Z. Kardiol.* 2004, 93: 324 – 341.
17. Heng BC, Haider HK, Kwang-Wei Sim E, Cao T, Chye Ng S: Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular Res.* 2004, 62: 34-42.
18. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K: Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1997, 36: 149-62.

19. Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E: Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. *Z. Kardiol.* 2005, 94: 488-509
20. Huang WC, Chen CC: Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 2005, 25: 6592-602.
21. Kabrun N, Buhring HJ, Choi K, Ullrich A, Risan W, Keller G: Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* 1997, 124: 2039-48.
22. Kandel ES, Skeen J, Majewski N, Di Cristofano A, Pandolifi PP, Feliciano CS: Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/M cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 2002, 22:7831-41.
23. Kawamura T, Ono K, Morimoto T, Wada H, Hirai M, Hidaka K, Morisaki T, Heike T, Nakahata T, Kita T, Hasegawa K: Acetylation of GATA-4 is involved in the differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2005, 280: 19682-8.
24. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Lee SH, Nguyen J, Sanchez-Pernaute R, Bankiewicz K and McKay R: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002, 418:50-56.
25. Kitta K, Day RM, Kim Y, Torregroza I, Evans T, Suzuki YJ: Hepatocyte growth factor induces GATA-4 phosphorylation and cell survival in cardiac muscle cells. *Biol Chem.* 2003, 278: 4705-12.
26. Klinz F, Bloch W, Addicks K, Hescheler J: Inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase blocks development of functional embryonic cardiomyocytes. *Exp Cell Res.* 1999, 247: 79-83.

27. Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, Shinoda J, Kaku Y, Iwama T, Morishita R, Shimazaki T, Okano H, Kunisada T, Sakai N: Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos. *Mol. Cell. Neurosci.* 2003, 1:190-197.
28. Kuo CT, Morrisey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C, Leiden JM: GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 1997, 11: 1048-1060.
29. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, and Soria B: In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2004, 47: 1442-1451.
30. Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP: Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 1993, 119: 419-431.
31. Liu Y: Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanisms. *Am J Physiol* 1999, 277: 624-633.
32. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K: Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006, 12:1199-209.
33. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP: Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeobox gene, Nkx2-5. *Genes Dev.* 1995, 281:108-111.
34. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78: 7634-8.

35. Matsui T, Rosenzweig A: Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3 – kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol.* 2005, 38: 63 – 71.
36. Matsumori A, Furukawa Y, Hashimoto T, Ono K, Shioi T, Okada M, Iwasaki A, Nishio R, Sasayama S: Increased circulating hepatocyte growth factor in the early stage of acute myocardial infarction, *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 221: 391-5.
37. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12355-60.
38. Merika M, Orkin S: DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol.* 1993, 13: 3999-4010.
39. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN: Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 1997, 11: 1061-72.
40. Molkentin JD: The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, -6: ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000, 275: 38949-38952.
41. Morishita R, Motokuni A, Naotaka H, Yamasaki K, Kurinami H, Shimizu S, Makino H, Takesya Y, Azuma T, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor (HGF). *Current Gene Therapy* 4 (2004) 199-206.
42. Nakamura T, Mizuno S, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H: Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF. *J Clin Invest.* 2000, 106: 1511-9.

43. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984, 122: 1450 - 59.
44. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 1998, 12:2048-60.
45. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA: Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001, 19: 193-204.
46. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shirma N, Higashio K, Namba M: Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, 279: 500-504.
47. Orlic D, Hill JM, Arai AE: Stem Cells for Myocardial Regeneration. *Circulation Res.* 2002, 91: 1092-1102.
48. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P: Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98: 10344-9.
49. Passier R, Mummery C: Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc Res.* 2003, 58: 324-335.
50. Rappolee DA, Iyer A, Patel Y: Hepatocyte growth factor and its receptor are expressed in cardiac myocytes during early cardiogenesis. *Circ Res.* 1996, 78: 1028-36.
51. Sachinidis A, Fleischmann BK, Kolossov E, Wartenberg M, Sauer H, Hescheler J: Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc Res.* 2003, 58: 278-91.

52. Santos OF, Barros EJ, Yang XM, Matsumoto K, Nakamura T, Park M, Nigam SK: Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev. Biol.* 1994, 163: 525-529.
53. Sauer H, Rahimi G, Hescheler J, Wartenberg M: Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3 – kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2000, 476:218-223.
54. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM, REPAIR-AMI Investigators: Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2006, 12:1210-21.
55. Scheid MP, Woodgett JR: PKB/AKT: Functional insights from genetic models. *Nat. Rev., Mol. Cell Biol.* 2001, 2: 760-768.
56. Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K: *Anatomie.* Springer Verlag 1999, 7:506-514.
57. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG: Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998, 281: 108-11.
58. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, 97: 11307-12.
59. Schultheiss TM, Xydas S, Lassar AB: Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development* 1995, 121: 4203-4214.
60. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S: Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007, 28: 766-772.

61. Shikama N, Lutz W, Kretzschmar R, Sauter N, Roth JF, Marino S, Wittwer J, Scheidweiler A, Eckner R; Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *Embo J* 2003, 22: 5175-85
62. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Motreau J, Stahl M, Rogers D: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988, 336:688-90.
63. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C: Scatter factor / hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.* 1993, 123: 223-235.
64. Stern CD, Ireland GW, Herrick SE, Gherardi E, Gray J, Perryman M, Stoker M: Epithelial scatter factor and development of the chick embryonic axis. *Development* 1990, 110: 1271-1284.
65. Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, Baker J, Kofidis T, Gunawan F, Lebl DR, Caffarelli AD, de Bruin JL, Fedoseyeva EV, Robbins RC: Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 2005, 112: 1166-1172.
66. Taniyama Y, Morishita R, Hiraoka K, Aoki M, Nakagami H, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. *Circulation* 2001, 104: 2344-50.
67. Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard V, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng Z, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff D, Hong Y: Heart Disease and Stroke Statistics—2006 Update. *Circulation* 2006, 113:85-151.

68. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998, 282: 1145-1147.
69. Trounson A: Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. *Reprod Biomed.* 2002, 4 Suppl 1:58-63.
70. Ueda H, Nakamura T, Matsumoto K, Sawa Y, Matsuda H: A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats, *Cardiovasc Res.* 2001, 51: 41-50.
71. Ventura C, Maioli M: Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. *Circ Res.* 2000, 87: 189-194.
72. Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF: A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994, 269: 5241-8.
73. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E: The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001, 122: 699 – 705.
74. Wang Y, Ahmad N, Wani MA, Ashraf M: Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J. Mol. Cell. Card.* 2004, 37: 1041-1052.
75. Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP: Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002m quercetin, myricetin and staurosporine. *Mol Cell* 2000, 6: 909-919.
76. Wang Y, Ahmad N, Maqsood AW, Ashraf M: Hepatocyte growth factor prevents ventricular remodeling and dysfunction in mice via Akt pathway and angiogenesis. *J Mol Cell Card* 2004, 37: 1041-1052.

77. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W: The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor / hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J. Cell Biol.* 1993, 121: 145-154.
78. Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji Guanju, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM: Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997, 29:1525-39.
79. Wobus AM, Boheler KR: Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol. Rev* 2005, 85: 635-678.
80. Zhang L, Himi T, Morita I, Murota S: Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase / Akt pathway. *J Neurosci Res* 2000, 59: 489-96.

7 PUBLIKATIONEN / DANK

7.1 Publikationen

Während der vorgelegten Dissertation entstanden folgende Publikationen und Vorträge:

Ukena C, Roggia C, Michaely J, Müller P, Kilter H: Hepatocyte growth factor (HGF) verstärkt die kardiomyozytäre Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus. *Clin. Res. Cardiol.* 2006, 95: Suppl 5.

Roggia C*, Ukena C*, Böhm M, Kilter H: Hepatocyte growth factor (HGF) enhances cardiac commitment of differentiating embryonic stem cells by activating PI3 kinase. *Exp. Cell Res.* 2007, 313:921-930.

* contributed equally

7.2 Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Böhm für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Disseratationsarbeit in den Laboratorien der Klinik für Innere Medizin III der Universität des Saarlandes erstellen zu können.

Herrn Dr. med. H. Kilter danke ich für seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung sowie für seine hilfreiche und anspruchsvolle Unterstützung in allen Abschnitten der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. C. Roggia für die Einarbeitung in die Methode der Stammzellkultivierung sowie für die Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Weiterhin möchte ich allen Doktoranden, technischen Assistenten und Mitarbeitern des Labors für die gute Zusammenarbeit danken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch nochmals bei meiner Frau Julia für Ihren Glauben an mich und Ihre unermüdliche Geduld während meiner wissenschaftlichen Arbeit und bei meinen Eltern für Ihre Unterstützung während meines Studiums bedanken.

8 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 19.09.1981
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet mit Julia Anna Ukena, geb. Twarogowska
Konfession: evangelisch
Eltern: Prof. Dr. Dieter Ukena
Brighid Ukena

Schulbildung:

1988 - 1992 Luitpoldschule, Homburg / Saar
1992 – 2001 Helmholtz – Gymnasium, Zweibrücken
06 / 2001 Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2001 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes,
Homburg / Saar
09/2003 Ärztliche Vorprüfung
08/2006 Internistisches Tertial des Praktischen Jahres in der
Western Infirmary, Glasgow, Schottland
12/2006 Chirurgisches Tertial des Praktischen Jahres in der
Chirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes
03/2007 Anästhesiologisches Tertial des Praktischen Jahres in der Klinik
für Anästhesiologie der Universität des Saarlandes

Doktorarbeit:

07 / 2004 Doktorand bei Prof. Dr. M. Böhm
Klinik für Innere Medizin III
Universität des Saarlandes