

**Kardiomyozyten abhängige parakrine Mechanismen und
ihre Wirkung auf nichtmyozytäre Zellen im Myokard
und die Alterung des Herzens:
Rolle von STAT3**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Eva Christine Podewski
geboren am 21. April 1978 in Bielefeld

2007

Referent: Herr Prof. Dr. W. Müller
Korreferentin: Frau Prof. Dr. M. Szamel
Tag der Promotion: 04. Januar 2007

„... und will das steinerne Herz aus eurem Fleisch wegnehmen und euch ein fleischernes Herz geben.“

Hes. 36,26

Zusammenfassung

Die Funktion des Herzens ist durch die Kommunikation von Zellen unterschiedlichen Typs gekennzeichnet. Besonders in Stresssituationen und nach Schädigung garantieren parakrine Signale eine adäquate Antwort und Regeneration. Über parakrine Faktoren kardiomyozytären Ursprungs ist wenig bekannt, vor allem in Bezug auf den kardioprotektiven Transkriptionsfaktor STAT3.

In der vorliegenden Arbeit sollten die parakrinen Ursachen der vorgezogenen Alterung des Myokards bei Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* untersucht werden. Das Mausmodell mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) zeigte mit zunehmendem Alter eine erhöhte interstitielle Fibrose und verminderte Kapillarisation mit einer binnen eines Jahres tödlich verlaufenden Herzinsuffizienz. Der Phänotyp der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere zeigt einen Einfluß des auf die Kardiomyozyten begrenzten STAT3 *knock out* auf nichtkardiale Zellen.

Anhand von Alterungsmarkern und Transkriptionsfaktoren (p53, p21^{Cip1/Waf1}, p16^{Ink4a}, Mef2c, Nkx2.5, GATA4, CyclinD, Bcl-2 und BNIP3) konnte auf transkriptioneller und translationeller Ebene im Myokard und bei Progenitorzellen die Alterung des α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Myokards aufgezeigt werden.

Der kardiomyozytenspezifische STAT3 *knock out* scheint über parakrine Signale auf Fibrose und Angiogenese zu wirken. Die Bedeutung der von Kardiomyozyten ausgeschütteten parakrin wirkenden Signale, konnte nachgewiesen werden. *In vitro* gewonnenes konditioniertes Medium adulter Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* steigerte die Proliferation muriner embryonaler Fibroblasten (MEF), dagegen hatte es bei Endothelzellen eine hemmende Wirkung. α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Kardiomyozyten exprimieren verstärkt die Zytokine Interleukin-15 (IL-15) und *bone morphogenetic protein* (BMP-3). Es konnte gezeigt werden, dass IL-15 eine proliferationshemmende Wirkung auf murine Endothelzellen hat. BMP-3 zeigte eine proliferationsstimulierende Wirkung auf murine embryonale Fibroblasten (MEF). Es scheinen verschiedene Zytokine durch kombinierte Wirkung den Phänotyp hervorzurufen.

Durch fraktionierte Untersuchung von Kardiomyozytenüberständen konnten mit massenspektrometrischen Methoden im *differential peptide display* (DPD) Veränderungen in der Zusammensetzung des präkonditionierten Mediums der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren erfaßt werden. Die proliferationssteigernde Wirkung von Fraktionen mit veränderter Peptidzusammensetzung konnte an MEF gezeigt werden. Bei einer Peptidsequenzierung wurden als potentielle proliferationshemmende Faktoren des Wildtyp Cytochrom C-Oxidaseuntereinheiten CoxVIA2 und CoxVIA1 identifiziert, außerdem Peptidfragmente des NADH Dehydrogenase 1 α Subkomplex 4 (Ndufa4) mit scheinbar stimulierender Wirkung. Bei STAT3 *knock out* Kardiomyozyten konnten als potentiell proliferationsfördernde parakrine Faktoren Fragmente der *myosin heavy chain* identifiziert werden.

Die parakrine Bedeutung adulter Kardiomyozyten für Alterung und Funktion des Myokards konnte für Fibroblasten, Endothelzellen und potentielle Progenitorzellen gezeigt werden.

STAT3 - parakrine Mechanismen - Stammzellen

Abstract

Cell communication by paracrine mechanisms contributes to the preservation of physiological constitutions. The signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) participates in a wide variety of physiological processes in cells, and has a cardioprotective effect in cardiac myocytes. So far, little is known about its participation in the paracrine signaling pathway in cardiac myocytes.

In this thesis it could be demonstrated, that cardiac myocyte induced paracrine mechanisms control fibrosis and angiogenesis of the heart. STAT3 dependent secreted paracrine factors of cardiac myocytes involved in fibrosis of the heart could be identified. Nearly one year old mice harboring cardiomyocyte restricted knock out of STAT3 died of heart failure showing increased interstitial fibrosis and reduced myocardial capillary density.

Hearts of 3, 6 and 12 months old mice were observed for markers of premature cellular senescence leading to the premature death. The existence of a genotype dependent divergent expression of MEF2c and tumor suppressor p53 could be demonstrated. Mice with cardiomyocyte restricted STAT3 knock out showed a reduced number of progenitor cells, with different expression-pattern. Evaluation of the differentiation potential of cardiac progenitor cells in cocultures was examined by immunohistological staining and the molecular investigation of cardiac markers.

To test the paracrine effects leading to this phenotype cultured murine cardiac cells were exposed to conditioned medium of adult STAT3 knock out cardiomyocytes. Fibroblast proliferation was found to be increased, while endothelial cell proliferation was inhibited. Sca-1⁺ stem and progenitor cells and P19 PCL6 cells showed no reaction to the stimulus.

Furthermore, it could be demonstrated that cardiac cells expressed cytokines induced the same effect. Bone morphogenetic protein 3 enhances fibroblast proliferation while interleukin 15 has an inhibitory effect on endothelial cells.

Some fractions of conditioned medium differing in mass-spectrometrical analysis from wildtype fractions enhanced fibroblast proliferation and were sequenced for amino acids. Proceeding in this way some interesting peptides could be identified: Two inhibiting peptides in wildtype conditioned medium were identified as fragments of cytochrome C oxidase subunits VIA2 and VIIA1. Also one stimulating or neutral peptide was detected in wildtype conditioned medium: a fragment of the NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 α subcomplex 4 (Ndufa4). In conditioned medium of STAT3-deficient cardiomyocytes the fragments of myosin heavy chain isoforms could be identified, which seem to have a stimulatory effect on fibroblast proliferation.

STAT3 - paracrine mechanisms - stem cells

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Parakrine Mechanismen	1
1.2	Embryonale Herzentwicklung.....	1
1.3	Übersicht über die Herzzellen	2
1.3.1	Kardiomyozyten.....	3
1.3.2	Fibroblasten.....	4
1.3.3	Endothelzellen.....	4
1.3.4	Weitere Zellen mit kardialer Lokalisation	5
1.3.5	Stammzellen.....	5
1.4	Myokardschädigung	7
1.4.1	Einführung in die Myokardalterung	7
1.5	Bedeutung von STAT3.....	12
1.5.1	Genstruktur von STAT3	12
1.5.2	Der JAK/STAT3-Signalweg.....	13
1.6	Der gewebespezifische knock out mit MHC-Promotor gesteuerter Cre-Rekombinase.....	14
1.6.1	Gewebespezifischer <i>knock out</i>	14
1.6.2	Einführung in <i>myosin heavy chain</i>	15
1.6.3	Phänotyp des STAT3 <i>knock out</i> Mausstamms	15
1.7	Kardiale Zytokine und STAT3 abhängige Zytokinexpression in Kardiomyozyten	17
1.8	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Verbrauchsmaterial	20
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	Chemikalien und Medien.....	22
2.1.4	Antikörper	24
2.1.5	verwendete Oligonukleotidprimer und Amplifikationsbedingungen	25
2.2	Die Tierhaltung	27
2.2.1	Die verwendeten Tiere	27
2.2.2	Tierhaltung und Genotypisierung	27
2.3	Darstellung der verwendeten Zellen und Kultivierungsbedingungen.....	28
2.3.1	Medien und Kultivierungsbedingungen.....	28
2.3.2	Präparation und Kultivierung von Fibroblasten	28
2.3.3	P19-Zellen	30
2.3.4	Kardiomyozyten.....	31
2.3.5	Zellsortierung mit <i>fluorescens activated cell sorter</i> (FACS).....	34
2.3.6	Zellsortierung mit <i>magnetic activated cell sorter</i> (MACS).....	34
2.3.7	Immunmarkierung zur Vorbereitung des MACS	35

Inhaltsverzeichnis

2.3.8	Isolation von Maus-Lungen-Endothelzellen (MLEC).....	35
2.3.9	Isolation einer kardiomyozytendepletierten Fraktion aus Herzgewebe	37
2.3.10	Zellmarkierung mit Tamra	39
2.3.11	Zellzahlbestimmung mit Neubauerzählkammer und Vitalfärbung	39
2.3.12	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	40
2.3.13	Inkubation von Progenitorzellen mit 5-Azacytidin	41
2.4	Methoden zur Untersuchung parakriner Faktoren	41
2.4.1	Gewinnung von Überständen adulter Kardiomyozyten.....	41
2.4.2	Proliferationsassay	42
2.4.3	Der differential peptide display (DPD).....	43
2.4.4	Chromatographie und Rechromatographie.....	43
2.4.5	Peptide Display	43
2.5	Nukleinsäuren	44
2.5.1	Isolierung genomischer DNA für Genotypisierung.....	44
2.5.2	Isolierung von RNA aus Zellen.....	44
2.5.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	45
2.5.4	Reverse Transkription	45
2.5.5	Polymerasekettenreaktion.....	46
2.5.6	Optimierung der Realtime Quantitative PCR	48
2.5.7	Gelelektrophorese: Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese.....	51
2.6	Untersuchung von Proteinen mittels Western-Blot Analyse	51
2.6.1	Gewebeentnahme für Proteinanalyse.....	51
2.6.2	Isolation von Protein.....	52
2.6.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	53
2.6.4	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	53
2.6.5	Transfer	55
2.6.6	Ponceaufärbung	55
2.6.7	Immunodetektion.....	56
2.6.8	Immunfärbung in Petrischalen und Chambersliedes	56
3	<i>Ergebnisse</i>	58
3.1	Isolierung und Charakterisierung von SP-Zellen	58
3.1.1	Verschiedene Methoden zur Isolierung von Stammzellen.....	58
3.1.2	Beschreibung der Sca1 ⁺ -Zellen	60
3.1.3	Analyse des Gehalts an Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse	61
3.1.4	Untersuchung der Stimulierbarkeit der Sca1 ⁺ -Zellen	62
3.2	Molekularbiologische Untersuchung der Sca1 ⁺ Zellen	63
3.2.1	Untersuchung endothelialer Marker: eNOS, VEGF	63
3.2.2	Untersuchung kardialer Transkriptionsfaktoren: Mef2c, Nkx2.5 und GATA4	64
3.2.3	Untersuchung zur Apoptose: Bcl-2	64
3.3	Differenzierung von Sca-1 positiven Zellen	65

Inhaltsverzeichnis

3.3.1	Beobachtungen zum Einfluss von Kardiomyozyten auf Entwicklung und Differenzierung von Sca-1 positiven Zellen	65
3.3.2	Stimulation der Expression kardialer Markern in Sca-1 positiven Zellen durch 5-Azacytidin	69
3.4	Untersuchung zur Alterung in Herzen mit kardiomyozyten- spezifischem STAT3 knock out	71
3.4.1	Analyse des Gehalts an Stamm- und Progenitorzellen mit FACS	71
3.4.2	Untersuchung der Alterung in kardialem Gewebe adulter Tieren	72
3.4.3	CD31 ⁺ CD38 ⁺ Sca1 ⁺ Zellen exprimieren endotheliale und kardiale Marker	74
3.5	Parakrine Faktoren in Überständen	78
3.5.1	Überstände von adulten Kardiomyozyten im DPD	78
3.6	Proliferationsassay kardialer Zellen	80
3.6.1	Stimulation mit serumfreien Überständen neonataler Rattenkardiomyozyten	80
3.6.2	Stimulation mit konditioniertem Medium adulter Kardiomyozyten	81
3.6.3	Stimulation mit Fraktionen des konditionierten Mediums adulter Kardiomyozyten	82
3.6.4	Stimulation mit IL-15 und BMP-3	83
3.6.5	Sequenzierung der Peptide ausgewählter Fraktionen	85
4	<i>Diskussion</i>	87
4.1	Zellen des Herzens	87
4.2	Untersuchung potentieller Stamm- und Progenitorzellen aus dem Myokard	89
4.2.1	Das Proliferationspotential der Sca-1 ⁺ _{MACS} -Zellen	89
4.2.2	Differenzierung von Sca-1 ⁺ -Zellen in Kokultur mit Kardiomyozyten	90
4.2.3	Charakterisierung der Sca-1 ⁺ -Zellen auf transkriptioneller Ebene	92
4.3	Charakterisierung der potentiellen Stamm- und Progenitorzellen	94
4.4	Auswirkung des kardiomyozytenspezifischen STAT3 knock out auf die Myokardalterung ..	95
4.4.1	Untersuchung Progenitorzellzahl im Myokard	96
4.4.2	Untersuchung der Alterung auf Protein- und Nukleinsäureebene	96
4.4.3	Veränderung der Expression der Sca-1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺ Zellen und Sca-1 ⁺ CD31 ⁻ CD38 ⁻ Zellen unter dem Einfluss von STAT3	97
4.5	parakrine Mechanismen	100
4.5.1	Wirkung von Zytokinen kardialen Ursprungs	100
4.5.2	Untersuchung konditionierten Mediums	101
4.5.3	Proteinsequenzierung einzelner Fraktionen	102
4.5.4	Bedeutung des JAK/STAT Signalwegs für die α MHC-Expression	105
4.5.5	α MHC als parakriner Faktor	105
4.6	Abschließende Betrachtung	106
4.7	Zusammenfassung	108
5	<i>Literatur</i>	111
6	<i>Anhang</i>	118
	Abkürzungen	122
7	<i>Lebenslauf</i>	125

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Abb. 1.1: Herzentwicklung der Maus.....	2
Abb. 1.2: Alterung im Herzen ist ein Prozess an dem viele Faktoren beteiligt sind.....	11
Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung des gp130 induzierten JAK/STAT3 Signalwegs.....	13
Abb. 1.4: Molekulare Grundlage des α MHC-Cre gesteuerte STAT3 <i>knock out</i>	16
Abb. 1.5: Einige Zytokine werden abhängig vom kardiomyozytenspezifischen STAT3 <i>knock out</i> exprimiert.	17
Abb. 2.1: MEF Zellen proliferieren bei einer Konzentration von 5%-20% FCS optimal bei einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/ml im Assay.....	30
Abb. 2.2: P19-Zellen proliferieren bei einer Konzentration von 5% FCS optimal bei einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/ml im Assay.....	31
Abb. 2.3: Kultur einer Sca1 ⁺ _{MACS} - Zellpopulation ohne <i>preplating</i>	38
Abb. 3.1: Sca-1 positive Zellen sind auch nach vier Wochen in Kultur homogen dreifach positiv für CD38, CD31, Sca-1	61
Abb. 3.2: Durchschnittlich 25% der Zellen einer kardiomyozytendepletierten Kultur in 3 Monate alten Tieren sind positiv für Sca-1, CD31 und CD38.....	61
Abb. 3.3: Der Proliferationsnachweis für die Sca1 ⁺ _{MACS} -Zellen im Assay setzt eine Konzentration von $1,7 \times 10^4$ Zellen pro ml voraus	62
Abb. 3.4: Die Expression endothelialer Marker	63
Abb. 3.5: Die Expression früher kardialer Marker	64
Abb. 3.6: Die Expression des Apoptosemarker Bcl-2	64
Abb. 3.7: Färbung einer Sca-1 ⁺ -Zellen in Kokultur für sarcomerisches α -Aktinin	65
Abb. 3.8: Die Kontraktion von Sca-1 ⁺ _{MACS} Zellen konnte vereinzelt nach drei Wochen in Kokultur beobachtet werden.	67
Abb. 3.9: Adulte Kardiomyozyten konnten maximal 72 Stunden kultiviert werden.....	68
Abb. 3.10: Nach Stimulation mit 5-Azacytidin (5-Aza) werden einige kardiale Marker verstärkt exprimiert	70
Abb. 3.11: In 3 Monate alten α MHC-Cre/STAT3 ^{flox/flox} -Tieren konnten mit FACS-Analyse weniger Sca-1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺ Zellen identifiziert werden als bei Tieren, die STAT3 exprimieren	71
Abb. 3.12: Die Expression früher kardialer Marker	73
Abb. 3.13: Der Nachweis verschiedener Zellzyklusmarker mittels Westernblot ergab kein einheitliches Bild:	74
Abb. 3.14: In den untersuchten Zellen konnte eNOS nachgewiesen werden.....	75
Abb. 3.15: Nkx2.5 wird signifikant schwächer in Sca-1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺ aus Herzgewebe mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 <i>knock out</i> als aus Wildtypmyokard exprimiert, während MEF2c gleich stark exprimiert wird.....	77
Abb. 3.16: CyclinD wird in Sca-1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺ -Zellen aus α MHC-Cre/STAT3 ^{flox/flox} -Gewebe signifikant schwächer exprimiert als in Zellen aus Wildtypmyokard.....	78
Abb. 3.17: Einige Fraktionen des konditionierten Mediums der STAT3 <i>knock out</i> Kardiomyozyten zeigten massenspektrometrische Besonderheiten.....	79
Abb. 3.18: Überstände neonataler Kardiomyozyten wirken nicht proliferationsfördernd auf Sca-1 positive Zellen	80

Inhaltsverzeichnis

Abb. 3.19: Überstände adulter Kardiomyozyten mit STAT3 <i>knock out</i> beeinflussen das Proliferationsverhalten kardialer Zellen anders als Überstände von Wildtypzellen.....	81
Abb. 3.20: Die Fraktionen des konditionierten Mediums adulter STAT3 <i>knock out</i> Kardiomyozyten, die für die Sequenzierung eingesetzt wurden, zeigten meist proliferationsverstärkende Wirkung gegenüber dem Wildtyp, bei Fraktion 50 war die Wirkung umgekehrt.....	83
Abb. 3.21: IL-15 Stimulation beeinflusst die Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten, aber nicht von Sca-1 positiven und P19-Zellen	84
Abb. 3.22: BMP-3 beeinflusst die Proliferation von Fibroblasten und P19-Zellen, aber nicht von Sca-1 positiven und Endothelzellen	85
Tabelle 2.1: Zusammensetzung eines Amplifikationsansatzes.....	47
Tabelle 2.2: Untersuchung unterschiedlicher Realtime-PCR-Kits.....	50
Tabelle 2.3: Volumina der Substanzen für ein SDS-Polyacrylamidgel	54
Tabelle 3.1: Etablierung der SPC Isolation	59
Tabelle 3.2: Unterschiede in der Peptidzusammensetzung der Überstände von STAT3 exprimierenden Zellen gegenüber Zellen mit STAT3 <i>knock out</i>	86
Tabelle 4.1: Das Expressionsmuster der Sca1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺ und Sca1 ⁻ CD31 ⁻ CD38 ⁻ unter Berücksichtigung des Genotyps	99

1 Einleitung

1.1 Parakrine Mechanismen

Parakrine Mechanismen sind ein wichtiger, aber bisher nur wenig erforschter Bereich des endokrinen Systems. Durch sie werden Informationen zwischen Zellen ausgetauscht. Dieses kann eine unmittelbare Reaktion z.B. eine allgemeine Stressantwort hervorrufen und so zu einer umfangreichen, mehr oder weniger lokal begrenzten Antwort führen. Dieser Mechanismus kann für den Gesamtorganismus sowohl nützlich und lebenserhaltend als auch schädlich sein.

Parakrine Mechanismen sind nicht einfach zu betrachten, da die Zellkommunikation ein komplexes System ist, in welchem unterschiedliche Faktoren zusammenwirken. Derselbe Faktor kann bei verschiedenen Zelltypen eine unterschiedliche Antwort hervorrufen. So kann man weder vom Reiz auf die Reaktion einer Zelle schließen, noch von der Reizantwort auf das ankommende Signal. Auch Remodeling-Mechanismen nach Schädigung des Gewebes sind eine Folge der Zellkommunikation. Untersuchungen auf diesem Gebiet gestalten sich schwierig und aufwendig. Daher wird meist nur die Wirkung bereits bekannter Signalstoffe auf bekannte Zellen betrachtet. Dazu wird der nachfolgende Signalweg in den Zielzellen induziert oder unterbrochen und der daraus resultierende Phänotyp der Zelle untersucht. Zur Untersuchung der Bedeutung bestimmter Zytokine als parakrine Faktoren wird auch deren Expression oder Vorkommen in der Zelle in Ruhe und unter Stressbedingungen betrachtet.

Das Myokard bildet eine funktionelle Einheit. Die Kardiomyozytenkommunikation erfolgt nicht nur über krinologische, sondern auch über mechanische Reize (Pan et al. 1999). Manche Wissenschaftler setzen solche Reize sogar für die Differenzierung kardialer Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten voraus (Estes et al. 2004). Vascularisierung, Proliferation, Homing und Differenzierung hängen von parakrinen Signalen des Zielgewebes ab (Kinnaird et al. 2004).

1.2 Embryonale Herzentwicklung

Die Herzentwicklung ist ein früh abgeschlossener embryonaler Prozess, da die Pumpleistung dieses Organs für die Versorgung des Embryos unerlässlich ist, allerdings erfolgt die vollständige Differenzierung erst postnatal. Verschiedene zum

Teil noch nicht bekannte Faktoren sind an der Herzentwicklung beteiligt (s. Abb. 1.1). Zunächst entsteht eine Sichel, die sich zu einem linearen kardialen Tubus weiterentwickelt. Dieser faltet sich und bildet Kammern, im anschließenden Reifeprozess wird die vollständige Trennung der Kreisläufe bei Mammaliern vollzogen. (Bruneau 2002)

Die Expression der Faktoren unterliegt einem festen Zeitplan. Störungen dieses Prozesses führen zu schweren Herzfehlern und nicht selten zum Fruchttod.

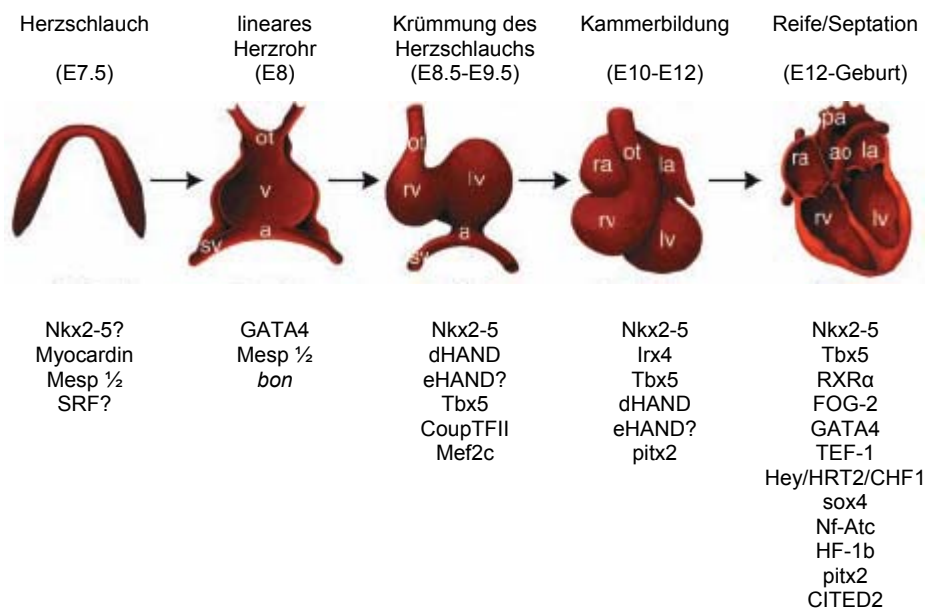


Abb. 1.1: Herzentwicklung der Maus

Fünf wichtige Entwicklungsstadien sind dargestellt: (1) Herzschlauchbildung an Tag (E) 7.5; (2) Bildung des linearen Herzrohrs an E8; (3) Krümmung des Schlauchs und Initiation der Kammermorphogenese an E8.5 bis E9.5; (4) Kammerbildung; und (5) Kammerreife und Septation und Klappenbildung. Abhängig vom Zeitpunkt werden verschiedene Transkriptionsfaktoren exprimiert, welche die Herzentwicklung weiterführen. Durch die Kombination dieser Faktoren wird die Herzentwicklung vorangetrieben. ao = Aorta; a = Atrium; la = linkes Atrium; lv = linker Ventrikel; ra = rechtes Atrium; rv = rechter Ventrikel; ot = Ausflusstrakt; sv = *sinus venosus*; pa = Pulmonalarterie (nach Bruneau, 2002).

1.3 Übersicht über die Herzzellen

Das Organ Herz setzt sich aus Herzmuskel, Klappen und Gefäßen zusammen. Hauptsächlich sind dieses Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Außerdem findet man glatte Gefäßmuskelzellen, verschiedene Zellen der Immunabwehr, vor allem Makrophagen, aber auch Blutzellen in den Gefäßen. Daraus ergibt sich, dass auch unterschiedliche Progenitorzellen im Herzen

vorkommen, welche derzeit im Mittelpunkt der Forschung über die Regeneration des Herzens stehen. Zur Unterscheidung verschiedener Zelltypen wird neben anatomischen und funktionellen Eigenheiten auch die Expression bestimmter Proteine berücksichtigt, die oft auf der Oberfläche präsentiert werden, was für die praktische Ausführung von Bedeutung ist. Allerdings muss man zur Charakterisierung in den meisten Fällen mehr als einen Faktor berücksichtigen, da viele Oberflächenmoleküle von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden können.

Die Pumpleistung des Herzens ist abhängig von der Funktion des Myokards. Kommt es zu einer Schädigung des Myokards, z.B. durch einen Myokardinfarkt im Rahmen eines Gefäßverschlusses, sorgen umfangreiche Remodeling-Mechanismen für den Erhalt der kardialen Funktion. Dieses führt zu reaktiver Hypertrophie der überlebenden Kardiomyozyten. Das infarzierte Gewebe wird von neuen Blutgefäßen durchzogen. Zusätzlich wird durch Fibroblasten der geschädigte Muskel durchwachsen oder ersetzt. Eine Narbe entsteht (Lutgens et al. 1999; Nakatsuji 1997).

Lange Jahre existierte das Dogma des Herzens als postmitotischem Organ, da adulte Kardiomyozyten als ausdifferenzierte Zellen kein Proliferationspotential haben. Allerdings gibt es immer mehr Hinweise für die Existenz von myokardialen Progenitorzellen, bzw. Mechanismen, die zur Myokarderneuerung führen (Anversa et al. 1990; Beltrami et al. 2001; Kajstura et al. 1996).

1.3.1 Kardiomyozyten

Kardiomyozyten, die Muskelzellen des Herzens, bilden ein funktionelles Synzytium. Die regelmäßigen Eigenkontraktionen der Zellen werden darin synchronisiert. Das Aktionspotential entsteht im Sinusknoten, der durch das vegetative Nervensystem innerviert ist.

Das myozytäre Gewebe stellt ca. 80% des Herzens. Während der Herzentwicklung differenzieren Vorläuferzellen zu kardialen Myoblasten und später zu Kardiomyozyten. Während dieser Entwicklung erfolgt eine positive oder negative Regulation verschiedener Gene. Dabei ist besonders die Expression von drei kardialen Transkriptionsfaktoren von Bedeutung, die durch Wechselwirkung und Transkriptionskomplexbildung die Expression essentieller Gene steuern, z.B. MEF2c (*myocyte enhancer factor*), GATA4 und Nkx2.5.

Diese drei Transkriptionsfaktoren werden in unterschiedlichen Veröffentlichungen für die Expression von spezifischen Strukturproteinen verantwortlich gemacht, u.a. für die Expression des kardialen Strukturproteins α MHC (*α myosin heavy chain*) (Sepulveda 1998; Molkentin 2000; Rhazegi 2002). Diese drei Transkriptionsfaktoren beeinflussen sich gegenseitig und wirken gemeinsam bei Expression einiger Gene.

1.3.2 Fibroblasten

Die Familie der Bindegewebszellen umfasst die Fibroblasten und ihre Differenzierungsformen. Bindegewebszellen sind ineinander differenzierbar. So können Fibroblasten unter bestimmten Bedingungen in Osteoblasten, Chondrocyten, Adipocyten oder glatte Muskelzellen umgewandelt werden. Die Bindegewebszellen dienen der Stützfunktion und Regeneration. Allerdings passen sich die Fibroblasten ihrer Umgebung im Gewebe spezifisch an, so dass eine Translocation in ein anderes Gewebe weitgehend unterbleibt.

Im Herzen haben Fibroblasten ebenfalls Stütz- und Reparaturfunktion. Nach Myokardinfarkt kommt es zu einer erhöhten Proliferation der Fibroblasten im ischämischen Bereich. Dies führt zu einem Versteifen des Herzmuskels und zu einer Narbenbildung, was kurzfristig das Gewebe stützt, langfristig aber die Funktion einschränkt (Nakatsuji et al. 1997). Zwischen Kardiomyozyten und Fibroblasten besteht eine parakrine Wechselwirkung, in die vermutlich IL-6 involviert ist (Fredj et al. 2005).

1.3.3 Endothelzellen

Endothelzellen entstammen dem Mesoderm - wie Blut, Bindegewebe und Muskeln. Sie bilden das innerste einschichtige Plattenepithel der Blutgefäße, das Endothel, das umschlossen wird von der Gefäßwand, die aus Bindegewebe und glatter Muskulatur besteht. Die Blutgefäße dienen der Sauerstoffversorgung der Organe, weshalb es unerlässlich ist, dass sich das Gefäßsystem nach Bedarf flexibel umgestalten kann. Die essentielle Grundlage dieser Gefäßumgestaltung ist die kontinuierliche Zellteilung von Endothelzellen. Dieses bietet nicht nur die Möglichkeit, einer Reparatur nach einer Verletzung, sondern auch Gefäßneubildung (Neoangiogenese). Die Neoangiogenese beginnt mit der Entstehung winziger

Kapillaren, die nur aus Endothel bestehen. Durch Zytokinausschüttung - u.a. PDGF-B und eNOS - veranlassen diese Endothelzellen die Bildung der Gefäßwand. Die Angiogenese kann aufgrund von Sprossung, d.h. durch Zellteilung differenzierter Endothelzellen der Gefäße, geschehen. Heutzutage gibt es viele Untersuchungen zur Gefäßbildung durch endotheliale Progenitorzellen, die im Blut zirkulieren und in Gewebe durch Homing einwandern. Besonders bei der raschen Rekapillarisation von ischämischem Myokard nach Infarkt ist dieses von großer Bedeutung.

Typische Marker für Endothelzellen und ihre Vorläufer sind u.a. PECAM, flk1 und Tie-1 bzw. Tie-2 (Lovell 2004), aber auch flt-1 (Jackson et al. 2001). flt-1 und flk-1 sind Rezeptoren für VEGF (*vascular endothelial growth factor*), der vom umgebenden Gewebe gebildet wird, u.a. von Kardiomyozyten, um die Gefäßbildung anzuregen. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird in Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert. Durch die Bildung des Mediators NO können Endothelzellen die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen, was auch von Bedeutung für Vasodilation, Angiogenese und Stressantwort ist (Lodish 2001).

1.3.4 Weitere Zellen mit kardialer Lokalisation

Im Herzen finden sich noch weitere Zellen, z.B. glatte Gefäßmuskelzellen, die für die Vasokontraktion zuständig sind, und so den Blutdruck aufrechterhalten. Außerdem sind Zellen des Immunsystems nachweisbar, insbesondere Makrophagen im Gewebe, aber auch Lymphozyten im Blut. Ebenso passieren im Blut Erythrozyten und verschiedene Progenitorzellen das Herz.

1.3.5 Stammzellen

Vielzeller entstehen aus sich teilenden, wenig differenzierten Zellen, die sich unter dem Einfluss verschiedener Faktoren über Zwischenstufen zu ausdifferenzierten, häufig postmitotischen hochspezialisierten Zellen entwickeln. Durch diese Differenzierung steigert sich die Leistung der Zelle für ihre Aufgabe, aber sie verliert dabei andere Funktionen. Der Verlust der Teilungsfähigkeit der Zelle schränkt die Lebensdauer des Individuums ein, da die Zellen altern und apoptotisch werden. Daher verfügt der Körper über mitotisch aktive Stamm- und Progenitorzellen, die oft in einem Ruhezustand direkt im Organ vorliegen. Bei Bedarf differenzieren diese,

und ersetzen die verlorenen Zellen in ihrer Funktion.

Stammzellen sind per Definition Zellen, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Bildung eines oder mehrerer differenzierter Zelltypen haben. Stammzellen unterscheidet man anatomisch, funktionell, über Oberflächenmarker oder Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren und Proteinen (Lovell 2004). Die Expressionsmuster sind von besonderer Bedeutung, da sie häufig schon auf eine Determination der Zelle hindeuten. Man kann die Stammzellforschung in zwei Gebiete unterteilen, die Erforschung embryonaler Stammzellen und die der adulten somatischen Stammzellen.

Embryonale Stammzellen entstammen der inneren Zellmasse von preimplantierten oder periimplantierten Embryonen im Blastozystenstadium.

Im Verlaufe der Kultivierung kommt es bei ungestörter Entwicklung zur Bildung von *embryoid bodies*, die zumeist spontan in verschiedenste Zelltypen differenzieren, u.a. können sich kontrahierende Kardiomyozyten bilden. Diese Differenzierung kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, zu denen u.a. die Kultivierung auf *feeder layers*, verschiedene Kulturmedien und Stimulanzen, wie 5-Azacytidine, GATA4, aber auch Zyttohormone gehören (Lovell 2004).

Adulte Stammzellen findet man in den vielen Geweben und Organen. Diese Stammzellpopulationen sind notwendig für die Geweberegeneration, für den Ersatz von Zellen, die während der physiologischen Homeostase verloren gehen. In der kardiovaskulären Forschung wurden die größten Fortschritte bisher in der Untersuchung hämatopoetischer Stammzellen, mesenchymaler Stammzellen und endothelialer Progenitorzellen erreicht. Diese Zellen liegen in großer Zahl vor. Sie sind leicht auch aus dem lebenden Organismus zu isolieren und daher auch von klinischem Interesse (Kehat et al. 2003; Kajstura et al. 2004; Lovell 2004).

1.3.5.1 Stammzellfaktoren

Die bekanntesten Stammzellmarker der kardiovaskulären Forschung sind Sca-1 (*stem cell antigen-1*) und c-kit (CD117). Der letztere ist ein Marker, der die hämatopoetische Herkunft von Zellen und ihre Vordifferenzierung im Knochenmark aufzeigt. Er ist beteiligt an der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen (Takizawa et al. 2003).

Sca-1, auch als Ly-6A/E bezeichnet, ist ein 18 kDa großes Protein und wird von

Lymphozyten exprimiert, aber auch von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen und gewebeabhängig bei Endothelzellen. Die Differenzierung von Sca-1 positiven Zellen in vitro wurde mehrfach beschrieben (LeClair K.P. 1986; Matsuura et al. 2004, Luna et al. 2004).

Da bisher noch nicht geklärt ist, welche Zellen kardiomyozytäre Vorläuferzellen sind, die in vivo zu Kardiomyozyten differenzieren, gibt es eine Vielzahl weiterer Oberflächenmarker, die solche Zellen beschreiben, die in vitro zu Kardiomyozyten differenziert sind. Dazu gehören unter anderem CD31 und CD38.

CD31, auch bekannt als PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), ist ein 130 kDa großes integrales Membranprotein, das Zell-Zelladhäsion vermittelt. Es ist ein Mitglied der Immunglobulinsuperfamilie. Dieses Membranprotein wird auf Endothelzellen und Leukozyten exprimiert. Es kann auch auf embryonalen und hämatopoetischen Stammzellen gefunden werden. CD38 ist ein 42 kDa Transmembranglycoprotein, das auf Lymphozyten und Makrophagen vorkommen kann, es wurde ebenfalls auf hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks gefunden. Sowohl murin als auch human wurde CD31 als CD38-Ligand beschrieben. Lineage (Lin) ist ein Marker, der auf eine Herkunft der Zellen aus dem Knochenmark hinweist. Die von Oh et al. (2003) beschriebenen Zellen waren negativ für Lineage.

1.4 Myokardschädigung

1.4.1 Einführung in die Myokardalterung

Alterung ist ein natürlicher Prozess aller mehrzelligen Lebensformen. So ist schon der Verlust der replikativen Aktivität ein Anzeichen für Alterung und damit Alterung eine natürliche Folge des Differenzierungs- und Entwicklungsprozesses.

Bei der Zellalterung unterscheidet man die replikative von der vorgezogenen Alterung. Letztere wird durch äußere Einflüsse hervorgerufen. Zellalterung kann bedingt sein durch DNA-Schadensantwort ausgelöst durch Telomerverkürzung, durch ROS (*reactive oxygen species*) bedingte Telomerverkürzung und in Folge dessen verschiedene induzierte DNA-Schäden, durch mitogene Stimuli mit Telomerverkürzung einhergehend, die wiederum eine DNA-Schadensantwort auslöst (Satyanarayana et al. 2004).

Gewebealterung zeigt sich durch Veränderung verschiedener Faktoren: Zellalterung

und Zelltod nehmen zu, während die Regeneration geringer ist. Die abnehmende Telomeraseaktivität führt zu einer verminderten Telomerintegrität (Torella et al. 2004). Die Alterung des Herzens und der versorgenden Gefäße kann zu Kardiomyopathie, Herzschwäche, erhöhtem Infarktisiko und verminderter Geweberegeneration führen (Torella et al. 2004). In älterem Gewebe befinden sich nur wenige Zellen in der Mitose, mit zunehmendem Alter finden sich neben den zyklusinaktiven Zellen auch vermehrt apoptotische Zellen.

Es gibt Daten, die sowohl für eine verminderte Regeneration als auch für eine Alterung der Myozyten als Ursache für die Herzalterung sprechen (Anversa et al. 2002). In mehreren Arbeiten wurde bereits die Differenzierung unterschiedlicher Zellen zu Kardiomyozyten *in vitro* gezeigt. Eindeutige Beweise für eine Differenzierung *in vivo* gibt es bisher nicht. Dass eine Form der Erneuerung des Gewebes stattfindet, ist nahe liegend, allerdings werden inzwischen auch andere Ursache wie z.B. Zellfusion (Nygren et al. 2004; Oh et al. 2003) dahinter vermutet. Mit Sicherheit ist aber ein Einfluss des betroffenen Gewebes durch autokrine oder parakrine Mechanismen anzunehmen.

1.4.1.1 Herzerkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen, wie die British Heart Foundation im Jahre 2000 veröffentlichte, die häufigste Todesursache in Europa dar. Hierbei ist annähernd die Hälfte auf eine koronare Herzerkrankung zurückzuführen. Weltweit gesehen hatten 2001 immerhin ein Drittel aller Todesfälle als Ursache (WHO = World Health Organization) kardiovaskuläre Erkrankungen.

Pathophysiologisch wird die koronare Herzerkrankung charakterisiert als ein Funktionsverlust der Kardiomyozyten nach ischämischer Schädigung (Lovell 2004).

1.4.1.2 Therapeutische Möglichkeiten

Da der Herzmuskel nur ein sehr geringes regeneratives Potential hat, gibt es heutzutage nur zwei therapeutische Möglichkeiten: Das eine ist die heterotrope Herztransplantation, das andere die zelluläre Transplantation von aus Knochenmark gewonnen potentiellen Stammzellen (Lovell 2004).

Die primäre Therapie nach Infarkt ist eine rasche Reperfusion des Gewebes auf medikamentösem oder operativem Weg. Bei fortgeschrittenem Zelluntergang bleibt

jedoch eine Narbe zurück. Die Folge kann eine bleibende Einschränkung der Herzfunktion sein. Bei schwerer Funktionsstörung oder Verlaufsform der Erkrankung ist die ultima ratio heutzutage eine Herztransplantation, aber aufgrund der geringen Verfügbarkeit von Organen, kann nur eine geringe Anzahl von Patienten mit diesem komplikationsreichen Eingriff versorgt werden, und auch dann ist nur eine maximale Überlebensdauer von 25 Jahren zu erwarten. Als Hilfsmittel wird in Ermangelung eines Spenderherzens auch ein Kunstherz eingesetzt. Der Nachteil dieser Therapie ist neben der hohen Komplikationsrate und damit schlechten Prognose die aufwendige Technik für Arzt und Patienten (z.B. Furcht vor Infektionen).

Zur Therapie beschreitet man heute neue Wege, so ist die Transfusion von aufgereinigten Knochenmarksstammzellen in die Koronargefäße eine Alternativmethode, die auch klinisch angewandt wird und in Studien erste positive Ergebnisse gebracht hat (Wollert et al. 2004). Über die Wirkungsweise der Transplantate gibt es verschiedene Theorien. Die physiologischen Zusammenhänge sind noch nicht vollständig geklärt. Keine dieser Methoden zeigt ein ausgereiftes Bild. Da zu vermuten ist, dass das Herz über eigene regenerative Möglichkeiten verfügt, um seine Funktion über 80 Jahre aufrechtzuerhalten, wird zunehmend nach kardiomyozytären Progenitorzellen gesucht. Im Herzen finden sich - wie bereits erwähnt - verschiedene Progenitorzellen, deren genaue Aufgaben noch nicht hinreichend untersucht sind.

Auch Knochenmarksstammzellen sind pluripotent und wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Dennoch muss man Untersuchungen auf diesem Gebiet als sehr vielversprechend werten. Denn Lin⁻/ckit⁺-Zellen aus dem Knochenmark, die nach coronarer Ligation injiziert wurden, führten zu einer Regeneration des Myokards (Orlic et al. 2001). Seit 2002 Quaini et al. die Einwanderung von Empfängerzellen herztransplantierte Personen in das Spendergewebe und die Differenzierung solcher Zellen zu Kardiomyozyten beschrieben hatte, war eine Grundlage für die Transplantation von potentiellen Progenitorzellen in das Herz geschaffen.

Jedoch stellten Murry et al. (2004) und Balsam et al. (2004), die verschiedene hämatopoetische Stammzellen transplantiert hatten, keine Differenzierung dieser Zellen zu Kardiomyozyten fest.

Schließlich wurden erste klinische Versuche einer Stammzelltherapie mit Stammzellen aus dem Knochenmark gewagt, (Wollert & Drexler 2005), da diese

Stammzellen *in vivo* leicht zu gewinnen sind und die Aufbereitung zum klinischen Einsatz in etablierten Einrichtungen für Knochenmarksstammzellen stattfinden kann. In Pilotstudien zeigte sich bei Knochenmarkszellinjektion in die Koronargefäße eine positive Wirkung auf den klinischen Verlauf nach akutem Myokardinfarkt (Wollert et al. 2004). Die Wirkungsweise dieser Therapie konnte bisher nicht geklärt werden. In Frage kommt sowohl ein positiver Effekt durch in Kardiomyozyten differenzierende Stammzellen, als auch andere parakrine oder systemische Effekte.

Oh et al. (2003) beschreiben eine Sca-1⁺, CD31⁺, CD38⁺, c-kit⁻, Lin⁻ Fraktion, die das Potential hat, *in vitro* zu adulten Kardiomyozyten zu differenzieren. Andere Forscher isolierten dagegen eine c-kit⁺-Fraktion aus dem Myokard, die Eigenschaften von kardialen Vorläuferzellen zeigt (Jackson et al. 2001). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass es sich um eine Sca-1⁺CD31⁻ (Pfister et al. 2005) handelt, die in Kardiomyozyten differenziert. Allerdings beschreiben alle Autoren bisher ausschließlich Zellen, die *in vitro* diese Form der Differenzierung zeigen.

Während Oh et al. (2003) hinter dem positiven Effekt transplanteder potentieller Stammzellen im Myokard zum überwiegenden Teil Fusion vermuten, sehen Dai et al. (2005) die Ursache im parakrinen Effekt ihrer mesenchymalen Stammzellen.

1.4.1.3 Alterungsfaktoren

Gewebealterung zeigt sich wie beschrieben durch zunehmenden Zelltod in Folge von Apoptose und verminderter Regeneration. Charakteristische Apoptosefaktoren, aber auch Mitosemarker können Auskunft über den Zustand des Gewebes geben.

Die myokardialen Differenzierungsmarker MEF2c, Nkx2.5 und GATA4 werden bei Differenzierung von Stammzellen zu adulten Kardiomyozyten exprimiert. Aus der Expression dieser Faktoren kann man Rückschlüsse ziehen, ob Regenerationsprozesse im Gewebe stattfinden. Erfolgt keine kontinuierliche Erneuerung des Gewebes, kommt es über kurz oder lang zu einer eingeschränkten Leistung des Organs (Masino et al. 2004).

Alterung ist ein Prozess, der mit verminderter Mitose und zunehmender Apoptose einhergeht. Von grundlegender Bedeutung ist dabei die Expression der Ink4a/ARF Locus. Die beiden Produkte p19^{ARF} und p16^{Ink4a} stehen jeweils an

Schlüsselpositionen eines Zellzyklus relevanten Signalwegs: p16^{Ink4a} wirkt auf den pRB-Signalweg, während ARF über den p53-Signalweg Einfluss nimmt (s. Abb. 1.2).

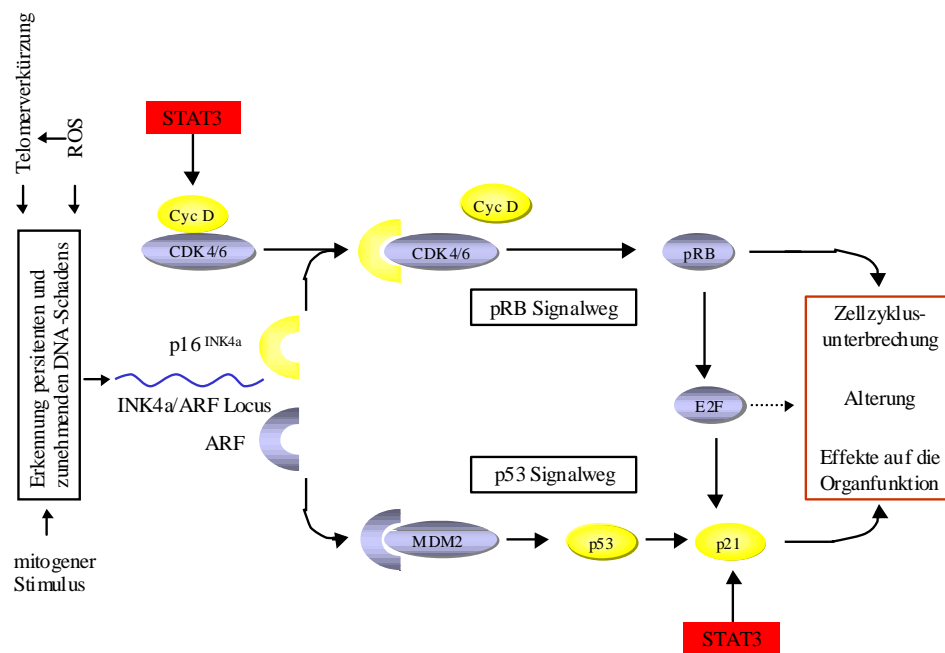


Abb. 1.2: Alterung im Herzen ist ein Prozess an dem viele Faktoren beteiligt sind.

Der p16/ARF-Locus ist zentral am p53- und pRB-Signalweg beteiligt. Als Reaktion auf einen persistenten und zunehmenden DNA-Schaden wird über den p16^{Ink4a}/ARF-Locus die DNA-Schadensantwort über beide Signalwege gesteuert, in deren Folge es zu Zellzyklusunterbrechung, Alterung und Folgen für die Organfunktion kommen kann. Zu den wichtigsten Markern für den Habitus der Zelle (gelb) gehören Cyclin D, p16, p53 und p21. STAT3 wirkt an vielen Stellen auf die Alterungsfaktoren, insbesondere auf CyclinD und p21.

Der p53 Signalweg

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der über Genregulation an Zellzykluskontrolle, Stressantwort, DNA-Schadensreparatur und Apoptose beteiligt ist. p19^{ARF} inhibiert durch Bindung MDM2 (*mouse double minute 2*), wodurch dieses nicht die Degradation von p53 vermitteln kann, woraus eine p53-Stabilisierung folgt. p53 wirkt auf den CDK-Inhibitor p21^{Cip1/Waf1}, der inhibierend auf verschiedene Cyclin-CDK-Komplexe wirkt und notwendig für die Tetraploidiekontrolle am G₁-Zellzykluskontrollpunkt ist. Dieses resultiert in einer Unterbrechung des Zellzyklus in G₁ und G₂/M Stadium. Zu niedrige Konzentrationen oder Überexpression von p21^{Cip1/Waf1} führen zu Zellzyklusunterbrechung und Alterung (Leri et al. 1999; Vigneron et al. 2005).

Der pRB-Signalweg

Die CDK4/6 (*cyclin dependent kinase 4/6*) bildet mit Cyclin D einen aktiven Komplex, der die Phosphorylierung von pRB induziert.

p16^{Ink4a} bindet an CDK4/6, welches eine allosterische Konformationsänderung herbeiführt, was eine Hemmung der ATP-Bindung zur Folge hat. Dieses bewirkt über ein *cis*-Element die Reduktion der Bildung der aktiven Cyclin D- CDK4/6-Komplexes. Die fehlende Phosphorylierung von pRB hat eine Zellzyklusunterbrechung in der G₁-Phase zur Folge. pRB kann über E2F auf transkriptioneller Ebene auf p21^{Cip1/Waf1} wirken (Satayanarayana, 2004). Der CDK-Inhibitor p16^{Ink4a} konnte bei Ratten in 10% der Myozyten nach der Geburt und in über 80% der Myozyten bei alten Tieren nachgewiesen werden (Anversa et al. 2002; D'Amico et al. 2004).

STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) (s. Kap. 1.7) beeinflusst sowohl die Expression von Cyclin D als auch die Expression von p21^{Cip1/WAF1} positiv (Sinibaldi 2000).

p16^{Ink4a} und nicht p19^{ARF} ist hochreguliert während der replikativen Alterung, allerdings sind beide stärker exprimiert bei der vorgezogenen Alterung. Aber es gibt auch Experimente, die aufzeigen, dass nicht immer die Expression beider Faktoren mit der Alterung korrelieren (Satayanarayana 2004).

1.5 Bedeutung von STAT3

Der Transkriptionsfaktor „*Signal transducer and activator of transkription 3*“ (STAT3) ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt und kann gegebenenfalls Antworten auf Proliferations- und Apoptosesignale einleiten. Ein STAT3-Mangel während der Embryonalentwicklung ist letal. Auch für die Ausschüttung von Zytokinen z.B. in der Leber ist STAT3 verantwortlich. Er ist essentiell an Entwicklung, Funktion und Reaktion auf äußere Einflüsse des Herzens beteiligt (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2004). Im Herzen hat er eine protektive Funktion (Kunisada et al. 2000; Negoro et al. 2000; Negoro et al. 2001).

1.5.1 Genstruktur von STAT3

Die Familie der STATs besteht aus 7 strukturverwandten Proteinen (STAT1, -2, -3, -4, -5a, -5b, -6) (Heinrich et al. 2003). Die STATs liegen als Cluster auf den

Mauschromosomen 1, 10 und 11 vor. Auf letzterem sind STAT3, STAT5a und STAT5b codiert. Die STAT-Proteine sind aus 750 bis 800 Aminosäuren aufgebaut und verfügen über einen N-Terminus zur Tetramerbildung und eine DNA-bindende Domäne mit einer sequenzspezifischen palindromen Interferon- γ aktivierenden Sequenz (GAS) und einer Src-Homologie 2 (SH2)-Domäne, die sowohl als Rezeptor für Rekrutierung als auch zur STAT Dimerisierung dient. Außerdem haben alle eine carboxyterminale Transaktivierungsdomäne (Horvath et al. 1995; Leonard & O'Shea 1998; Xu et al. 1996).

1.5.2 Der JAK/STAT3-Signalweg

Der JAK/STAT3 Signalweg ist bei vielen Prozessen des Herzens von Bedeutung. Zu dieser Vielzahl von Prozessen gehören unter anderem Hypertrophie, Apoptose, die Reaktion auf Ischämie-Reperfusion und Konditionierung (Smith et al. 2004).

STAT3 wird aktiviert über den gp130 (Glycoprotein 130)-Rezeptor durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen z.B. als bekanntestem Interleukin-6 (IL-6), LIF (leukemia inhibitory factor) und Cardiotrophin-1 (CT-1) (Heinrich 2003).

Zytokine der IL-6-Gruppe können neben einer Aktivierung des gp 130-JAK/STAT3 Signalweges auch eine Aktivierung der mitogenaktivierten Protein-Kinasen (MAPK) Signalkaskaden auslösen.

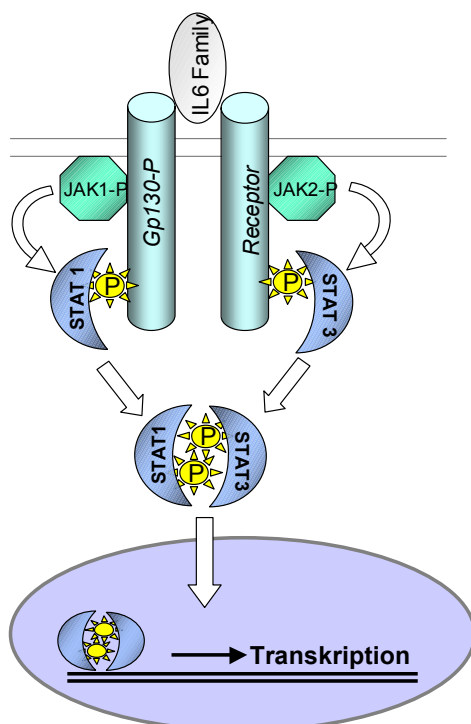


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung des gp130 induzierten JAK/STAT3 Signalwegs

Induziert durch ein Mitglied der IL-6 Familie dimerisieren die Untereinheiten des gp130-Rezeptors, in dessen Folge es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen (JAK) kommt, die wiederum zur Aktivierung durch Phosphorylierung und Dimerisierung der STATs führt. Der aktivierte Transkriptionsfaktor kann in den Nukleus eintreten. Unter den Genen, STAT3 abhängig sind ANF, SOCS und weitere wichtige kardiale Gene. (Podewski et al. 2003)

Binden Zytokine der IL-6 Gruppe an gp130, so führt dies zu einer Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten, in deren Folge JAK (Janus Kinasen), ein Mitglied der Tyrosinkinase Familie, durch Phosphorylierung aktiviert wird. Durch diese Aktivierung kann es zu einer Phosphorylierung von STAT3 kommen, wodurch die JAK-Rekrutierungsregion verändert wird und ihre Funktionalität verliert. Das nun aktivierte 90 kDa große STAT3 wird aktiv in den Kern transportiert (Heinrich et al. 2003).

Obwohl STAT3 für Entwicklung und Funktion vieler Organe wichtig ist, ist seine Wirkung noch nicht vollständig geklärt (Levy & Lee 2002; Smith et al. 2004).

1.6 Der gewebespezifische *knock out* mit MHC-Promotor gesteuerter Cre-Rekombinase

1.6.1 Gewebespezifischer *knock out*

Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der STAT-Familie führt ein systemisch konditionierter *knock out* von STAT3 zu einer frühen embryonalen Letalität, da STAT3 von Bedeutung für die Entwicklung und Funktion verschiedener Zellen ist (Takeda et al. 1997).

Aus diesem Grund wird ein gewebespezifischer *knock out* angewendet: Die Grundlage dieser Technologie ist die Cre-Rekombinase des Phagen P1, dieses Enzym schneidet die DNA spezifisch an loxP-Stellen. Die Cre-Rekombinase wird in ein gewebespezifisch exprimiertes Gen inseriert, dadurch kann Ort und Zeitpunkt der Expression festgelegt werden. Erst dann soll durch die Cre-Rekombinase ein *knock out* des Zielgens in dieser Zelle der flox-Maus erfolgen, einer Maus, die zu beiden Seiten der auszuschaltenden Sequenz eine loxP-Sequenz inseriert trägt (Nagy 2000).

Die Cre-Rekombinase unterliegt bei den hier eingesetzten Tieren der Kontrolle des α MHC-Promotors, da α MHC erst nach der Geburt exprimiert wird. Allerdings konnten Jacoby et al. (2003) eine Expression auf sehr niedrigem Niveau während der Embryogenese nicht ausschließen.

1.6.2 Einführung in *myosin heavy chain*

Myosin ist ein hexameres Protein, das sich aus zwei schweren (MHC) und vier leichten Ketten (MLC) zusammensetzt. α -Myosin heavy chain ist eine von zwei Isoformen der schweren Ketten, es wird durch das MYH6-Gen codiert. Das MYH7-Gen, das für β MHC kodiert, liegt 4,5 kb von MYH6 entfernt, auf dem Chromosom 14. Beide Isoformen verfügen über eine ähnliche Struktur. α MHC verfügt über eine *Myosin-N-terminale SH3-like*-Domäne, eine *intermediate filament protein*-Domäne, einen Myosinschwanz 1 und eine Myosinmotordomäne (type II myosins). Das MYH6-Gen ist ebenso wie β MHC und die leichten Myosinketten beteiligt an der Cytoskelettorganisation des Herzmuskels, es ist an der Muskelkontraktion beteiligt und von besonderer Bedeutung für die Entwicklung viszeraler Muskeln (Krenz et al. 2003).

Veränderungen von α MHC stehen im Verdacht, mit dilatativer und hypertropher Kardiomyopathie assoziiert zu sein, wie mit einer Studie von Carniel et al. (2005) belegt wurde. Es gibt auch Hinweise auf eine besondere Rolle von Mutationen im MYH6 Gens in der Entstehung der hypertrophen Kardiomyopathie in Säugetieren (Geisterfer-Lowrance et al. 1996)

1.6.3 Phänotyp des STAT3 *knock out* Mausstamms

Drei Tage nach der Geburt kann bei *knock out*-Tieren gegenüber dem Wildtyp noch 40% der Expression von STAT3 in den Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Nach drei Monaten ist die STAT3-Expression nicht mehr immunochemisch visualisierbar (Hilfiker-Kleiner et al., 2004). In den ersten Lebensmonaten sind keine phänotypischen Unterschiede zwischen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}- und Wildtyp-Tieren zu beobachten. Nach dem sechsten Lebensmonat treten bei Mäusen mit α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Genotyp Anzeichen einer Herzinsuffizienz auf. Dieses äußert sich in Ascites, Dyspnoe und Kachexie. (Jacoby et al. 2003)

Ab dem sechsten Monat kann im Herzgewebe transgener Tiere eine erhöhte Fibrose und verminderte Kapillarisation beobachtet werden. Eine signifikant eingeschränkte Funktion des Muskels gegenüber dem Wildtyp tritt auf. Die Apoptoserate der Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* ist nach Stress messbar vs. Wildtyp erhöht. Letzteres ist mit der antiapoptotischen Wirkung von STAT3 zu erklären. Bei den

männlichen Tieren führte es nach dem 11. spätestens im 13. Lebensmonat zu einem verfrühten Tod (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2004)

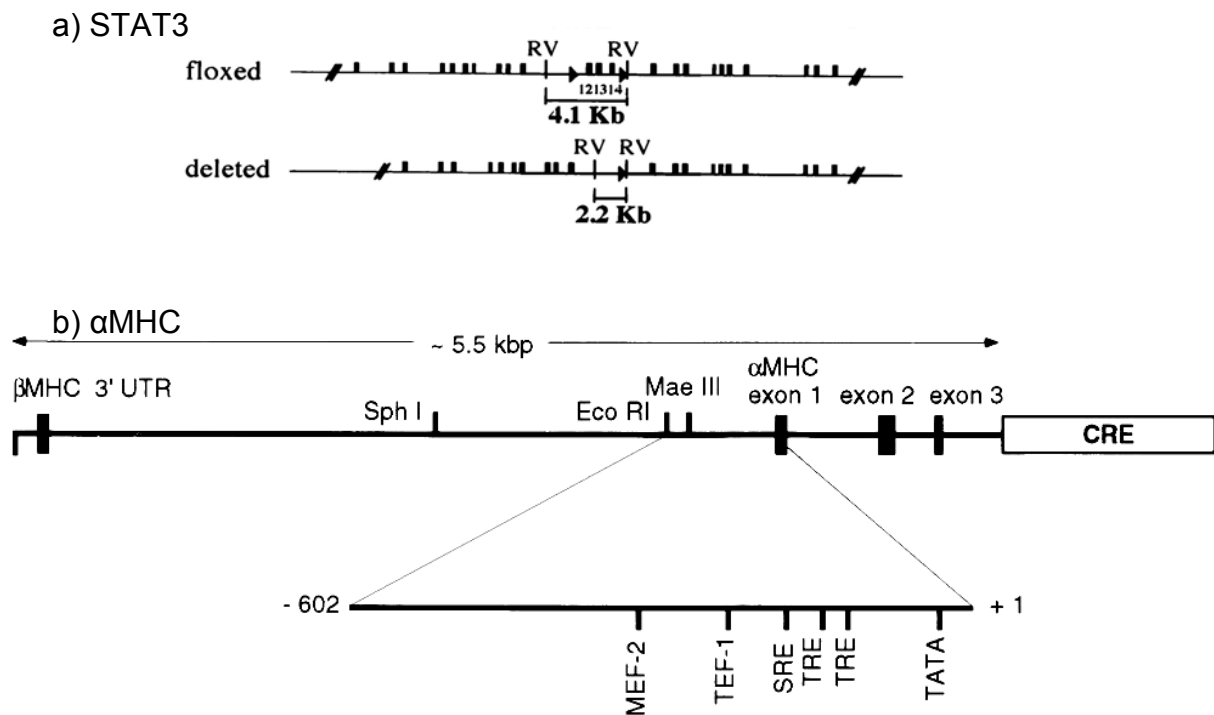


Abb. 1.4: Molekulare Grundlage des α MHC-Cre gesteuerte STAT3 *knock out*

Der α MHC-Cre gesteuerte STAT3 *knock out* ermöglicht, die Funktion von STAT3 organspezifisch und unabhängig von der Embryonalentwicklung zu betrachten. Dabei wird ein STAT3 Segment durch loxP-Sequenzen flankiert (a) und kann durch die Cre-Rekombinase nach Initiation des α MHC Promotors (b) exprimiert werden. (Agah et al. 1997; Alonzi et al. 2001)

Bei heterozygoten Mäusen kann zwar gegenüber dem Wildtyp eine verminderte STAT3-Expression nachgewiesen werden, aber sie unterscheiden sich nicht in Überlebensrate und Zustand von Wildtypherzen (Hilfiker-Kleiner et al., 2004).

In vorangegangenen Untersuchungen wurde die Expression unter Einfluss eines STAT3 *knock out* mittels Microchip Technik untersucht. Dabei wurden Angiogenese, Signaltransduktion, Inflammation, embryonale Kardiomyozytenmarker und Zellzyklus berücksichtigt. Es zeigte sich, dass einige Zytokine und kardiale Marker unterschiedlich stark gegenüber dem Wildtyp exprimiert wurden.

1.7 Kardiale Zytokine und STAT3 abhängige Zytokinexpression in Kardiomyozyten

Zytokine, die autokrin bzw. parakrin wirken, können abhängig von Zelltyp und Zustand der Zelle, unterschiedliche Reaktionen hervorrufen. Dieses ist abhängig von Rezeptoren, Signalwegen und Regulatoren, die in der Zelle vorliegen.

Ein breites Spektrum kardialer Krankheiten ist assoziiert mit Zytokinaktivierung. Unter denjenigen, die das Herz betreffen finden sich: Herzinsuffizienz, Reperfusionsschaden nach kardialer Ischämie, Myokarditis, kardiale Allograftabstoßung und sepsisassoziierte kardiale Dysfunktion. Zytokine können die myokardiale Funktion durch Effekte auf Myozytenkontraktilität und die extrazelluläre Matrix anstoßen (Prabhu 2004).

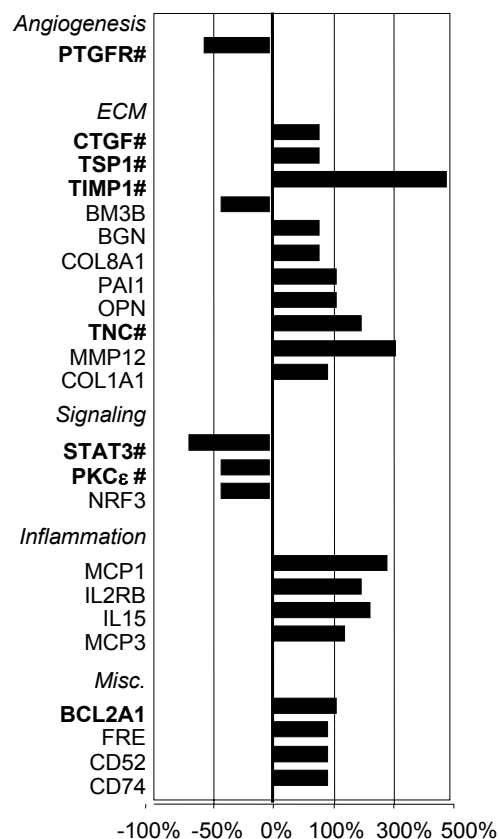


Abb. 1.5: Einige Zytokine werden abhängig vom kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* exprimiert. (Hilfiker-Kleiner et al. 2004)

Bei vorangegangenen Untersuchungen des Expressionsmusters nach kardiomyozytenspezifischem *knock out* von STAT3 hatte sich gezeigt, dass die Expression einiger Zytokine gegenüber dem Wildtyp verändert war. Zu diesen

gehörten Interleukin-15 (IL-15) und BMP-3 (*bone morphogenetic protein 3*) (Hilfiker-Kleiner et al. 2004) (s. Abb. 1.5).

Interleukin 15 ist ein Zytokin, das ebenso wie IL-2 über den IL-2 Rezeptor β/γ (IL-2R β/γ) Signal Transduktionsapparat und verschiedene assoziierte biologische Aktivitäten operiert. Unterschiedliche posttranskriptionelle Mechanismen kontrollieren seine Synthese und/oder Sekretion. Es gibt zwei verschiedene Transkripte, die aus alternativem Splicing hervorgehen für ein 48 und ein 21 Aminosäurenprodukt. Il-15 kann je nachdem über seinen autokrine bzw. parakrinen *loop* verschiedene Signalwege induzieren. Bei der Hämatopoese ist es von großer Bedeutung in seiner Wirkung auf unterschiedliche Progenitorzellen (Giron-Michel et al. 2003)

BMP-3, das auch als Osteogenin bezeichnet wird (Wozney 2002), ist ein Mitglied der TGF- β Superfamilie, wie ungefähr 20 weitere strukturell und funktionell verwandte BMP-Proteine (Délot et al. 2002). Die Struktur ist hochkonserviert, wie bei den meisten Mitgliedern dieser Superfamilie, so dass z.B. humanes und Rattenprotein zu 98% in der Aminosäuresequenz übereinstimmen. BMP-3 ist ein Inhibitor osteogener BMPs. Es inhibiert die alkaline Phosphatase Produktion und Induktion von osteoblastischen Zielgenen, dagegen induziert es die Expression von TGF- β activin responsiven Genen.

1.8 Zielsetzung

Die kontinuierliche Funktion des Herzmuskels ist lebensnotwendig. Fehlfunktionen des Herzens haben schwerwiegende Folgen für den gesamten Organismus, dabei ist über die Möglichkeiten der Muskelregeneration nur sehr wenig bekannt. Noch vor wenigen Jahren bestand das Dogma, dass das Herz als postmitotisches Organ über keinerlei kardiomyozytäre Progenitorzellen verfüge und zugrunde gegangenes Muskelgewebe nicht ersetzt werden könnte. Die Regenerationsmechanismen des Herzens funktionieren nur begrenzt, allerdings verfügt das Herz über Remodeling-Mechanismen, die bei Schädigung des Herzgewebes den totalen Funktionsverlust verhindern sollen.

In der kardiovaskulären Forschung wurden die größten Fortschritte bisher in der Untersuchung von hämatopoetischen Stammzellen, mesenchymalen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen erreicht. Weniger ist bisher über die Regenerationsmöglichkeiten des Herzmuskels aus gewebespezifischen Stammzellen bekannt. Verschiedene potentielle Stamm- und Progenitorzellen werden zurzeit in ihrer Funktion diskutiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollen hierzu nähere Untersuchungen erfolgen.

STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) ist ein Mediator des JAK-STAT-Signalwegs. STAT3 hat eine antiapoptotische Wirkung und ist für die Entwicklung verschiedener Organe von essentieller Bedeutung. Mäuse mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* entwickelten eine dilatative Kardiomyopathie mit zunehmender interstitieller Fibrose und verminderter Kapillarisation, mit einer hundertprozentigen Mortalität binnen eines Jahres. Dieses zeigt die Auswirkung eines gewebespezifischen *knock out* auf Zellen anderen Typs. In dieser Arbeit soll vorgezogene Alterung des Herzens als Ursache des frühen Todes untersucht werden.

Die Folgen des kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock outs* betreffen andere kardiale Zellen. Durch den *knock out* kann die Expression protektiver parakriner Signale myokardialen Ursprungs gehemmt sein, bzw. Faktoren ausgeschüttet werden, die eine Fibrose fördernde und Angiogenese hemmende Wirkung haben. In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob es parakrine Signalstoffe kardiomyozytären Ursprungs gibt, die Funktion und Regeneration des Myokards beeinflussen.

2 **Material und Methoden**

2.1 **Material**

2.1.1 **Geräte**

Autoklav, K56	Sterilisatoren GmbH, Olching, Deutschland
CO ₂ -Inkubator MCO-17AIC	Sanyo, Gumma, Japan
FACSCalibur	Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland
Geldokumentation	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikrowelle	Samsung, Japan
Pipetten	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Realtimacycler MX4000	Stratagene
Langendorff Apparatur mit Fixationskanüle	M. Fuchs, Hannover, Deutschland
OctoMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Elektrophorese Power Supply-EPS 3000 XL	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Entwicklungsmaschine, Optimax	Protec, Oberstenfeld, Deutschland
Gefrierschrank -85°C	Sanyo, Gumma, Japan
Mikroskop:	
• Fluoreszenzmikroskop DM4000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
• Mikroskop TMS	Nikon, Badhoevedorp, Niederlande
pH-Elektrode	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Photometer: Rainbow	SLT-Laborinstrumnts GmbH, Österreich
Power Pac 3000, EPS 600	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Schüttler:	
• Mikrotiterplattenschüttler MTS-2	IKA, Staufen, Deutschland
• Schüttler Doumax 1030	Heidolph, Wiesbaden, Deutschland
• Überkopfschüttler	<i>nicht bekannt</i>
Spectralphotometer Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech (Biochrom) Ltd. Cambridge, England
Sterilbank MLS 1223	Jouan GmbH, Unterhachingen, Deutschland
Thermocycler, T-personal Cycler	Biometra, Göttingen, Deutschland

Material und Methoden

Thermomixer compact 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tisch-Mixer:	
• Reax I	Heidolph, Schwabach, Deutschland
• Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH + CoKG, Schwabach, Deutschland
Waagen:	
• Analysewaage, O 3000-x	Omnilab, Gehrden, Deutschland
• Feinanalysewaage, AK160	Mettler, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn, Deutschland
Wasserbäder:	
• Temperierbad IKA TER 2	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
• GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
• Julabo F10	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifugen:	
• Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode, Deutschland
• Tischzentrifuge Zentrifuge 54BC	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
• Tischzentrifuge Labfuge 300	Heraeus, Osterode, Deutschland
• Avanti J-25 Zentrifuge	Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

BD-Flacon™ Culture Slides	BD Biosciences, Bedford, USA
Cryo-Röhrchen 1,5 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filterpapier Whatman	Biometra, Göttingen, Deutschland)
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Primaria Zellkulturmaterial	BD-Falcon Biosciences, Bedford, USA
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzenfilter, 0,2 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Steritopfilter, 0,2 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Zellkulturmaterial	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellsieb 70 µm	BD-Falcon Biosciences, Bedford, USA
Zellsiebe 180 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA)

2.1.3 Chemikalien und Medien

Aceton z.A. ACS, ISO	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Acrylamid 30% / Bis Solution	Bio-RAD, München, Deutschland
Agarose, electrophorese grade	Cambrex Bioscience, Rockland, USA
Ammonium persulfate, electrophorese grade	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovine serum albumin (BSA), embryotested	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bradford Reagenz	Bio-RAD, München, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid, cellculture tested	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Collagenase II	Worthington, Lakewood, USA
DAPI (Hoechst)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DL-Carnithin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D/L-Carnithin hydrochloride	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Deoxycholinsäure Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Desoxynukleotide (dNTPset)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Diethyloxidiformaldehyd (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid reinst. (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DNase I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ECGS/H-2	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethanol (absolut)	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Lösung	Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland
Fibronectin	Harbor Bio-Products, Norwood, USA
Gelatine, f. cell culture	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
D-Glukose, cellculture tested	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glycerol, p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hank's Buffer	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Hepes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hydrogen Peroxid (H₂O₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
IGEPAL Ca-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ITS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kreatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Magermilchpulver, blocking grade non-fat	Bio-RAD, München, Deutschland
MgSO₄	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Natriumfluorid z.A.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxidplättchen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadate	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaH₂PO₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pankreatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Percoll	Pharmacia, Uppsala, Schweden
PeqGold Trifast™	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ponceau S, pract. grade	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Proteinaseinhibitortabletten (Complete Mini EDTA free)	Roche, Mannheim, Deutschland
Roticlear	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend 37% zur Analyse ISO	J.T.Baker, Deventer, Niederlande
SDS (Na-dodecylsulfat, Laurylsulfat)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sterillium	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
TAMRA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Taurin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
TEMED (N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris[hydroxymethyl]aminomethan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton x-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trizol	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Trypan Blue Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer-Life Science, Boston, USA
Xylenecyanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kits:	
CellTiter 96® AQueous One Solution	Promega Corp., USA
PeqLab DNA Isolationskit	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Fail Safe™	Epicentre, Frankreich
Qiagen PCR-kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR-kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
cDNA Umschreibe mix	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Medien:	
DMEM 4,5 g/L Glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM 1g/L Glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM 4,5 g/L Glucose, w/o Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM 1g/L Glucose, w/o Phenolrot	Biochrom, Berlin, Deutschland
Medium 199	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Medium 199, w/o Phenolrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM/Ham's F12	Cambrex Bioscience, Rockland, USA
FCS: fetal calves serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Horseserum	Biochrom, Berlin, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Firma	Wirt	eingesetzt in:
anti-α Actinin (sarcomeric) (EA-53) , IgG ₁ monoclonal; unconjugated # A 7811	Sigma-Aldrich, Inc., Missouri, USA	Maus	IH
anti-CD31 (PECAM-1) (MEC 13.3) , IgG _{2a,κ} monoclonal; unconjugated # 557355	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	MACS
anti-CD31 (PECAM-1) (MEC 13.3) , IgG _{2a,κ} monoclonal; Allophycocyanin (APC)-conjugated # 551262	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	FACS
anti-CD38 (90) , IgG _{2a,κ} monoclonal; Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated # 558813	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	FACS
anti-CD102 (ICAM-2) (3C4) , IgG _{2a,κ} monoclonal; unconjugated # 553326	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	MACS
anti-GATA-4 (H-112) , IgG monoclonal; unconjugated # sc-9053	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	Kaninchen	WB
anti-MEF2 (C-21) , IgG polyclonal; unconjugated # sc-313	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	Kaninchen	WB
anti-Nkx-2.5 (H-114) , IgG _{2a} monoclonal; unconjugated # sc-1661	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	Kaninchen	WB
anti-p16 (F-12) , IgG _{2a} monoclonal; unconjugated # sc-1661	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA	Kaninchen	WB
anti-p21^{WAF1}/Cip1 (HJ21) , monoclonal; unconjugated # AHZ0422	BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA	Maus	WB
anti-p53 (FL-393) , IgG monoclonal; unconjugated # sc-6243	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA	Kaninchen	WB

Material und Methoden

anti-Ly-6A/E (Sca-1) (D7) , IgG _{2a,κ} monoclonal; unconjugated # 557403	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	MACS, IH
anti-Ly-6A/E (Sca-1) (D7) , IgG _{2a,κ} monoclonal; R- Phycoerythrin (R-PE)- conjugated # 553108	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	FACS
Sca-1-Microbeads , # 130-091176	BD Bioscience-PharMingen, Lexington, USA	Ratte	FACS
Rabbit anti-rat IgG (H+L): Biotin , IgG polyclonal; Biotin-conjugated # ZAB4001	Linaris Biologische Produkte GmbH, Wolfheim-Rettlingen/ Tauberbischofsheim, Deutschland	Kaninchen	ICH
ECL anti-mouse IgG , ECL anti-rabbit IgG Peroxidase-gekoppelt ,	Amersham Bioscience, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK	sheep	WB
Goat anti-rat IgG MicroBeads , # 130-048-501	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	Ziege	MACS

IH = Immunhistologie; WB = Westernblot

2.1.5 Verwendete Oligonukleotidprimer und Amplifikationsbedingungen

Die Bedingungen für die Amplifikation waren wie folgt:

94°C 30 sek, T_H 30 sek, 72°C 30 sek 35x: flt-1

94°C 30 sek, T_H 30 sek, 72°C 40 sek 32x: Bcl-2, VEGF

94°C 30 sek, T_H 30 sek, 72°C 60 sek 30x: eNOS, GATA4, Nkx2-5, MEF2c,

94°C 30 sek, T_H 30 sek, 72°C 60 sek 35x: BNip3

94°C 60 sek, T_H 60 sek, 72°C 60 sek 30x: αMHC-CRE, s α actin, STAT3,

94°C 30 sek, T_H 60 sek, 72°C 60 sek Q-PCR: Cyclin D2, s α actin

Die Amplifikation für Cyclin D2 und sα actin wurde nur in der Realtime-PCR durchgeführt.

mRNA	Primer Sequenz 5' → 3'	T _H	Prod.
αMHC-CRE ³	MHC : ATGACAGACAGATCCCTCCTATCTT	58°C	400 bp
	CRE . CTCATCACTCGTTGCATCGAC		
Bcl-2	s : CCAACTCCCGATTTCATTG	55°C	985 bp
	As: AGTCACGACGGTAGCGAC		
BNip3	s : CTTGCTACCTCTCGGTGACC	60°C	1191 bp
	As: GAGGCTGGAACGCTGCTC		
Cyclin D2 ^{4c}	s : CTTCCAAGCTGAAAGAGACC	53°C	111 bp
	As: TACCCAACACTACCAGTTCC		
eNOS ²	s : AGAGTCCAGCGAACAGCAAG	57°C ²	968 bp
	As: TGTCAGGAACCAGGTATTTCTG		
flt-1	s : CCTTCGCATACTGCTCAC	53°C	352 bp
	As: AGCTCCTCTCAGACTGCC		
GAPDH ^{4c}	s : AACGACCCCTTCATTGAC	53°C - 65°C	191 bp
	As: TCCACGACATACTCAGCAC		
GATA4 ^{4b}	s : CTT GAG GCA TGG CAC ATC TCT GCA	59°C	126 bp
	As: TAATGGTGGGAGATGGGAA		
MEF2c	s : CCGATGCAGACGATTTCAGTAG	60°C	260 bp
	As: GTGCACACCAGGAGACATAC		
Nkx2.5 ^{4b}	s : GGCGTCGGGGACTTGAACACC	58°C	131 bp
	As. CGCACTCACTTTAATGGGAAG		
s α actin ^{4a}	s : ATCTCACGTTTCAGCTGTGGTCA	60°C	182 bp
	As: ACCACCGGCATCGTGTGGAT		
STAT3 ^{2,3}	s : CCTGTCTCTGACGCCATC	58°C	257 bp (388 bp) ¹
	As: CACCAACACATGCTATTTGTAGG		
VEGF ^{4c}	s : TTACTGCTGTACCTCCACC	55°C	189 bp (302 bp)
	As: ACAGGACGGCTTGAAGATG		

1 Die Länge der gefloxt Sequenz in Klammern

2 mit DMSO-Zusatz

3 bereits etablierter Primer

4 Primersequenz aus folgenden Veröffentlichungen entnommen: Borlak et al. 2002 (a); Riaz et al. 2005 (b); Simpson et al. (c)

Primer (s = sense; as = antisense), Hybridisierungstemperatur (T_H) und die Größe des PCR-Produktes (Prod.) Die PCR-Bedingungen waren für die Primer individuell optimiert worden.

2.2 Die Tierhaltung

2.2.1 Die verwendeten Tiere

Die Hausmaus, *Mus musculus* Linnaeus, wurde in der vorliegenden Arbeit als Modellorganismus eingesetzt. Die verwendeten Mäuse mit Kardiomyozyten spezifischem *knock out* für STAT3 (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) entstammten den Inzuchtlinien CS der Arbeitsgruppe Hilfiker-Kleiner, und die Tiere der Inzuchtlinien C57BL/6 und 129 SV wurden aus den Zuchten des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule bezogen.

Zusätzlich wurden die Hausratte, *Rattus rattus* Linnaeus, für die Isolation neonataler Kardiomyozyten eingesetzt. Die neonatalen Sprague Dawley-Ratten entstammten den Zuchten der Abteilung Kardiologie im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover.

2.2.2 Tierhaltung und Genotypisierung

Die Mäuse wurden in Räumen des Zentralen Tierlabors der Medizinischen Hochschule gehalten, die für S1-Tierversuche zugelassen waren, unter standardisierten Bedingungen, mit 12 Stunden hell-dunkel Rhythmus, Standardfutter und Wasser ad libitum.

Im Alter von 3-4 Wochen wurden die Jungtiere, in Gruppen bis zu 5 Tieren, von der Mutter abgesondert. Für die Genotypisierung mittels PCR der Tiere wurde ein Stück der verknöcherten Schwanzspitze abgetrennt und die Tiere mit Ohrlöchern markiert. Für Genotypisierung und Markierung war Frau Brandt verantwortlich.

Die Genotypisierung der verwendeten Tiere wurde im Allgemeinen von Silvia Gutzke und Anja Quint durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze gewonnen und zwei PCRs pro Probe gefahren: Dabei sollte in der ersten PCR festgestellt werden, ob nur gefloxe STAT3 Allele in der Zellen vorliegen und in der zweiten PCR, welche Tiere gleichzeitig eine Cre-Rekombinasesequenz in ihrem Genom tragen.

2.3 Darstellung der verwendeten Zellen und Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Medien und Kultivierungsbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 5% CO₂-Partialdruck und 95% gesättigter Wasserdampf-atmosphäre im 37°C warmen Brutschrank.

Es wurden drei Standardmedien verwendet: 3,7 g/L NaHCO₃ und 1,028g /L Glutamin-haltiges Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) *high glucose* mit 4,5 g/L Glucose, DMEM *low glucose* mit 1 g/L Glucose und Medium 199.

Abhängig von Zelltyp und Fragestellung wurde das Medium mit fetalem Kälberserum (FCS) versetzt, das vor der Verwendung 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert wurde. Um einen Einfluss der im FCS befindlichen Stimulanzen zu vermeiden, wurden die Zellen vor Stimulation 24 Stunden „serumfrei“ gesetzt, dazu wurde das entsprechende Kulturmedium ohne bzw. mit einem niedrigeren Gehalt an fetalem Kälberserum verwendet.

2.3.2 Präparation und Kultivierung von Fibroblasten

Es wurden verschiedene Kultivierungsmöglichkeiten für Fibroblasten gewählt:

Protokoll 1:

Neonatale Ratten und Mausfibroblasten, die sich bei der Isolation neonataler Kardiomyozyten in der mittleren Percollschicht sammelten wurden direkt in 10% FCS-haltigem *high glucose* Medium aufgenommen und auf unbeschichteter Oberfläche ausgebracht. Nach vier bis fünf Tagen wurden die Zellen unter Zuhilfenahme von Trypsin/EDTA geteilt.

Protokoll 2:

Das verwendete Herzgewebe wurde angedaut mit einer Collagenaselösung (134,48 U/mL Collagenase II in ADS-Puffer (s. 2.2.4.1)) für 40 min bei 37°C. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 10% FCS versetzt und bei 101 xg für 4 min pelletiert. Nach einem Waschschrift in PBS wurden die Zellen in DMEM mit 10% FCS auf unbeschichteten Oberflächen kultiviert.

Protokoll 3:

Die Mauslungengewebe wurden in kleine Stücke geschnitten und auf unbeschichteten Zellkulturschalen ausgelegt. Die Zellen wurden anschließend sieben Tage kultiviert, wobei alle drei Tage vorsichtig frisches Medium zugegeben wurde. Nach 7 Tagen hatten die Zellen eine Dichte von annähernd 80% erreicht und wurden mittels Trypsin abgelöst und anschließend unter Zurücklassen der Gewebestücke auf neuen Zellkulturschalen kultiviert.

Murine embryonale Fibroblasten

Die murinen embryonalen Fibroblasten werden von einigen Arbeitsgruppen aus embryonalem Gewebe frisch isoliert, häufig in einer nicht vollständig aufgereinigten Form. Die von uns verwendete Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Gossler, Molekularbiologie, Hannover, zur Verfügung gestellt, hierbei handelt es sich um eine hochreine immortalisierte Zelllinie.

Medien und Kultivierungsbedingungen

Als Kulturmedium für Fibroblasten wurde ein DMEM high glucose verwendet, dem 10% fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt wurden.

Eine 90% konfluente Zellkultur wurden in der Regel 1:4 gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 37°C warmen Trypsin/EDTA von der Gefäßoberfläche gelöst. Mit FCS haltigem Kulturmedium wurde die Reaktion beendet. Die Zellen wurden bei 300 xg für 4 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde dann in Medium aufgenommen und mit 1×10^6 Zellen pro 75 cm^2 ausgesät.

Murine embryonale Fibroblasten sollten für den Proliferationsassay eingesetzt werden, daher wurden die optimalen Bedingungen ermittelt. Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen ausgesät, es zeigte sich aber, dass bei einer Aussaatdichte unter als 5×10^4 Zellen/ml keine Proliferation messbar war.

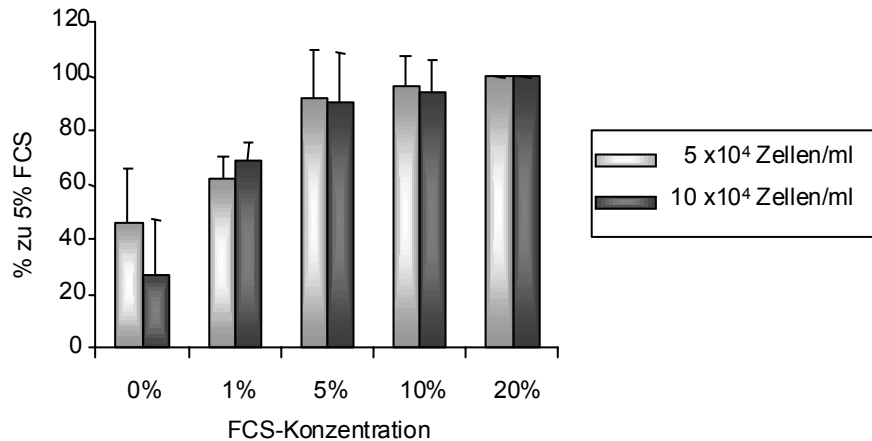


Abb. 2.1: MEF Zellen proliferieren mit 5%-20% FCS bei einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/ml im Assay optimal

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von MEF Zellen in den Proliferationsassay eingesetzt, dabei wurde mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen im Kulturmedium experimentiert. Für die Auswertung im Assay wurden die Zellen 24 Stunden mit FCS stimuliert und anschließend im Proliferationsassay die Proliferationsrate anhand des Reagenzumsatzes ermittelt.

Die maximale Kultivierungsdauer der verwendeten Zellen war drei Monate, danach wurde ein frisches Aliquot aus dem Zellstock in Kultur genommen.

2.3.3 P19-Zellen

P19-Zellen entstammen Teratokarzinomen der Maus, die künstlich im C3H/He Stamm generiert wurden. Diese multipotenten Zellen können in Zellen aller drei Keimschichten differenzieren. Die Zelllinie P19CL6 wurde unter Bedingungen der mesodermalen Differenzierung kloniert. (McBurney et al. 1982; Habara Ohkubo et al. 1996; Stevens 1969)

Die von uns verwendete Zelllinie P19CL6 wurde freundlicher Weise von Prof. Kühl, Ulm zur Verfügung gestellt.

Medien und Kultivierungsbedingungen

Als Kulturmedium für P19-Zellen wurde ein DME-Medium low gluc. verwendet, dem 10% fetales Kälberserum und 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin zugesetzt wurden.

70% konfluente Zellkulturen wurden mit Medium von der Oberfläche gespült und

durch Resuspension eine Einzellzellsuspension erzeugt. Dann wurden sie mit 1×10^6 Zellen in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgebracht. Die maximale Kultivierungsdauer der verwendeten Zellen betrug zwei bis drei Monate, danach wurde ein frisches Aliquot aus dem Zellstock herangezogen.

Um das Proliferationsverhalten der Zellen beobachten zu können wurde DMEM mit 4,5 g/L Glucose verwendet, da die Zellen unter diesen Bedingungen ein verstärktes Proliferationsverhalten und eine verbesserte Stimulierbarkeit zeigten. Dazu wurden die Zellen bereits 48 Stunden in diesem Medium gehalten, bevor sie für den Versuch ausgesät wurden.

Die Zellen zeigten bei einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/ml ein optimales Proliferationsverhalten.

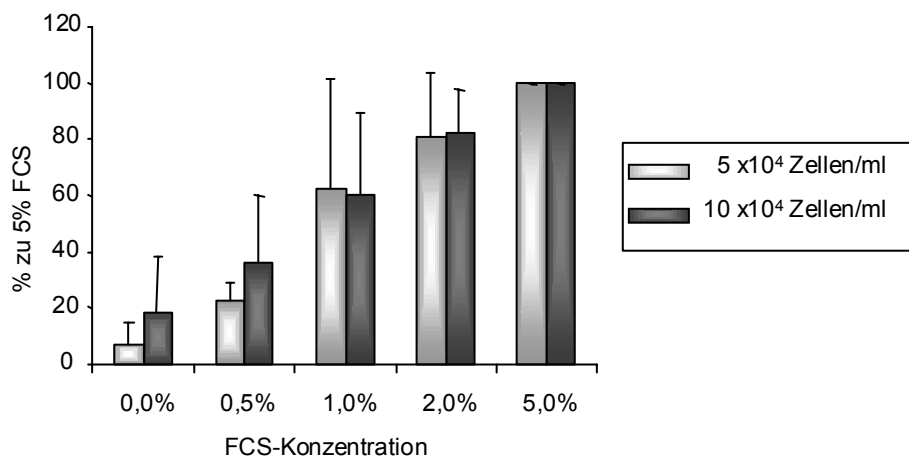


Abb. 2.2: P19-Zellen proliferieren mit 5% FCS bei einer Aussaatdichte von 5×10^4 Zellen/ml im Assay optimal

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von P19 Zellen in den Proliferationsassay eingesetzt, dabei wurde mit unterschiedlichen FCS-Konzentrationen im Kulturmedium experimentiert. Für die Auswertung im Assay wurden die Zellen 24 Stunden mit FCS stimuliert und anschließend im Proliferationsassay die Proliferationsrate, anhand des Reagenzumsatzes, ermittelt.

2.3.4 Kardiomyozyten

2.3.4.1 Isolation neonataler Mauskardiomyozyten

Die Grundlagen zur Isolierung neonataler Mauskardiomyozyten waren in der Abteilung bereits durch die Forschung von der Arbeitsgruppe von PD Dr. K.C. Wollert bekannt. Um die Lebendzellzahl nach Kultivierung zu steigern wurde gegenüber

dem bestehenden Protokoll wurde eine Verminderung der Aktivität der Collagenase. Außerdem wurde die Oberfläche der Zellkulturschalen mit 1% Gelatine und 200 µg/mL Fibronectin beschichtet. Die Zellen konnten so bis zu einer Woche in Kultur gehalten werden.

Zur Isolation neonataler Mauskardiomyozyten wurden nach zervikaler Dislokation Herzen aus bis zu drei Tage alten 129SV-Mäusen entnommen und in ADS-Puffer (116 mM NaCl, 20 mM HEPES, 1 mM NaH₂PO₄, 5,2 mM Glukose, 5,4 mM KCl, 0,83 mM MgSO₄) überführt. Dann wurden die Vorhöfe entfernt und das Gewebe zerkleinert. In einer enzymatischen Lösung (104,61 U/mL Collagenase II und 0,45 g/L Pankreatin in ADS-Puffer) wurden die Herzen zunächst 20 min bei 37°C vorverdaut, dann in frischer enzymatischer Lösung wiederholt 10 min bei 37°C verdaut, wobei die Suspension herausgelöster Zellen mit 10% FCS versetzt wurde. Nachdem das Gewebe vollständig verdaut war, wurde die vereinigte Zellsuspension bei 101 xg für 4 min RT zentrifugiert. Das in ADS Puffer aufgenommene Zellpellet wurde über einen Percollgradienten aufgereinigt. Die homogene Zellschicht wurde nach zwei Waschschritten in PBS in Platingmedium aufgenommen und auf gelatinisierten Fibronectin beschichteten Platten in entsprechender Dichte ausgebracht.

2.3.4.2 Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten

Zur Isolation neonataler Rattenkardiomyozyten wurden nach zervikaler Dislokation Herzen aus bis zu drei Tage alten Wistar-Ratten entnommen und in ADS-Puffer (s.o.) überführt. Dann wurden die Vorhöfe entfernt und das Gewebe zerkleinert. In einer enzymatischen Lösung (134,48 U/mL Collagenase II und Pankreatin) wurden die Herzen zunächst 20 min bei 37°C vorverdaut, dann in frischer enzymatischer Lösung wiederholt 10 min bei 37°C verdaut, wobei die Suspension herausgelöster Zellen mit 10% FCS versetzt wurde. Nachdem das Gewebe vollständig verdaut war, wurde die vereinigte Zellsuspension bei 101 xg für 4 min RT zentrifugiert. Das in ADS-Puffer aufgenommene Zellpellet wurde über einen Percollgradienten aufgereinigt. Die homogene Zellschicht wurde nach zwei Waschschritten in PBS in Platingmedium aufgenommen und auf gelatinisierten Platten in entsprechender Dichte ausgebracht.

2.3.4.3 Isolation adulter muriner Kardiomyozyten

Zur Gewinnung adulter muriner Kardiomyozyten wurden Mäuse eingesetzt, die zwischen 10 und 14 Wochen alt waren. Da die eingesetzte Langendorf-Apparatur über zwei Perfusionsstellen verfügte, konnten gleichzeitig STAT3 *knock out* Kardiomyozyten und Wildtypzellen isoliert werden.

Sämtliche Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur, auch die Lösungen waren, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gehalten, da sich dieses Vorgehen als besonders zellschonend erwiesen hat.

Nach zervikaler Dislokation wurde der Brustkorb freigelegt und über das Sternum eröffnet. Dann wurde das Herz einschließlich Atrium und Aortenbogen entnommen. Die Aorta wurde auf einer speziell geschliffenen Kanüle fixiert und zweimal mit je 1 ml eiskaltem Perfusionsmedium (110 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 25 mM Hepes, 11 mM D-Glucose; pH 7,4) gespült. Anschließend wurde das Herz über die Kanüle an die Perfusionsanlage angeschlossen und mit 40 ml 37°C warmer Enzymlösung (134U/mL Collagenase II, Worthington; 31,25 μM CaCl_2) für 20 min perfundiert. Die Konzentration der eingesetzten Kollagenasemenge hängt von der Mauslinie und dem Alter der untersuchten Tiere ab. Das vorverdaute Herz wurde zerkleinert und für 5 min in 10 ml Enzymlösung bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde es wiederholt mit einer wide-tip-Pipette resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein 200 μm Filter gegeben, um größere Stücke zurückzuhalten. Nachdem das Zellsieb mit weiteren 10 ml Enzymlösung gespült wurde, wurde die aufgefangene Zellsuspension bei 30 xg 2 min Decel 5 zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet vorsichtig in Perfusionsmedium mit 125 μM CaCl_2 resuspendiert und bei 20 xg 1 min Decel 5 zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde mit Kalziumchloridkonzentrationen von 169 μM und 225 μM wiederholt. Durch diese so genannte Kalziumchloridtreppe soll Kontraktion der Herzmuskelzellen gestoppt werden, so dass sie sich bei der Kultivierung adhären können. Plötzliche und zu hohe Gaben von Kalziumchlorid können zum Abrunden der Zellen führen und unter Umständen Apoptose einleiten. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Kulturmedium (M199, 40 μM Natriumbicarbonat, 0,005M Kreatin, 0,005M Taurin, 0,002M DL-Carnithin, pH 7,4) mit 8% FCS, 1x ITS, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin versetzt aufgenommen.

Durch anschließendes einstündiges *preplating* auf unbeschichteter Zellkulturoberfläche soll verhindert werden, dass Fibroblasten die Kultur verunreinigen. Danach wurden die Zellen auf einer Laminin ($1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in PBS) beschichteten Oberfläche ausgebracht, indem die Zellen eines Herzens auf zwei Wells einer 6-Well-Platte verteilt wurden. Nach 16 Stunden wurden die Zellen zur Gewinnung von Überständen verwendet.

2.3.5 Zellsortierung mit *fluorescens activated cell sorter* (FACS)

Der Fluoreszenz aktivierte *Cell sort* bietet die Möglichkeit eine exakte Zahl von Zellen mit einem bestimmten Muster an Oberflächenmolekülen (Oberflächenmarkern) zu ermitteln. Ich habe diese Methode genutzt, um das Verhältnis von mehrfach positiven bzw. negativen Zellen in einer kardiomyozytendepletierten Fraktion zu ermitteln.

Nach Isolation einer kardiomyozytendepletierten Fraktion wurde diese in PBS mit 10% FCS aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Zellfärbung erfolgte mit einem direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper für eine Stunde, dabei war die eingesetzte Konzentration antikörperspezifisch. Die Zellen wurden dann mit dem zehnfachen Volumen an PBS/FCS gewaschen, bei $300 \times g$ 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde nach einem weiteren Waschschrift in 1 ml PBS/FCS aufgenommen und im FACSCalibur ausgewertet.

2.3.6 Zellsortierung mit *magnetic activated cell sorter* (MACS)

Für die weiteren Zellisolationen ist eine Immunmarkierung mittels MACS durchgeführt worden. Dabei wurde der OctoMACS[®] der Firma Miltenyii mit unterschiedlichen Säulen verwendet: LC-Säule, MC-Säule und Vorsäule.

Die Vorsäule ist ein $30\mu\text{m}$ Zellsieb, das größere Partikel zurückhält, die die Säule verstopfen könnten.

Die LC-Säule wurde bei allen Primärisolationen eingesetzt, da sie mit 1×10^8 Zellen ein zehnfach größeres Fassungsvermögen hat als die MC-Säulen und sich außerdem nicht so leicht zusetzt. Die Säule ist mit metallischen Kugeln gefüllt, die sich magnetisch laden, wenn die Säule in einen Magneten eingehängt ist. Die Zellen werden mit Antikörpern markiert die an magnetische Kügelchen (Microbeads[®])

gebunden sind. Für die vorgenommenen Isolationen wurde sowohl die direkte Markierung als auch über eine indirekte Markierung gearbeitet.

Der verwendete Puffer PBE setzt sich aus PBS, BSA und EDTA zusammen. Das PBS sollte physiologisch bestmögliche Bedingungen schaffen. BSA sollte nicht nur während der Immunfärbung unspezifische Bindungen verhindern, sondern auch FCS, das ein Verklumpen der Zellen verursachen kann, ersetzen. Außerdem wurde EDTA verwendet, das als Calciumchelatbildner Zell-Zell-Bindungen verhindert.

2.3.7 Immunmarkierung zur Vorbereitung des MACS

Für die direkte Immunmarkierung wurden Antikörper gekoppelte Microbeads der Firma Miltenyï verwendet. Die Zellsuspension wurde auf 1×10^7 Zellen pro 80 μ l PBE eingestellt, anschließend wurden die Microbeads im Verhältnis 1:5 zugesetzt und vorsichtig resuspendiert. Die Antikörperbindung wurde für 15 min auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde mit dem zwanzigfachen Volumen an PBE gewaschen. Die direkte Immunmarkierung wurde für Sca-1 eingesetzt.

Bei der indirekten Immunmarkierung wurde zuerst das Oberflächenantigen der Zellen markiert, indem man 0,5 μ g Antikörper für 1×10^7 Zellen einsetzten und die Suspension bei 4°C für 10 min inkubieren ließ. Nach einem Waschschrît mit dem 10-20 fachen Volumen an PBE wurde ein Microbead gekoppelter Sekundärantikörper, in diesem Fall gegen Ratten IgG gerichtet, mit den Zellen für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut gewaschen und über eine magnetische Zellsortierung (MACS = *magnetic activated cell sort*) aufgereinigt. Die indirekte Immunmarkierung wurde für ICAM-2 und PECAM-1 eingesetzt.

2.3.8 Isolation von Maus-Lungen-Endothelzellen (MLEC)

Für die Isolation von Maus-Lungen-Endothelzellen werden zunächst Zellen mit Collagenase II aus dem Lungengewebe herausgelöst, anschließend mit einer indirekten PECAM-1 Immunmarkierung an magnetische Kügelchen (Microbeads) gebunden und über eine magnetische Zellsortierung aufgereinigt. Diese PECAM-1 positive Fraktion wird in Kultur vermehrt und nach ungefähr einer Woche mit indirekter ICAM-2-Immunmarkierung aufgereinigt. Diese Zellen stellen eine fast homogene Endothelzellpopulation dar. Die Zeit zwischen den beiden Sortierungen

dient nicht nur der Vermehrung der Zellen, sondern auch um die an PECAM-1 gekoppelten Microbeads abzubauen. Im Gegensatz zum Fluoreszenz-aktivierten *Cell sort* (FACS) kann hier keine doppelt positive Fraktion gleichzeitig sortiert werden.

Maus-Lungen-Endothelzellen wurden aus dem Lungengewebe von 6-8 Wochen alten 129SV Mäusen isoliert.

Nach zervikaler Dislokation wurde die Lunge thorakal entnommen und in kaltes Isolationsmedium (DMEM low gluc. mit 20% FCS) überführt. Dann wurden die Trachea und soweit möglich der Bronchus principalis entfernt. Das Lungengewebe wurde anschließend zerkleinert und in 25 mL 37°C warme Enzymlösung (344 U Collagenase II pro 1 l Hank's Puffer) überführt. Beim Verdau wurde das Gewebe für 45 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einer 24 ml Spritze durch eine 14'G Kanüle zwanzigmal resuspendiert, um die Zellen heraus zu lösen. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von eiskaltem FCS-haltigem Isolationsmedium abgestoppt. Danach wurden die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb gegeben, um größere Zellen und Gewebestücke zurückzuhalten. Nach einer Zentrifugation mit 100 xg für 7 min bei 4°C wurden die sedimentierten Zellen in 10 ml PBE gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet mit 5×10^7 Zellen pro mL in PBE aufgenommen. PECAM-1 Primärantikörper wurde in einer Konzentration von 0,5 µg / 1×10^7 Zellen zugesetzt und dann für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal im zehnfachen Volumen an PBE gewaschen und auf eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen pro 80 µl eingestellt. Dann wurden 20 µl Sekundärantikörper gekoppelte magnetische Microbeads pro 1×10^7 Zellen zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach wiederholten Waschschritten (s.o.) wurden die Zellen nach Herstellerangaben zunächst über eine LC-Säule mit 30 µm Vorsäule und anschließend über zwei MC-Säulen aufgereinigt.

Um einen Zellverlust durch zusätzliche Zentrifugationen zu vermeiden, wurde, nachdem die Methode etabliert war und keine Zellzahlbestimmungen notwendig waren, direkt von einer auf die folgende Säule eluiert. Die erhaltene Fraktion wurde vollständig in Endothelzell-Wachstumsmedium (Isolationsmedium mit 1x konzentriertem ECGS/H) aufgenommen und auf Fibronectin beschichtete Platten ausgebracht. Nachdem die Zellen 70%-90% konfluent waren, wurden sie nach gleichem Protokoll mit einer indirekten Immunmarkierung für ICAM-2 aufgereinigt und erneut auf Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen ausgebracht.

2.3.9 Isolation einer kardiomyozytendepletierten Fraktion aus Herzgewebe

Sca-1 positive Zellen im Myokard besitzen nach Oh et al. (2003), das Potenzial zu Kardiomyozyten zu differenzieren.

Vorraussetzung für die Differenzierung ist laut Oh, eine kardiomyozytendepletierte Kultur zu erhalten, indem man hohe Kollagenasemengen und 70 µm Filter einsetzt. Anschließend lässt man eine Zellsortierung auf Sca-1 positive Zellen folgen.

Protokoll 1

Das erste Protokoll basierte auf der Annahme, dass sich kardiiale Stammzellen ähnlich verhalten müssten wie neonatale Kardiomyozyten und weniger empfindlich gegenüber Stress wären.

Daher wurde ein Protokoll auf Grundlage der bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Präparation neonataler Kardiomyozyten entwickelt. Die Enzymlösung enthielt aber eine Konzentration von 0,1% Collagenase II (317 U/mg). Pro Herz und Verdau wurden 200 µL Enzymlösung eingesetzt. In 10% FCS haltigem Medium 199 wurden die Zellen auf Fibronectin beschichteten Nunclon-Zellkulturschalen ausgebracht.

Protokoll 2

In Anlehnung an das Protokoll nach Oh wurde das Protokoll 1 um eine magnetische Zellsortierung auf direkt immunmarkierte Sca-1 positive Zellen erweitert. Es wurden 10^5 Zellen isoliert, die auf unterschiedlich beschichtete Zellkulturoberflächen ausgebracht wurden.

Durch ein einstündiges Preplating in unbeschichteten Zellkulturflaschen, auf deren Oberflächen sich Fibroblasten absetzen, wurde eine nahezu fibroblastenfreie Zellpopulation erreicht.

Protokoll 3

Nach zervikaler Dislokation wurde der Brustkorb freigelegt und über das Sternum eröffnet. Dann wurde das Herz einschließlich Atrium und Aortenbogen entnommen. Die Aorta wurde auf einer Fixationskanüle mit abgerundeter Spitze fixiert und

zweimal mit je 3 ml eiskalter Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS) das Blut aus dem Herzen und den Coronargefäßen gespült.

Anschließend wurde das Herz in Stücke von 1 mm² zerteilt, um über eine maximale Oberfläche eine gute Zellausbeute beim anschließenden Verdau zu erreichen. Dabei wurden zwei Herzen gleichzeitig in 15 ml 1% Collagenase II-Enzymlösung für 30 min bei 37°C geschüttelt. Vor und nach dem Verdau wurde das Gewebe mehrfach vorsichtig durch eine 25 ml Pipette gezogen, um Zellen mechanisch herauszulösen.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe 10% FCS-haltigen DF-Zellkulturmediums (DMEM low gluc./Ham'sF12, 6 mM NaHCO₃, 15 mM HEPES, 0,1 mg/ml Gentamycin) abgestoppt. Nicht verdaute Gewebestücke und große Zellen wie Kardiomyozyten wurden durch ein 70 µm Zellsieb herausgefiltert. Die verbliebenen Zellen wurden anschließend bei 200 xg 4°C für 7 min zentrifugiert und das Zellpellet danach mit PBE gewaschen.

Die Zellen wurden indirekt mit Sca-1 gekoppelten Microbeads markiert. Über eine LC Säule und anschließend über 5 MC-Säulen wurden sie aufgereinigt. Man erhält so eine Sca-1 positive Zellpopulation (Sca-1⁺_{MACS}) mit einer Reinheit von 90%.

Anschließend wurden die Zellen für in PBS gewaschen, um etwaige EDTA-Rückstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen in DF-Zellkulturmedium aufgenommen und mit einer Dichte von 2 x 10⁵ pro ml in Primaria Zellkulturschalen ausgebracht.

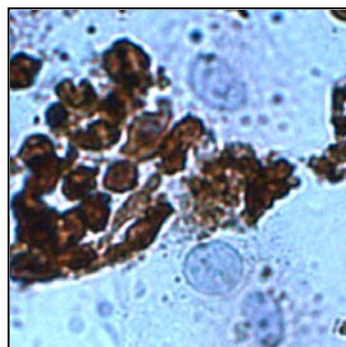


Abb. 2.3: Kultur einer Sca1⁺_{MACS}- Zellpopulation ohne *preplating*

Aus einer isolierte Sca1⁺_{MACS}-Zellpopulation zunächst adhären Fibroblasten an der Oberfläche des Kulturgefäßes, dann setzen sich Sca-1 positive Zellhaufen auf diesen ab, die rötlich-braun dargestellt sind. Sekundärfärbung anti-Sca-1/Biotin und Dapi-Kernfärbung

2.3.10 Zellmarkierung mit Tamra

Diese Färbemethode dient der Markierung von lebenden Zellen. 5-(and-6)-carboxytetramethyl-rhodamine succinimidyl ester (5(6)-TAMRA, SE = Tamra) Mixed Isomers reagieren mit primären und sekundären Aminogruppen von Proteinen, Nukleinsäuren und anderen Biomolekülen. Bei einer Wellenlänge von 543 nm fluoreszieren die Zellen im roten Bereich. (Lutz et al., 1992).

Dieser Farbstoff wird üblicherweise verwendet, um Zellen in Kokulturen bzw. vor Transplantation zu markieren. Er wird auch nach Teilung im Zytoplasma an Tochterzellen weitergegeben, allerdings wird dabei das Signal von Generation zu Generation abgeschwächt, wie wir beobachten konnten.

In 1 ml serumhaltigem Zellkulturmedium wurden 10^7 Zellen aufgenommen. Die Zellen werden 20 min bei 37°C im Wasserbad auf die Aufnahme von 5(6)-TAMRA, SE vorbereitet. Dann wurden 4 µl einer 5 mM Stocklösung TAMRA in PBS pro Milliliter hinzugegeben. Die Aufnahme des Farbstoffs erfolgte für 10 min bei 37°C. Dann wurden die Zellen zweimal mit 37°C warmen PBS gewaschen. Dieser Schritt soll nicht nur überschüssigen Farbstoff entfernen, sondern auch vor einer Transplantation FCS entfernen, da FCS eine *host-versus-graft*-Reaktion hervorrufen kann.

2.3.11 Zellzahlbestimmung mit Neubauerzählkammer und Vitalfärbung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauerzählkammer und einem Phasenkontrastmikroskop mit 10x Objektiv. Die Neubauerzählkammer besteht aus neun Großquadraten mit einer Fläche von je 1 mm². Bei einer Höhe von 0,1 mm ergibt sich daraus ein Volumen von 0,1 µl.

Um die Lebendzellzahl zu bestimmen wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:2 mit Trypanblaulösung versetzt. Der Farbstoff diffundiert durch die Zellmembran in das Zytosol. Lebende Zellen können den Farbstoff aktiv nach außen transportieren und erscheinen dadurch hell, während tote Zellen dunkelblau angefärbt bleiben. Da der Farbstoff für die Zellen toxisch ist, muss die Zellzahlbestimmung unmittelbar nach dem Anfärben erfolgen. Bei hohen Zellzahlen wurden die Zellen in Kulturmedium vorverdünnt.

Es wurden die Zellen von vier Großquadraten ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{n}{4} \times F \times 10^4 = \text{Zellzahl} / \text{ml}$$

mit n = Anzahl lebender Zellen, Zahl der Großquadrate = 4, F = Verdünnungsfaktor, Kammerfaktor = 10^4 . Der Kammerfaktor dient zum Berechnen der Zellzahl pro ml.

Die Bestimmung der Lebendzellzahl in einer Kulturschale wurde anhand von 10 ausgezählten Gesichtsfeldern ermittelt. Dazu wurden Trypanblaulösung 1:2 mit PBS versetzt, auf die mediumfreie Kultur gegeben. Dann wurde das Verhältnis lebender gegen tote Zellen ermittelt.

2.3.12 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen unter zelltypspezifischen Bedingungen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen pro ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und mit je 1 ml pro Kryoröhrchen aliquotiert. Einfriermedium ist FCS, das 10% DMSO enthält, um eine Kristallbildung in den Zellen zu verhindern. Das organische Lösungsmittel DMSO ist zelltoxisch. Die Toxizität steigt mit zunehmender Temperatur an.

Die Kryoröhrchen wurden in einer Einfrierbox bei -80°C bis zum nächsten Tag gelagert. Die mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox bewirkt, dass beim Kühlen von 4°C auf -80°C die Temperatur pro Minute um nicht mehr als 1°C gesenkt wird. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen bei -80°C gelagert.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen schnell auf -37°C erwärmt und sofort in 37°C 10 ml warmen Medium in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Bei empfindlicheren Zellen wie P19-Zellen wurde nach dem Auftauen in einem Waschschrift mit Medium das zelltoxische DMSO entfernt, bevor sie kultiviert wurden.

2.3.13 Inkubation von Progenitorzellen mit 5-Azacytidin

5-Azacytidin ist ein Cytidinderivat, welches in der Zelle zu 5-Aza-2'-deoxycytidintriphosphat reagiert. Dieses nicht methylierbare Derivat wird anschließend statt Deoxycytidin in die DNA eingebaut. Dieses führt zu einer unspezifischen Demethylierung der DNA. Durch Methylierung werden DNA-Abschnitte potentiell reversibel inaktiviert, die nicht exprimiert werden sollen. Durch Demethylierung werden diese Gene reaktiviert. Durch eine Demethylierung, kann bei Progenitorzellen, die sich in einem Ruhezustand befinden, ein Fortschreiten der Differenzierung durch Aktivierung der entsprechenden Gene induziert werden. Da die Demethylierung durch 5-Azacytidin unspezifisch ist, sollte die Inkubation mit 5-Azacytidin über einen streng definierten Zeitabschnitt erfolgen. Innerhalb eines kürzeren Zeitraums würden zu wenige oder bei Verlängerung der Inkubationszeit unspezifisch unerwünschte Gene demethyliert und damit exprimierbar. In der Literatur ist die optimale Inkubationszeit für myokardiale Progenitorzellen - insbesondere Sca-1⁺_{MACS}-Zellen - mit drei Tagen angegeben (Oh et al. 2003).

Nach drei Tagen Kultivierung werden die Zellen für drei Tage mit 5-Azacytidin 3 µM in 2% FCS-Medium versetzt. Die Kontrollen werden parallel ohne 5-Azacytidin Zusatz mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen zwei Wochen in Medium ohne 5-Azacytidin inkubiert und auf Differenzierungsmarker betrachtet.

2.4 Methoden zur Untersuchung parakriner Faktoren

2.4.1 Gewinnung von Überständen adulter Kardiomyozyten

Bei der Gewinnung von Überständen adulter Kardiomyozyten sollte der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Sekretion der Zellen möglichst gering gehalten werden. Außerdem sollten keine Faktoren im Medium sein, die bei einer weiteren Verwendung der Überstände die Effekte der sezernierten Faktoren überdecken bzw. verfälschen können.

Adulte Kardiomyozyten wurden nach 18 Stunden auf Laminin beschichteten Zellkulturschalen mit M199 ohne Zusätze für weitere zwölf Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach diesen zwölf Stunden wurde der Überstand abgenommen und aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.4.2 Proliferationsassay

Mit einem Proliferationsassay der Firma Promega soll die Wirkung der Überstände, der Fraktionen von Überständen und einzelnen Faktoren auf das Proliferationsverhalten muriner embryonaler Fibroblasten untersucht werden.

Der kommerziell erhältliche Assay von Promega beruht auf dem MTT Assay. Die eingesetzte CellTiter 96[®] AQueous One Solution enthält eine Tetrazolium Komponente [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfonophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt = MTS] und als elektronenbindendes Reagenz *phenazine ethosulfate* (PES).

Dies wird dann durch Veränderungen colorimetrisch bestimmt.

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden mit 5×10^4 Zellen /ml mit 100 μ l Kulturmedium pro well einer 96 well Schale ausgesät. Nach 24 Stunden wurde den Zellen Serum für weitere 24 Stunden entzogen, um sie auf die Stimulation vorzubereiten. Am dritten Tag wurde das Stimulans in einem Volumen von 100 μ l pro well zu den Zellen gegeben, die dann weitere 24 Stunden unter Kulturbedingungen inkubiert wurden. Danach wurde nach einem Spülschritt mit Medium ohne Phenolrot das Reagenz CellTiter 96[®] AQueous One Solution im Verhältnis 1:6 in farblosem Medium zugesetzt und für drei Stunden in einer gesättigten Wasserdampf Atmosphäre bei 37°C und 0,5% CO₂-Gehalt inkubiert.

Zur Messung wurden die Überstände in eine Mikrotiterplatte (96well Roundbottom Nunc) überführt. Die Messung der Absorption erfolgte in einem Photometer bei 490 nm, eine Referenzmessung erfolgt bei 630 nm.

Bei der Untersuchung des Proliferationsverhaltens von *P19 Zellen* wurde ebenso verfahren, außer dass die Zellen serumarm mit 1% FCS gesetzt werden konnten.

Da *Maus Lungen Endothelzellen (MLEC)* ein langsames und ungleichmäßigeres Proliferationsverhalten aufweisen wurden sie für diesen Assay in beschichteten 1 cm² Wells mit gleicher Dichte ausgesät.

Der Test bei *Sca-1⁺ Suspensionszellen* wurde folgender Maßen durchgeführt: Die Zellen wurden nach der zweiten Passage mit final 2 % FCS Medium in einer Konzentration von $1,7 \times 10^4$ Zellen/ml ausgebracht und direkt stimuliert. Nach 24 Stunden Stimulation wurde die Messung, wie beschrieben, vorbereitet und durchgeführt.

2.4.3 Der *differential peptide display* (DPD)

Der *differential peptide display* (DPD) (Jost et al. 2005) zur näheren Analyse der Überstände wurden durch die Firma Biovision durchgeführt. Er stellt eine Kombination der *reversed-phase high performance liquid chromatography* (RP-HPLC) und der Massenbestimmung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*).

Mit Hilfe dieser Methoden gewonnene Fraktionen wurden im Proliferationsassay auf ihre parakrine Wirkung untersucht. Die danach ausgewählten Fraktionen wurden weiter fraktioniert, Unterfraktionen näher auf ihre Zusammensetzung untersucht und schließlich massenspektrometrisch die Peptide sequenziert.

2.4.4 Chromatographie und Rechromatographie

Ein Äquivalent von 20 ml Zellkulturüberstand wurde über eine RP-HPLC-Säule in 96 Fraktionen (0,5 min / Fraktion) aufgetrennt unter Verwendung eines Azetonitrilgradienten (4-44% in 44 min) mit einer Flussrate von 0,5 ml / min). Die Fraktionen wurden anschließend lyophilisiert. Ein Äquivalent von 500 µl Zellkulturüberstand einer Fraktion wurde für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt.

2.4.5 Peptide Display

Das lyophilisierte Äquivalent von 500µl Zellkulturüberstand wurde in einem Gemisch von *α*-cyano-4-Hydroxycinnaminsäure (Matrix) und 6-deoxy-1-Galactose (Comatrix) in Acetonitril enthaltendem 0,1% TFA als MALDI-Matrix resuspendiert. Dann wurde es auf dem MALDI-MS (Voyager STR, Applied Biosystems) getestet.

Die Quantifizierung des MS-Signals erfolgte nach Schwellenwertkorrektur. Mit Hilfe einer Spectromania Software wurde jede massenspektrometrische Fraktion an eine virtuelle Linie transformiert. Dabei ist das Molekulargewicht jeder Einzelfraktion für die visuelle Positionierung innerhalb der virtuellen Linie von Bedeutung. Das MALDI-Signal aber gibt die Intensität für jedes Peptid vor. Aus diesen kuvertierten Massenspetra aller 96 Fraktionen wird nun in einen zweidimensionalen Graphen aus Peptidmasse und Elutionszeitpunkt des Peptids aufgetragen.

Die Detektion der differentiell exprimierten Fraktionen erfolgte dann durch Berechnung aus den Unterschieden zwischen den Displays oder Korrelationsanalyse der massenspektrometrischen Daten. Dieses ergibt dann ein *differential peptide display*.

2.5 Nukleinsäuren

2.5.1 Isolierung genomischer DNA für Genotypisierung

Die angewendete Methode basiert auf einem kommerziell erhältlichen Isolationskit der Firma PeqLab.

Dabei wurde im ersten Schritt das Gewebe lysiert und mithilfe von Proteinase K Proteine entfernt, was nicht nur zur Aufreinigung, sondern auch zur Hemmung der Degradation der DNA führen sollte. Dieser Lysevorgang erfolgte für 1h bei 56°C auf einem Wärmeschüttler. Anschließend wurde NaCl 1,5 M zugesetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 8 min RT bei 14.000 xg wurde die mittlere Schicht in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol 1:5 versetzt und vorsichtig invertiert. Durch Zentrifugation für 2 min RT bei 14.000 xg wurde die DNA pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 75% Ethanol gewaschen. Nach einer wiederholten Zentrifugation wurde der ethanolhaltige Überstand entfernt und das Pellet bei 70°C getrocknet, bevor es in H₂O aufgenommen wurden.

2.5.2 Isolierung von RNA aus Zellen

Die RNA Isolierung wurde mit TriFastTM-Reagenz der Firma PeqGold durchgeführt.

Um alle Reaktionen in den Zellen zu beenden und weitere Modifikationen an der RNA zu verhindern, wurden die folgenden Schritte auf Eis durchgeführt.

Nachdem das Medium von den Zellen abgezogen wurde, wurden mit eiskaltem PBS Reste des Mediums, die die Isolation und nachfolgende Versuche behindern können, entfernt. Anschließend wurde mit kaltem TriFASTTM die Kultur von der Oberfläche geschabt und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei nicht adhärenen Zellen wurde die Zellsuspension sedimentiert, mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in kaltem TriFASTTM aufgenommen.

Nach dem Zusetzen 1/5 Volumen Chloroform wurde der Ansatz 15 sek. geschüttelt, nach 2-3 min Inkubationszeit bei RT wurden die Proben 15 min bei 4°C und 14.000 xg zentrifugiert. Die in der oberen, wässrigen Phase gelöste RNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Mit Isopropanol, das 1:3,4 zugesetzt und gründlich gemischt wurde, erfolgte die Fällung der RNA für 10 min bei RT. Danach wurde sie bei mit 14.000 xg bei 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die trockene RNA wurde in DEPC-Wasser aufgelöst. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photometrisch ermittelt und ihre Integrität im Agarosegel überprüft.

Um RNase frei zu arbeiten wurde DEPC-H₂O eingesetzt. Dazu wurden 2 ml Dimethylpyrocarbonat (DEPC) pro Liter Millipore-H₂O über Nacht bei RT gerührt und anschließend autoklaviert.

2.5.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Bei neutralem pH und einer OD zwischen 0,15 und 1 besteht eine lineare Beziehung zwischen Absorption bei 260 nm ($A_{260\text{nm}}$) und Konzentration der Nucleinsäuremenge. Die Proben mit DNA und Gesamt-RNA wurden routinemäßig zur photometrischen Bestimmung 1:70 in ddH₂O verdünnt und die Nukleinsäure-Konzentration berechnet. Dabei ist die RNA-Konzentration bei $A_{260\text{nm}} = 1$ mit 40 µg/ml vorgegeben, für doppelsträngige DNA bei $A_{260\text{nm}} = 1$ mit 50 µg/ml.

Über eine zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm kann eine Aussage zur Reinheit der Nukleinsäure-Lösung gemacht werden. Dazu wird der Quotient E_{260}/E_{280} ermittelt, der bei RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte, bei DNA zwischen 1,8 und 2,0.

2.5.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription (RT-PCR) wird anhand einzelsträngiger RNA unter Katalyse der RNA-abhängigen DNA-Polymerase reverse Transkriptase ein komplementärer DNA-Strang (cDNA) synthetisiert. Dabei wird als Primer ein poly-dT-Primer aus 12-18 Thymidinen eingesetzt. Der Thymidin-Strang bindet an den Poly-A⁺-Schwanz von mRNAs. Von dort ausgehend kann die vollständige cDNA bis zum

5'-Ende synthetisiert werden. Das Temperaturoptimum dieser reversen Transkriptase liegt bei 42°C. Wegen der geringen RNase-Aktivität kann ein Erststrang c-DNA bis zu einer Länge von 7 kb synthetisiert werden.

Dadurch kann das Expressionsmuster einer Zelle nicht nur sicherer konserviert werden, sondern es wird ebenso ermöglicht, auf einfachere Weise mit Hilfe einer semiquantitativen PCR und Realtime Quantitativen PCR auch geringe Konzentrationen der gesuchten Sequenz darzustellen. Um RNase frei zu arbeiten, wurde DEPC-H₂O eingesetzt.

In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden soweit vorhanden 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Im ersten Schritt wurde die RNA in 11 µl DEPC-H₂O und 500 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈ als Primer pipettiert. Die anschließende Denaturierung bei 70°C für 10 min diente der Zerstörung von Sekundärstrukturen der RNA.

Der Ansatz wurde auf 4°C heruntergekühlt und dann je 10 nmol der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und dTTP, kommerziell erhältlicher fünffach konzentrierter First Strand Buffer und 10 µM DTT. Der Ansatz wurde nun für zwei Minuten und nach Zugabe von Superscript-Polymerase nach Herstellerangaben für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Denaturieren des Enzyms bei 70°C für 10 min beendet. Die cDNA wurden 1:5 mit ddH₂O verdünnt und 5 µl pro PCR eingesetzt, die Gesamt-RNA und cDNA wurden bei -80°C gelagert.

2.5.5 Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird DNA *in vitro* amplifiziert. Durch sorgfältige Auswahl geeigneter Oligonukleotide (Primer) können definierte Zielabschnitte vervielfältigt werden.

Die Zyklen der Polymerasekettenreaktion unterteilen sich in je drei Schritte: Durch die Denaturierung bei 94°C werden die DNA-Doppelstränge getrennt: Im darauf folgenden Schritt hybridisieren die Primer an komplementäre Sequenzabschnitte, wobei Sense- und Antisenseprimer ein Teilstück der DNA Sequenz umschließen. Die anschließende Elongationsphase soll der Polymerase optimale Bedingungen für eine vollständige und möglichst fehlerfreie Amplifikation bieten. Um das Vollenden der Amplifikation zu bewirken, wurde mit einer finalen Elongationsphase von 10 min abgeschlossen.

Eine wichtige Voraussetzung der Durchführung im Thermocycler ist der Einsatz von thermostabiler DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), die bei 94°C stabil bleibt und ein Temperaturoptimum von 72°C hat.

Die PCR wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierung der Mausstämme, zur Etablierung der Oligonukleotide, insbesondere für Realtime-PCR geeignete, und zur Untersuchung des Verhältnisses der Menge einiger Faktoren (semiquantitative PCR), für die keine Realtime-PCR etabliert werden konnte, eingesetzt.

Der Amplifikationsansatz hatte ein Volumen von 25 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Substanzen	Finale Konzentration	Eingesetztes Volumen
DNA bzw. cDNA		2 µl
10 x PCR-Puffer	20 %	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 mM	1,5 µl
dNTP (Gemisch aus jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP)	10 nM	0,5 µl
Primerpaar 50 x	1 x	1 µl
Taq-Polymerase ddH ₂ O	1 U	0,1 µl
ddH ₂ O		ad 25 µl

Tabelle 2.1: Zusammensetzung eines Amplifikationsansatzes

Die Tabelle stellt die für die PCR eingesetzten Substanzen mit finaler Konzentration und eingesetztem Volumen dar. Die Primer wurden als 50 x Stammlösungen mit entsprechender Konzentration mit TE (1M Tris, 0,5M EDTA) angesetzt. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Initial wurde der Reaktionsansatz für 5 min auf 94°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu erreichen. Die Amplifikation wurde mit optimalen Bedingungen und der entsprechenden Zyklenzahl durchgeführt (s. Kap. 2.1.5). Am Ende sollte durch eine finale Elongation von 10 min bei 72°C ein Vervollständigen der Fragmente erreicht werden.

Zur Ermittlung des Verhältnisses der Genexpression in der semiquantitativen PCR ist es wichtig, gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge wurde mit Oligonukleotiden für das Haushaltsgen GAPDH jeweils eine PCR durchgeführt.

Die Zyklenzahl einer semiquantitativen PCR muss so gewählt werden, dass sie unterhalb des Sättigungsbereiches der PCR liegt. Wenn keine Bande nachzuweisen war, wurde die Zyklenzahl auf 40 Zyklen erhöht, um das Ergebnis zu bestätigen.

2.5.6 Optimierung der Realtime quantitativen PCR

Die Realtime quantitative PCR, kurz Realtime PCR, ist eine Methode zur Quantifizierung der Expression eines Gens. Anhand einer Extinktionsmessung im UV-Bereich wird während einer fortlaufenden PCR die Konzentration der doppelsträngigen DNA mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffs im Abgleich gegen eine Standardkurve ermittelt.

Die Realtime PCR ist eine Methode, die sich aus der Polymerasekettenreaktion herleitet. Dazu wurde RNA isoliert und in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in eine PCR-Reaktion eingesetzt. Das Besondere an dieser Methode im Vergleich zur semiquantitativen PCR ist der Einsatz des Farbstoffes (SYBRE-Green), der mit doppelsträngiger PCR interkaliert. Das Exzitationsmaximum von SYBRE Green liegt bei 497 nm, das Emissionsmaximum bei 520 nm, nach dem Interkalieren mit doppelsträngiger DNA vervielfacht sich die Signalwirkung. Dadurch wird es ermöglicht während der Reaktion den Gehalt an doppelsträngiger DNA zu ermitteln. Die Quantifizierung der cDNA-Stränge in der Probe erfolgte über den Zeitpunkt, an dem die Werte über das Hintergrundrauschen eine festgelegte Schwelle überschreiten, und die Steigung der Amplifikationskurve bis zum Sättigungspunkt.

Ein Referenzfarbstoff (ROX) und ein parallel untersuchtes *house keeping gene* ermöglichen einen Abgleich zwischen den Proben. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Der Referenzfarbstoff, der ein Exzitationsmaximum bei 584 nm und ein Emissionsmaximum von 612 nm hat, dient der Normalisierung der Proben, um Fluoreszenzstörungen durch unterschiedliche Voraussetzungen in der Gefäßeigenschaft und der Füllhöhe zu kompensieren.

Als *house keeping gene* wurde wie bei der PCR GAPDH eingesetzt. Die eingesetzten GAPDH-Primer ermöglichten mit einer *annealing*-Temperatur innerhalb des Bereichs zwischen 53°C und 65°C ein optimales PCR-Ergebnis, der Abgleich konnte daher parallel im gleichen Lauf mitgeführt werden.

Die Realtime PCR ist gegenüber Artefakten wesentlich empfindlicher als die semiquantitative PCR, da nicht in der Produktlänge unterschieden werden kann, sondern die Gesamtwirkung der doppelsträngigen DNA angezeigt wird. Dieses bedeutet, dass die Auswahl der Primer sorgfältig zu erfolgen hat. Diese werden zunächst in der PCR auf mögliche Nebenprodukte untersucht. An die Realtime-PCR wird ein Dissoziationslauf angeschlossen. Dieser Dissoziationslauf erhitzt nach dem letzten Amplifikationsschritt das Produkt auf 95°C und kühlt mit 0,2°C/sek auf 55°C herunter. Aus der Dissoziationstemperatur eines Produkts kann ermittelt werden, wie rein das Produkt ist. Liegen zwei Dissoziationsmaxima vor oder eine Dissoziationstemperatur von unter 75°C so ist der Primer ungeeignet, da er vermutlich unter diesen Bedingungen unspezifisch bindet.

Die Amplifikation erfolgte nach Empfehlung des Herstellers. Initial wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 95°C erhitzt, um eine vollständige Denaturierung der DNA zu erreichen. Die einminütige Hybridisierungsphase erfolgte zur Bindung der Primer bei individuellen Temperaturen (s. Kap. 2.1.5). Für die anschließende Elongation wurde die Temperatur für 60 sec auf 72°C erhöht. Der nächste Amplifikationszyklus wurde mit einer Denaturierung für 30 sec bei 95°C eingeleitet. Die Realtime-PCR wurde grundsätzlich mit 40 Zyklen durchgeführt. Abschließend wurde ein Elongationsschritt von 3 min angeschlossen.

Für die Etablierung der Oligonukleotide, war es notwendig, die Reinheit des Amplifikats zu überprüfen. Dazu wurde eine Dissoziationskurve nach Herstellerangaben erstellt, wenn nur eine Dissoziationstemperatur vorliegt und diese über 70°C liegt, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um das Zielprodukt, kleinere Produkte wie Dimere der Oligonukleotide würden bei einer niedrigeren Temperatur dissoziieren. Nur wenn ein reines Produkt vorliegt, kann die Q-PCR angewendet werden.

An den letzten Amplifikationszyklus wurde ein weiterer Schritt angeschlossen. Zu Beginn wurde das Amplifikat auf bei 95°C 1 min denaturiert und danach die

Temperatur auf 55°C mit 0,2°C/sec gesenkt. Für die Dissoziationskurve wurde die Temperatur mit 0,5°C/sec erhöht auf 95°C. Dieser Vorgang wurde in 81 Zyklen unterteilt, die jeweils 30 sec dauerten, in denen jeweils die Fluoreszenz bestimmt wurde.

Die Durchführung und Auswertung der PCR erfolgte mit dem Mx4000® *multiplex quantitative* Instrument und der zugehörigen Software der Firma Stratagene.

Für die Durchführung wurden unterschiedliche PCR-Kits eingesetzt, wobei das Protokoll der jeweiligen Firma den Primerbedingungen angepasst wurde.

Es wurden keine Systeme mit Einzelkomponenten ausgetestet, da bei dieser Methode schon geringe Schwankungen in der Zusammensetzung zu starken Abweichungen im Ergebnis führen kann.

	Fail Safe™	Quiagen	Stratagene
	Sortiment fertiger Mastermix, keine Veränderung möglich	Rox bereits im Mastermix enthalten ansonsten sind DMSO und MgCl ₂ variierbar	Rox, DMSO und MgCl ₂ variierbar
Vorteil		Hohe Spezifität	Höhere Optimierung der Primer notwendig
Nachteil	Lohnt sich bei Routine-Untersuchungen nicht für Forschung	Daher geringe Ausbeute	Auch noch geringe Produktmengen zeigen Erfolg

Tabelle 2.2: Untersuchung unterschiedlicher Realtime-PCR-Kits

Es wurden Realtime PCR-Kits der Firmen EPICENTRE-Technologies, Quiagen und Stratagene ausgetestet. Dabei wurde auf Spezifität und Sensitivität Wert gelegt. Der Fail Safe™ Realtime PCR PreMix zeigte sich für die Etablierung von Primern ungeeignet, da hier ein Premix Sortiment unbekannter Zusammensetzung ausgetestet werden sollte. Quiagen ermöglichte zwar eine höhere Spezifität als Stratagene, das kombiniert allerdings mit einer geringeren Sensitivität. Dies erwies sich als ungünstig, da in den zu untersuchenden Proben nur eine geringe Expression der Zielgene zu erwarten war.

2.5.7 Gelelektrophorese: Trennung von DNA-Fragmenten durch Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese von PCR-Produkten im Agarosegel wurde eingesetzt um die Fragmentgrößen zu verifizieren und die Integrität der Amplifikate zu überprüfen. Zur Trennung in der homogenen Agarosematrix wird die Wanderung der geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld genutzt. Um die DNA zu visualisieren wurde von uns Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in der DNA und kann durch Anregung im UV-Bereich bei 312 nm und einem Absorptionsmaximum zwischen 516 nm und 518 nm sichtbar gemacht werden.

Es wurden für die Auftrennung 1,2%ige bzw. 2%ige Agarosegele abhängig von der Amplifikatgröße eingesetzt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (40mM Tris/CH₃COOH, 1mM EDTA, pH 8) durch Erwärmen gelöst, und dann mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Erstarren wurden die entsprechenden Volumina der PCR-Produkte in DNA-Auftragspuffer (15% Bromphenol Blau, 15% Xylene cyanol FF in 30%igem Glycerol) und 5 µl eines kommerziell erhältlichen 100 bp bzw. 1kb DNA-Fragment-Standards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V mit TAE-Puffer in der Elektrophoresekammer durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Die Dokumentation erfolgte mit dem Gel-Doc der Firma Bio-RAD und der dazugehörigen Software.

2.6 Untersuchung von Proteinen mittels Western-Blot Analyse

2.6.1 Gewebeentnahme für Proteinanalyse

Nach zervikaler Dislokation wurde der Thorax peritoneal über das Diaphragma eröffnet. Das entnommene Herz wurde sofort in eiskaltes PBS gegeben, um das restliche Blut durch die Muskelpumpe herauszudrücken. Das Herz wurde nach Entfernen der Vorhöfe in vier Teile zerteilt und separat in Stickstoff gefroren: drei Teile des linken Ventrikels (Apex, Basis und Mittelscheibe) und der rechte Ventrikel. Die Stücke werden bei -80°C gelagert, um Protease und RNasen zu hemmen.

2.6.2 Isolation von Protein

Die Isolation von Proteinen erfolgte auf der Grundlage der Detergenzlyse.

Ein grundlegendes Problem bei der Isolierung von Protein aus Gewebe sind im Zelllysate enthaltene Proteasen und Phosphatasen, die auch *in vitro* zu einer Modifikation der Proteine führen können. Um diese Enzyme zu hemmen, werden alle Schritte auf Eis durchgeführt und spezifische Inhibitoren verwendet.

In der Zelle befinden sich verschiedene Proteinasen, Kinasen und Phosphatasen, deren Aktivität mit Beendigung der Stimulationszeit gehemmt werden sollte, damit das untersuchte Proteinbild der Zelle nicht verschoben wird. Eine wichtige Voraussetzung ist daher bei Beendigung der Stimulation Zellen und später die Proteinlösung auf 4°C zu kühlen. Außerdem ist die Zusammensetzung des Puffers für die Aufreinigung der Proteine entscheidend. Dabei sollte der pH-Wert durch Puffer - wie z.B. Tromethamine (Tris) mit einem stabilen pH in einem Bereich zwischen 7 und 9 - konstant gehalten werden.

Grundsätzlich wurde dem Lysispuffer eine kommerziell erhältliche Proteinaseinhibitor-Tablette zugesetzt, die einige wichtige Inhibitoren beinhaltet. Darüber hinaus wurden weitere essentielle Faktoren verwendet, wie der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF). Durch die Chelatbildner EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) sollen magnesiumabhängige enzymkatalysierte Reaktionen durch Ionenentzug gehemmt werden. Phosphatasehemmer wie z.B. Natriumorthovanadat (Na_3VO_4) und NaF inhibieren die Aktivität einer Vielzahl zelltypischer Phosphatasen. Durch das Detergenz TritonX 100 wird die Zellmembran aufgebrochen. Dabei werden membranassoziierte Proteine besonders durch die Unterstützung von Natriumdeoxycholat herausgelöst. SDS dient zum Lösen und Denaturieren der Proteine bereits während des Lysevorganges.

Für die Gewinnung von Proteinen wurde ein Drittel des linken Ventrikels im gefrorenen Zustand direkt in 100 µl Lysispuffer überführt und mit einem Stößel zerkleinert. Zur Lyse wurde das Gewebe kurz in Stickstoff gefroren und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden mit 14.000 xg bei 4°C für 15 min pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen und der Proteingehalt nach Bradford ermittelt.

2.6.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der Tatsache, dass sich das Absorptionsspektrum von Coomassie Brilliant blue G-250 bei Bindung an ein Protein von 465 nm nach 595 nm verschiebt.

Zur Messung wird die Proteinlösung 1:800 verdünnt und anschließend mit einem fünftel Volumen kommerziell erhältlichem Bradfordreagenz versetzt. Nach 2 Minuten ist der Farbkomplex stabil. Die Messung erfolgt im Photometer bei 595 nm.

Anhand einer Standardkurve auf BSA-Verdünnungen basierend wird anschließend die Proteinkonzentration ermittelt.

2.6.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Elektrophorese auf reduzierenden Sodiumdodecylsulfat (SDS) haltigen Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) werden Proteine aus einem Proteingemisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Polyacrylamid entsteht durch Polymerisierung langer Ketten von Acrylamid- und quervernetzenden Bisacrylamid-Monomeren in Gegenwart freier Radikale, die durch Ammoniumpersulfat (APS) erzeugt und durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) stabilisiert werden.

Es wurde in dieser Arbeit ein diskontinuierliches Puffersystem nach Ornstein und Davis verwendet, das durch Laemmli erweitert wurde. Hierbei wird als Elektrophoresepuffer ein TRIS-Glycine-Puffer pH 8,3 eingesetzt. Das Sammelgel enthält einen 0,5 M TRIS/HCl-Puffer, pH 6,8 und das Trenngel einen 1,5 M TRIS/HCl-Puffer, pH 8,8, beide werden nach Laemmli mit 0,1 % SDS versetzt zur Verbesserung des Wanderverhaltens der Proben.

Das stark anionische Detergenz SDS bindet in Abhängigkeit von der Zahl der Peptidbindungen an die Proteine, so dass die Eigenladung der Proteine für das Laufverhalten keine Bedeutung mehr besitzt und die Proteine entsprechend ihres apparenten Molekulargewichtes getrennt werden.

Die Konzentration des Acrylamids bestimmt die Porenweite und damit die Auftrennung der Proteinbanden im Gel. Das kommerziell erhältliche Acrylamid und Bisacrylamid war im Verhältnis 37,5:1 in einer 30%igen Glyzerinlösung angesetzt. Das Sammelgel dient zur Fokussierung des Probenvolumens zu einer Bande, die in einem Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichtes getrennt werden.

Da die meisten in dieser Arbeit untersuchten Proteine ein Molekulargewicht zwischen 40 und 90 kDa haben, wurden zur Untersuchung zehnprozentige Gele verwendet werden, die zu einer optimalen Bandenschärfe der Proteine im untersuchten Molekularbereich führen.

Stammlösung	Sammelgel 5%	Trenngel 10%
ddH ₂ O	3,4 ml	3,3 ml
30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	0,83 ml	4,0 ml
1,0 M Tris/HCl; pH 6,8	0,63 ml	
1,5 M Tris/HCl; pH 8,8		2,5 ml
10% SDS	0,05 ml	0,1 ml
10% APS	0,05 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,004 ml

Tabelle 2.3: Volumina der Substanzen für ein SDS-Polyacrylamidgel

Die Tabelle zeigt die Konzentrationen der Komponenten, wie sie für ein 5%iges Sammelgel und ein 12%iges Trenngel verwendet wurden. APS und TEMED wurden erst kurz vor dem Gießen des Gels hinzupipettiert.

Eine definierte Proteinmenge (50 bzw. 70 µg) wurde mit Ripa (+Inhibitoren) auf identische Volumina eingestellt und unter Zugabe von einem Volumen 1:2 Laemmli-Puffer (100mM Tris/Cl (pH 6,8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0,2% Bromphenolblau, 20% Glycerol, 5% β-Mercaptoethanol) erhitzt. Der Laemmli-Puffer enthält neben SDS β-Mercaptoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Proteinuntereinheiten. Anschließend wurden die Proben zum Proteindenaturieren auf 95°C für 5 min erhitzt, und nach dem Abkühlen durch Zentrifugation (1 min bei 14.000 x g) am Boden des Gefäßes gesammelt.

Nach dem Polymerisieren des Gels wurden die vorbereiteten Proteinproben

aufgetragen. Der Gellauf im Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3) erfolgte mit 20 mA pro Gel.

2.6.5 Transfer

Proteine, die in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden, können durch Transfer auf eine Membran immobilisiert (*blotting*) und anschließend immunochemisch detektiert werden.

Zur Elektrophorese wurde je nach Proteingröße ein Transferpuffer für große (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037% SDS, 20% Methanol) oder für kleine Proteine (25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 20% Methanol, pH 8,5) verwandt. Bei Proteinen unter 50 kDa empfahl es sich, den Transferpuffer für kleine Proteine einzusetzen.

Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte mit Hilfe einer Wet-Western-Blot-Apparatur. Es wurden von der Kathode ausgehend über je eine Lage aus mit Transferpuffer getränktem Schwamm und Filterpapier das Gel und dann die in Transferpuffer eingeweichte Nitrozellulosemembran aufgeschichtet, gefolgt von je einer Lage mit Transferpuffer getränktem Filterpapier und Schwamm. Der Proteintransfer erfolgt durch gerichtete Wanderung der Proteine im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, dabei werden sie auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Puffer fördert sowohl das Lösen der Proteine aus dem Gel als auch deren Bindung an die Nitrozellulosemembran. Transferbedingungen waren Transferkammer spezifisch 8 mA pro cm² bei einer durchschnittlichen Transferdauer von 90 min.

2.6.6 Ponceaufärbung

Alle Nitrozellulosemembranen wurden Ponceau gefärbt, um die gleichmäßige Verteilung der Proteine und den optimalen Transfer der Proteine auf die Membran zu dokumentieren.

Hierbei handelt es sich um eine unspezifische reversible Proteinfärbung, die alle auf die Nitrozellulosemembran geblotteten Proteine rot anfärbt. Kommerziell erhältliches Ponceau S von Sigma wurden 0,1% (w/v) in 5% Essigsäurelösung gelöst. Die Nitrozellulosemembran wurde eine Minute in der Ponceaulösung gefärbt und dann mit Leitungswasser entfärbt, bis einzelne Banden zu erkennen waren.

2.6.7 Immunodetektion

Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in Blockpuffer (5 % (w/v) Magermilchpulver in Trisgepufferter Saline (TBS; 200 mM Tris, 1370 mM NaCl; pH 7,6) mit 0,1 % des Detergenz Tween 20 (TBS-T) inkubiert. Nach drei Waschschritten in TBS-T von jeweils einer Viertelstunde wurde die Membran über Nacht in individuell verdünntem Primärantikörper bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach drei weiteren Waschschritten in TBS-T mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde überschüssiger Antikörper mit TBS-T durch Waschen entfernt.

Schließlich wurde für 1 min bei RT Detektionsreagenz der Firma Perkin-Elmer zu gleichen Teilen aus zwei Lösungen (Peroxidasereagenz und Verstärkungsreagenz) für eine verstärkte Chemilumineszenzreaktion (ECL) zugegeben, welches von der Peroxidase umgesetzt wurde. Das bei diesem Prozess emittierte Licht (425 nm) führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms an den entsprechenden Reaktionsstellen. Die Belichtungszeiten variierten, abhängig von den Antikörperaffinitäten, zwischen 5 Sekunden und 2 Stunden.

Für primäre und sekundäre Antikörper waren die Konzentrationen individuell und proteinabhängig ausgetestet worden (siehe Anhang).

Zum Nachweis mehrerer verschiedener Proteine auf einer Nitrozellulosemembran wurde diese Membran nach der Immunodetektion für 30 min bei Raumtemperatur in SDS Strippingbuffer (2% SDS, 100 mM 2-Mercaptoethanol in PBS) zur Entfernung der gebundenen Antikörper inkubiert. Eine weitere Immunodetektion wurde nach zweifachem Waschen in TBS-T mit der Inkubation in Blockpuffer gestartet.

2.6.8 Immunfärbung in Petrischalen und Chambersliedes

Die antikörpervermittelte Markierung ermöglicht es Zellen, nicht nur aufgrund der mikroskopischen Ansicht, sondern darüber hinaus ihrer physiologischen Eigenschaften z.B. die Präsentation bestimmter Oberflächenmoleküle zu identifizieren.

Nachdem zunächst das Medium sorgfältig entfernt und mit eiskaltem PBS nachgespült worden war, wurde die Kultur mit 4°C kaltem 1% Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Im ursprünglichen Protokoll war eine 4%

Paraformaldehydlösung mit Ammoniumchloridstopplösung vorgesehen, die allerdings zugunsten einer besseren Qualität der Präparate auf 1% gesenkt wurde. Anschließend wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS-Waschpuffer (v/v 0,2% Tween 20, v/v 0,1% Igepal in PBS) für insgesamt 30 min das Paraformaldehyd entfernt und die Zellen mit 0,5% Triton X100 in PBS für 5 min bei RT permeabilisiert. Daran schloss sich eine Inkubation mit 5% serumhaltiger PBS-Blocklösung (5% Serum, v/v 0,2% Tween 20 in PBS) von 1 h bei RT an. Dann erfolgte die Bindung des Primärantikörpers in Blocklösung für 1,5 h bei RT. Nach drei Waschsritten in PBS-Waschpuffer wurde der Sekundärantikörper in Blocklösung für 1h bei RT zugesetzt. Danach erfolgten drei Waschschrte, an die sich eine Kernfärbung mit 0,5µg/mL Dapi (Hoechst) für 1min anschloss. Im folgenden Waschschrte mit Wasser färbte sich das DAPI. Dann wurde das Präparat mit Mountingmedium eingebettet, mit einem Deckglas verschlossen und im Mikroskop betrachtet. Zum Einbetten der Präparate war ursprünglich Vektaschield-Lösung vorgesehen gewesen, dieses Einbettmedium übernimmt auch die Kernfärbung, aber durch die Flüssigkeit der Lösung, die nicht aushärtete, war die Bildschärfe nicht gegeben, es kam zur Blasenbildung des eingedeckten Präparates und die Präparate waren nur kurzfristig haltbar.

3 Ergebnisse

In der Einleitung wurde bereits dargestellt, dass das Thema der parakrinen Faktoren ein sehr schwer fassbares Gebiet ist, das eine komplexe Vorgehensweise erfordert.

Zur Charakterisierung parakriner Faktoren im Herzmuskel wurden zunächst verschiedene Zellen des Myokards - potentielle Stamm- und Progenitorzellen (SP-Zellen), Kardiomyozyten, Endothelzellen und Fibroblasten - isoliert und kultiviert. Im Bereich der potentiellen kardialen Stamm- und Progenitorzellen ist derzeit noch vieles im Fluss, daher gibt es noch keine einheitliche Definition dieser Zellen. Aus diesem Grund wurde zunächst mit einer Charakterisierung potentieller Progenitorzellen begonnen. Anschließend wurden die verschiedenen isolierten Zellpopulationen parakrinen Faktoren in Form von konditioniertem Medium ausgesetzt. Abschließend wurde anhand des Modells des myokardialen STAT3 *knock outs* die Wirkung parakriner Faktoren auf das Herz in Hinblick auf die frühzeitige Gewebealterung untersucht.

3.1 Isolierung und Charakterisierung von SP-Zellen

In der Literatur sind verschieden charakterisierte Stammzellen beschrieben, die sich in vivo oder in vitro in Kardiomyozyten differenzieren können.

Die genaueste Charakterisierung von potentiellen myokardialen Stamm- und Progenitorzellen (SP-Zellen) findet man bei Oh et al. (2003). Diese Zellen exprimieren CD31, CD38 und Sca-1. Auf diese Fraktion myokardialer Zellen habe ich mich im Zusammenhang mit SP-Zellen hauptsächlich konzentriert.

3.1.1 Verschiedene Methoden zur Isolierung von Stammzellen

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur Isolation von Stammzellen basiert auf einem modifizierten Protokoll von Oh et al., in dessen Veröffentlichung diese Stammzellen beschrieben wurden, die dreifach positiv sind für Sca-1, CD31 und CD38. Im Folgenden wird das Ergebnis der unterschiedlichen methodischen Ansätze zur Isolation beschrieben, die ich im Laufe meiner Arbeit zur Etablierung durchgeführt habe.

Im ersten Protokoll (s. Tab. 3.1) wurde eine Kardiomyozyten depletierte Fraktion isoliert, die nicht spezifisch sortiert wurde. Das Vorgehen entsprach im Allgemeinen der Isolation neonataler Kardiomyozyten, die Collagenasekonzentration wurde aber nach Literaturangabe auf 0,1% erhöht. Diese sehr heterogene Population von ca. 1 Mio. Zellen pro Herz enthielt einen hohen Anteil an Fibroblasten und anderen nicht näher charakterisierten Zellen.

	1. Protokoll	2. Protokoll	3. Protokoll
Methodische Grundlage	Protokoll zur Isolation neonataler Kardiomyozyten	Protokoll zur Isolation neonataler Kardiomyozyten mit MACS für Sca-1 ⁺	Protokoll zur Isolation adulter Kardiomyozyten und von Endothelzellen mit MACS für Sca-1 ⁺
Zahl isolierter Zellen (nach MACS)	1 x 10 ⁶ pro Herz, kein Sort	1 x 10 ⁶ pro Herz (1 x 10 ⁵ Sca-1 ⁺)	2 x 10 ⁶ pro Herz (2 x 10 ⁵ Sca-1 ⁺)
Reinheit	Sehr heterogen	Mit Fibroblasten	Fibroblasten differenzieren möglicherweise aus
Verhalten in Kultur	Verklumpen, absterben	Verklumpen, absterben	Einzelzellsuspension
Stimulierbarkeit	Keine	Keine	Proliferationsverhalten bis zur 2. Woche
Adhärenz	Fibroblasten setzen sich ab, Adhärenz an Fibroblasten	Fibroblasten setzen sich ab, Adhärenz an Fibroblasten	Diverse Populationen setzen sich ab
Präparationszeit	9 h	12 h	4 h

Tabelle 3.1: Etablierung der SPC Isolation

Das Protokoll 2 (s. Tabelle 3.1) stellt eine Modifikation des ersten Protokolls dar, bei dem die Zellfraktion zusätzlich nach Sca-1⁺ Zellen sortiert wurden. Diese Zellen sollten nach Oh et al. Eigenschaften kardialer Progenitorzellen haben. Die Zellpopulation war weniger heterogen, dennoch setzten sich in Kultur zunächst

Fibroblasten ab, an denen dann Sca-1⁺ Zellen adhärirten (s. Kap.2). Im weiteren Verlauf bildeten sich schwimmende Zellhaufen aus kleinen proliferierenden Zellen. In diesen Zellhaufen vermehrten sich die Zellen zunächst und bildeten Gebilde aus mehr als dreißig Zellen, aber nach ein bis zwei Wochen kam es zum Absterben der Zellen.

Für das Protokoll 3 (s. Tabelle 3.1) wurde ein anderer methodischer Ansatz gewählt, da die Vermutung nahe lag, dass die geringe Ausbeute der oben genannten Protokolle in der langen Verdauzeit lag, in der die Zellen der Wirkung der Collagenase ausgesetzt waren. Auf diese Methode, die das Standardprotokoll meiner Arbeit darstellt, soll im folgenden Absatz näher eingegangen werden.

3.1.2 Beschreibung der Sca1⁺-Zellen

Zur Isolierung von Stamm- und Progenitorzellen wurden unterschiedliche Methoden durchgeführt, die sich an der Literatur orientierten. Allerdings konnte bei den meisten Methoden keine ausreichende Lebendzellzahl erreicht werden. Dabei wurden verschiedene Beschichtungen und Oberflächen gewählt. Die Zellen zeigten keine oder nur eine verminderte Adhärenz. Relativ gute Erfolge konnten mit einem modifizierten Protokoll erzielt werden, das sowohl auf einem Protokoll zur Isolierung adulter Kardiomyozyten basiert, als auch auf Erfahrungen aus der Isolierung von Endothelzellen zurückgreift (siehe Tab. 3.1).

Dabei wurden im Mittel 2×10^5 Sca-1 positive Zellen pro Mausherz isoliert. Binnen der ersten drei Tage setzten sich ca. 10% der Zellen als Fibroblasten ab. Nach zwei Wochen konnte in einigen Kulturen eine adhärente, wenig proliferativ wachsende Zellpopulation beobachtet werden. Diese nicht genauer untersuchten Zellen waren eigenfluoreszierend und bildeten einen Layer. EDTA bzw. Trypsin/EDTA gegenüber reagierten sie empfindlich, so dass eine Ablösung mit diesen Chemikalien nicht möglich war.

Transferierte man die nichtadhärenten Zellen jeweils am dritten Tag, erreichte man nach einer Woche eine reine Sca1⁺CD31⁺CD38⁺ Kultur (s. Abb. 3.1).

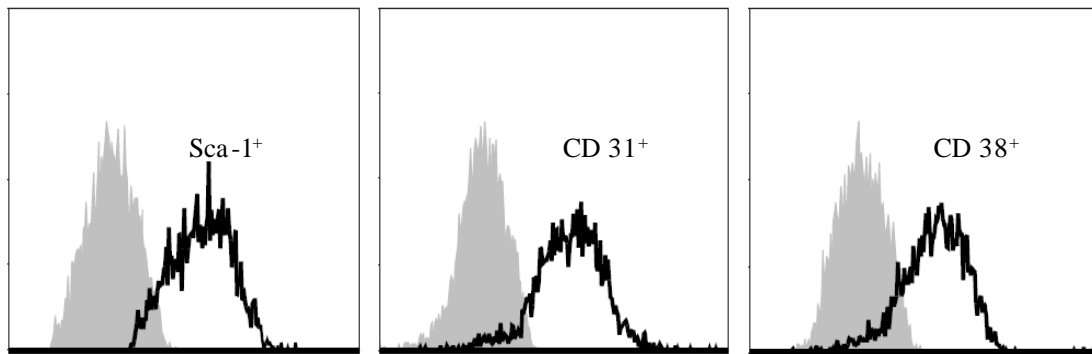


Abb. 3.1: Sca-1 positive Zellen sind nach vier Wochen in Kultur homogen dreifach positiv für CD38, CD31, Sca-1

Eine isolierte kardiomyozytendepletierte Fraktion aus Wildtyptieren wurde nach Sca-1-Expression sortiert. Diese Zellpopulation wurde nach 4 Wochen in Kultur mittels FACS-Analyse auf Expression von CD38-FITC, Sca-1-PE und CD31-APC untersucht. Die Zellpopulation, als schwarze Linie dargestellt, war homogen dreifach positiv. Die zugehörigen Isotypkontrollen sind grau dargestellt.

3.1.3 Analyse des Gehalts an Stamm- und Progenitorzellen mittels FACS-Analyse

Um die Zahl potentieller Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen, wurden aus dem Herzen eine kardiomyozytendepletierte Fraktion isoliert und mittels FACS-Analyse mit Unterstützung durch Dr. M. Ballmaier und Dr. C. Templin auf Zellen sortiert, die dreifach positiv sind für Sca-1, CD31 und CD38. Dabei konnte ein Anteil von 25 % dreifach positiver Zellen festgestellt werden. (s. Abb. 3.2)

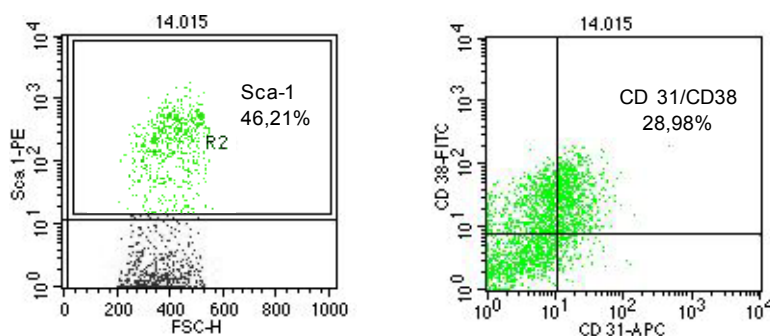


Abb. 3.2: Durchschnittlich 25% der Zellen einer kardiomyozytendepletierten Kultur in 3 Monate alten Tieren sind positiv für Sca-1, CD31 und CD38

Aus drei Monate alten Tieren wurde eine kardiomyozytendepletierte Fraktion isoliert und anschließend mittels FACS-Analyse für Sca-1-PE und CD38-FITC, CD31-APC Oberflächenmarker untersucht.

3.1.4 Untersuchung der Stimulierbarkeit der Sca-1⁺-Zellen

Mit Hilfe eines Proliferationsassays wurde die Stimulierbarkeit der Sca-1 positiven Zellen getestet. Dazu wurden auf Sca-1 im MACS sortierte Zellen einer kardiomyozytendepletierten Fraktion (Sca-1⁺_{MACS}) für zwei Tage kultiviert. Die nicht adhärenen Zellen wurden mit $0,5 \times 10^4$ Zellen pro cm^2 und $100 \mu\text{l}$ in serumarmen SPC-Medium mit final 2% FCS ausgesät und im Weiteren stimuliert (s.u.).

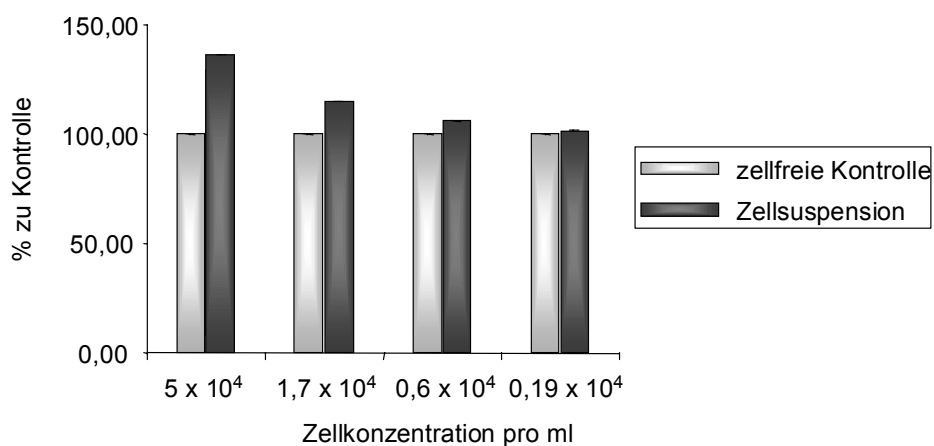


Abb. 3.3: Der Proliferationsnachweis für die Sca1⁺_{MACS}-Zellen im Assay setzt eine Konzentration von $1,7 \times 10^4$ Zellen pro ml voraus

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von Sca1⁺_{MACS} Zellen nach der zweiten Passage in den Proliferationsassay eingesetzt, dabei wurde mit 20% FCS haltigem Kulturmedium stimuliert. Als Kontrolle (weiß) wurden Leermessungen ohne Zellen mit Medium eingesetzt.

Um die Induzierbarkeit der Proliferation und die Zellzahl zu optimieren, wurden die Zellen zunächst in verschiedenen Konzentrationen ausgebracht. Dabei konnte nur bei einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro ml und 24 Stunden Stimulationszeit eine induzierbare Proliferation gemessen werden (s. Abb. 3.3). Eine höhere Zelldichte konnte aufgrund der geringen Ausbeute der Präparation nicht eingesetzt werden, so dass im Weiteren mit dieser Zelldichte gearbeitet wurde.

Um herauszufinden, welches der optimale Zeitpunkt zur Stimulation nach Kultivierung wäre, wurden die Zellen nach 6 Tagen und 12 Tagen Kultivierung betrachtet. Nach 12 Tagen in Kultur war die Proliferationsrate so gering, dass sie durch diesen Assay nicht mehr gemessen werden konnte.

Daher wurden die Zellen in der Konzentration von 5×10^4 Zellen pro ml nach ungefähr einer Woche für die anschließenden Stimulationsversuche eingesetzt.

3.2 Molekularbiologische Untersuchung der Sca1⁺-Zellen

Für die Untersuchung des Expressionsmusters kardialer Sca1⁺-Zellen wurde die RNA von Sca-1⁺_{MACS} Zellen aus Wildtypmyokard in cDNA umgeschrieben, und unter den oben beschriebenen Bedingungen für semiquantitative PCR eingesetzt.

3.2.1 Untersuchung endothelialer Marker: eNOS, VEGF

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wird in Zellen des kardiovaskulären Systems exprimiert. Durch die Bildung des Mediators NO können Endothelzellen die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur beeinflussen, was auch von Bedeutung ist für Vasodilation, Angiogenese und Stressantwort. (Lodish 2001)

Bei Sca-1⁺_{MACS} Zellen konnte die Expression von eNOS nachgewiesen werden. (s. Abb 3.4)

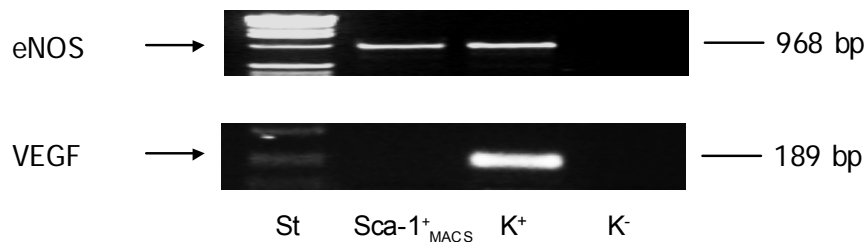


Abb. 3.4: Die Expression endothelialer Marker

Aus Sca-1⁺_{MACS} Zellen, wurde direkt nach Isolation RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. In der PCR wurden die Expression endothelialer Marker unter Primer-spezifischen Bedingungen untersucht. Als Positivkontrolle (K⁺) wurde endotheliale cDNA mitgeführt.

Der VEGF (*vascular endothelial growth factor*) wird von verschiedenen Zellen (u.a. Endothelzellen und Kardiomyozyten) exprimiert. VEGF bindet an den VEGF-Rezeptor-2 (flt1). Dieser Signalweg ist notwendig für Proliferation, Chemotaxis und Angiogenese. (Carmeliet et al. 1996; Shibuya et al.1994) Es konnte in Sca-1⁺_{MACS} Zellen keine VEGF-RNA nachgewiesen werden.

3.2.2 Untersuchung kardialer Transkriptionsfaktoren: Mef2c, Nkx2.5 und GATA4

Der Transkriptionsfaktor Mef2c (*myocyte enhancer factor 2c*) reguliert unter anderem die Aktivierung des α MHC-Promotors in adulten Kardiomyozyten. (Razeghi et al. 2002) Er ist ein wichtiger myokardialer Marker. Sca-1⁺_{MACS}-Zellen exprimieren Mef2c. (s. Abb. 3.5) Nkx2.5 ist ein myokardialer Marker, der zu Beginn der Stammzellendifferenzierung exprimiert wird und die Expression anderer kardialer Marker wie GATA4 und Mef2c beeinflusst. Die Nkx2.5-Expression konnte in den Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nachgewiesen werden. GATA4 ist ein früher Transkriptionsfaktor der Kardiomyozyten. Die Expression dieses kardialen Markers konnten für Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5).

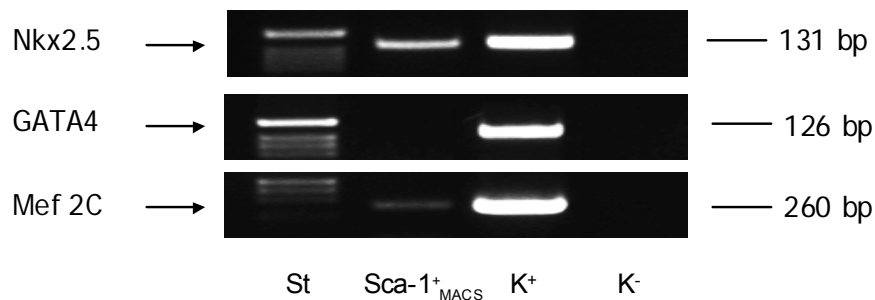


Abb. 3.5: Die Expression früher kardialer Marker

Aus Sca-1⁺_{MACS} Zellen, wurde direkt nach Isolation RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. In der PCR wurden die Expression der frühen kardialen Marker Nkx2.5, GATA4 und Mef2c untersucht. Als Positivkontrolle (K⁺) wurde endotheliale cDNA mitgeführt.

3.2.3 Untersuchung zur Apoptose: Bcl-2

Das B-Cell-Leukemia 2 Protein (Bcl-2) ist ein antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie. Nach Phosphorylierung inhibiert es die Cytochrom C bedingte Apoptose. Es konnte nur eine sehr geringe Expression für Bcl-2 unter üblichen Bedingungen dokumentiert werden.



Abb. 3.6: Die Expression des Apoptosemarker Bcl-2

Aus Sca-1⁺_{MACS} Zellen, wurde direkt nach Isolation RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. In der PCR wurden die Expression von Bcl-2 untersucht. Als Positivkontrolle (K⁺) wurde cDNA aus Herzgewebe mitgeführt.

3.3 Differenzierung von Sca-1 positiven Zellen

3.3.1 Beobachtungen zum Einfluss von Kardiomyozyten auf Entwicklung und Differenzierung von Sca-1 positiven Zellen

3.3.1.1 *Kokultur Sca-1⁺-Zellen mit neonatalen Mauskardiomyozyten*

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen, die frisch aus dem Herzgewebe von 6-8 Wochen alten Wildtypmäusen isoliert worden waren, wurden nach einer Tamra-Zellfärbung und einem einstündigen *Preplating* auf einer neonatalen Mauskardiomyozytenkultur ausgesät. Die Mauskardiomyozyten waren bereits am Vortag isoliert und 18 h auf Gelatine und Fibronectin beschichteten Platten kultiviert worden.

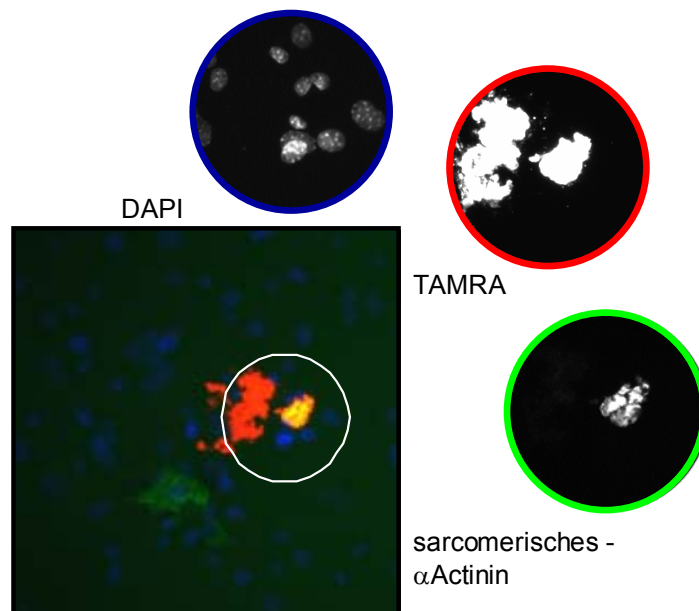


Abb. 3.7: Färbung einer Sca-1⁺-Zelle in Kokultur für sarcomerisches α-Aktinin

Tamra gefärbte Sca-1⁺_{MACS} Zellen wurden mit neonatalen Kardiomyozyten der Maus 14 Tage kokultiviert und anschließend mit FITC konjugiertem Antikörper gegen sarcomerisches Aktinin (grün) gefärbt, eine Kernfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt, rot die TAMRA Färbung.

In Kokultur setzten sich bereits nach zwei Tagen die ersten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen auf den neonatalen Mauskardiomyozyten ab. Nach zwei Wochen waren die Zellen in den Kontrollplatten fast vollständig abgestorben. Die Schalen in denen die Kokultur angesetzt war, zeigten eine Zelldichte von über 90%. Die Zellen wurden anschließend Immunfluoreszenz gefärbt gegen sarcomerisches α-Aktinin, um Differenzierung zu beobachten. Wie zu erwarten, ließ sich das sarcomerisches α-

Aktinin der neonatalen Kardiomyozyten immunochemisch markieren, während sie nicht Tamra-markiert waren. Vereinzelt konnten Tamra-gefärbte Zellen beobachtet werden, bei denen ebenso sarcomerisches α -Aktinin nachgewiesen werden konnte, wobei allerdings die meisten Tamra-gefärbten Zellen nicht doppeltgefärbt waren. (s. Abb. 3.7)

Es wurden auch Cokultivierungsversuche durchgeführt, bei denen neonatale Kardiomyozyten mit der halben Dichte ausgesät wurde. Allerdings starben in diesen Kulturen die Sca-1⁺_{MACS}-Zellen früher ab.

3.3.1.2 Kokultur Sca-1⁺ Zellen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten

Zusätzlich zu einer Kokultivierung mit neonatalen Mauskardiomyozyten, die physiologischer erscheint, wurden - aufgrund der geringen Ausbeute der Isolation ($0,3 \times 10^6$ Kardiomyozyten pro Herz) und geringer Lebensdauer dieser Zellen von maximal zwei Wochen - Cokultivierungsversuche mit neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Das methodische Vorgehen entsprach der Kokultivierung mit neonatalen Mauskardiomyozyten.

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen, die frisch aus dem Herzgewebe von 6-8 Wochen alten Wildtypmäusen isoliert worden waren, wurden nach einer Tamra-Zellfärbung und einem einstündigen *Preplating* auf einer neonatalen Rattenkardiomyozytenkultur ausgesät. Die Rattenkardiomyozyten waren bereits am Vortag isoliert und 18 Stunden auf Gelatine und Fibronectin beschichteten Platten kultiviert worden.

Nach zwei Tagen in Kokultur setzten sich die ersten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen auf den neonatalen Rattenkardiomyozyten ab. Nach zwei Wochen konnte beobachtet werden, dass sich in der Kultur ein Netzwerk aus rotgefärbten Zellen und ungefärbten Zellen gebildet hatte. Die Zellen zeigten eine begrenzte synchrone Kontraktionsfähigkeit. Daneben konnte beobachtet werden, dass mit Tamra-gefärbte Zellen sich auf den kontrahierenden Zellen niedergelassen hatten. Tamra-gefärbte Zellen, die Kontraktionen zeigten, waren in sehr geringem Maße (unter $1:1 \times 10^6$) ebenfalls vorhanden. (s. Abb. 3.8) Bei Kontrollkulturen der neonatalen Rattenkardiomyozyten ohne Sca-1⁺_{MACS}-Zellen, die unter den gleichen Bedingungen kultiviert worden waren, konnten keine Kontraktionen der Kardiomyozyten beobachtet werden.

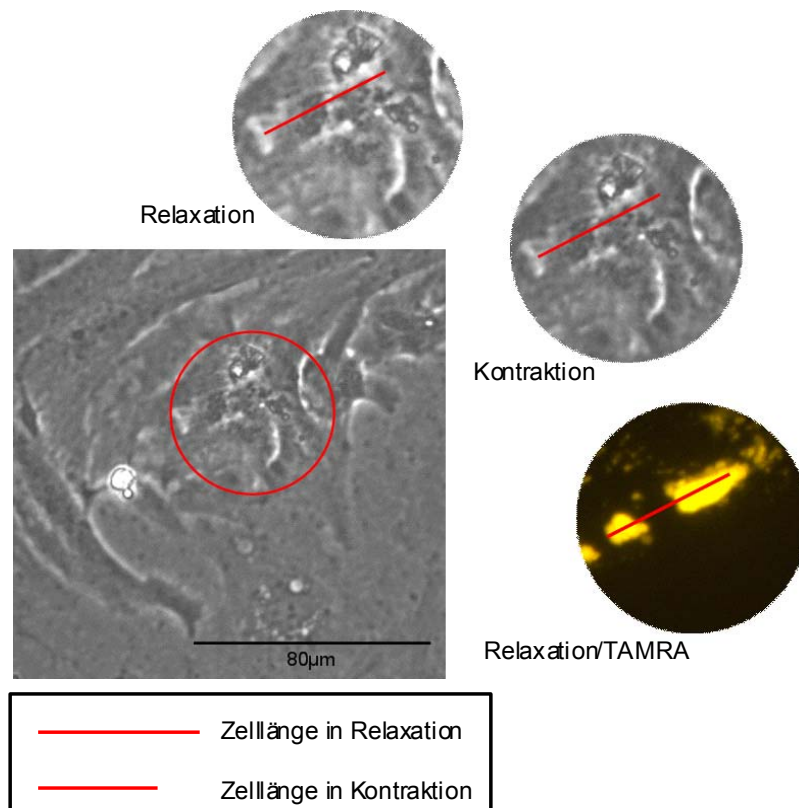


Abb. 3.8: Die Kontraktion von Sca-1⁺_{MACS}-Zellen konnte vereinzelt nach drei Wochen in Kokultur beobachtet werden.

TAMRA gefärbte Sca-1⁺_{MACS} Zellen wurden mit neonatalen Kardiomyozyten der Ratte drei Wochen kokultiviert. Im Phasenkontrast konnte die Kontraktion der gesamten Zelle beobachtet werden. Die Länge einer Zelle in Kontraktion wurde zum Vergleich als roter Strich dargestellt.

3.3.1.3 Stimulation von Sca-1-positiven Zellen mit konditioniertem Medium neonataler Kardiomyozyten

Um zwischen einem direkten Einfluss neonataler Kardiomyozyten und deren parakriner Wirkung zu unterscheiden, wurden Überstände von neonatalen Rattenkardiomyozyten gewonnen, die als konditioniertes Medium zur Kultivierung von SPC verwendet wurden. Die Sca-1⁺_{MACS}-Zellen setzten sich nicht auf den unterschiedlich vorbehandelten Oberflächen ab und zeigten auch keine Anzeichen von Differenzierung.

3.3.1.4 Kokultur Sca-1⁺-Zellen mit adulten murinen Kardiomyozyten

Adulte Kardiomyozyten aus Wildtyptieren wurden isoliert und kultiviert. In Langzeitversuchen sollte die maximale Kultivierungszeit ermittelt werden.

Nach 18 Stunden in Kultur wurde das Medium gewechselt, danach jeden Tag frisches Medium zugegeben. Nach weiteren 46h hatten sich über 40% der Zellen abgerundet bzw. abgelöst. Mehr als 75% der Zellen waren am dritten Tag nicht mehr adhären. Am dritten Tag waren durchschnittlich nur noch 3 % aller Zellen in Kultur, in manchen Kulturen waren bereits alle Zellen abgestorben. Nach 96 Stunden waren keine Zellen mehr adhären. (Abb. 3.9)

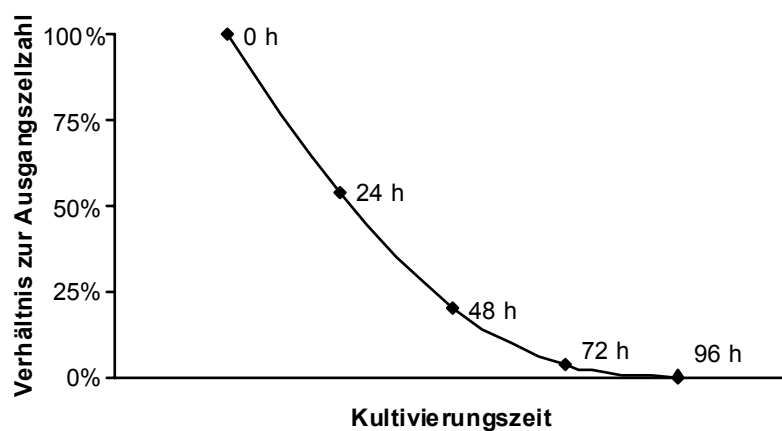


Abb. 3.9: Adulte Kardiomyozyten konnten maximal 72 Stunden kultiviert werden.

Adulte Kardiomyozyten wurden aus drei Monate alten Mäusen isoliert und unter optimalen Bedingungen kultiviert. Die Zahl der adhären Zellen wurde ermittelt und ins Verhältnis zur Ausgangszellzahl (100%) gesetzt.

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen wurden mit adulten Kardiomyozyten kokultiviert. Es konnte keine Differenzierung der SP-Zellen binnen 72 Stunden Kultivierungszeit beobachtet werden. Außerdem wurden auch keine Unterschiede im Habitus der adulten Kardiomyozyten zwischen Kokultur und Kontrolle beobachtet.

Es wurden, um die parakrinen Wirkung der adulten Kardiomyozyten auf die Sca-1⁺_{MACS} Zellen in einer längeren Zeitspanne zu untersuchen, Überstände der adulten Kardiomyozyten zur Kultivierung der Sca-1⁺_{MACS} Zellen verwendet. Allerdings konnte auch hier kein Einfluss beobachtet werden.

3.3.2 Stimulation der Expression kardialer Markern in Sca-1 positiven Zellen durch 5-Azacytidin

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen, die aus Herzgewebe von 6-8 Wochen alten Wildtypmäusen isoliert wurden, wurden mit 5-Azacytidin stimuliert. Die Kulturen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen beobachtet. Anschließend wurde ihre mRNA isoliert und die Expression kardialer Marker untersucht. Die Zellen zeigten während dieser Zeit keine optisch sichtbaren Veränderung, sie setzten sich nicht ab, allerdings proliferierten mit 10% FCS kultivierte Zellen stärker im Vergleich zu nicht stimulierten Kontrollzellen, die ebenfalls in Medium mit 10% FCS kultiviert wurden.

Als kardiale Marker wurden Mef2c und Nkx2.5 untersucht. 5-Azacytidin-stimulierte Zellen und die unstimulierte Kontrolle exprimieren beide Marker gleich stark. (s. Abb 3.10)

Als Marker für die Differenzierung der Zellen zu Muskelzellen wurden die Proben auf die Expression von α -Aktinin des Sarkomers (α -Aktinin) untersucht. Bei Untersuchung mittels Realtime-PCR zeigte sich, dass basal α Aktinin in den Zellen nur sehr schwach exprimiert wird. Vier Wochen nach Stimulation mit 5-Aza wurde die 2,5fache Menge an sarcomerischem α Aktinin nachgewiesen.

Der kardiale Transkriptionsfaktor GATA4, der basal bei Zellen der Kardiomyozyten depletierten Fraktion nicht exprimiert wird (s. Kap. 3.2.2), wurde nach vier Wochen Kultivierung von Sca-1⁺_{MACS} Zellen auch ohne zusätzlichen Stimulus exprimiert. Bei Zellen die drei Tage mit 5-Azacytidin stimuliert worden waren zeigte sich vier Wochen danach eine signifikante Steigerung der Expression gegenüber den unstimulierten Kontrollen. (Abb. 3.10)

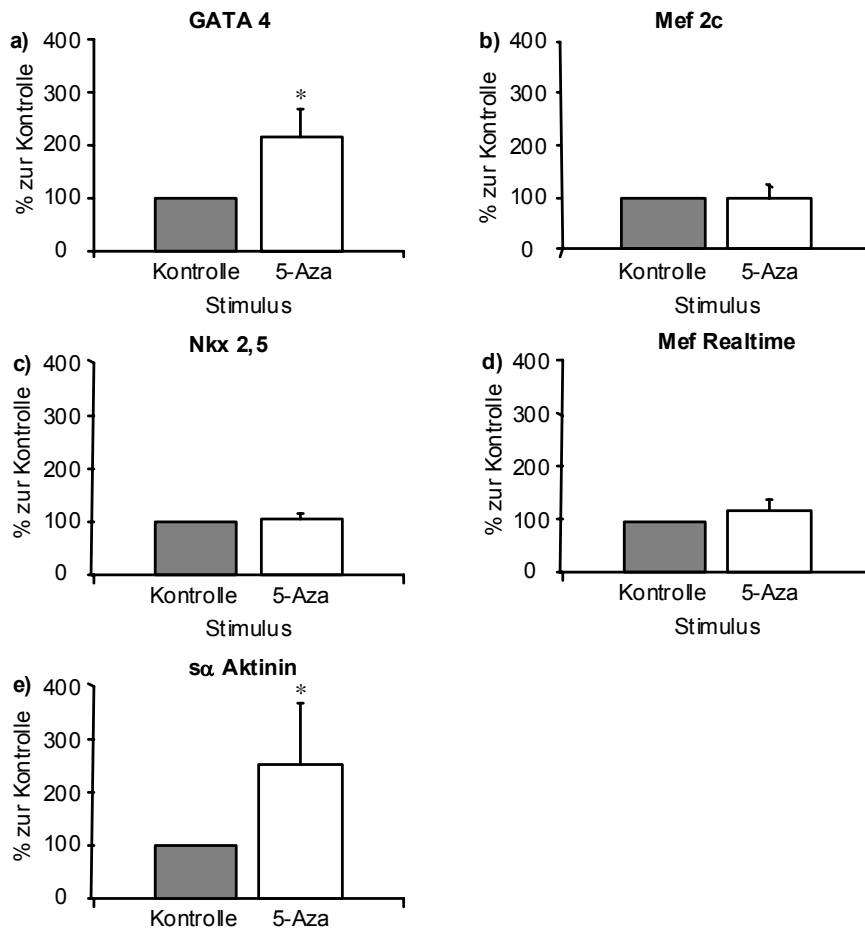


Abb. 3.10: Nach Stimulation mit 5-Azacytidin (5-Aza) werden einige kardiale Marker verstärkt exprimiert

Während einige kardiale Marker wie Mef2c [b) und d)] und Nkx2,5 in stimulierten und unstimulierten Sca-1 positiven Zellen gleich exprimiert werden, werden sowohl GATA4 a) als auch sarcomerisches α Aktinin (α Aktinin) e) nach Stimulation mit 5-Azacytidin signifikant (*) verstärkt exprimiert.

Eine kardiomyozytendepletierte Fraktion aus Herzgewebe 3 Monate alter Mäuse wurde mittels MACS nach Sca-1 positiven Zellen aufgereinigt und mit 5-Aza stimuliert, parallel wurden unstimulierte Zellen als Kontrolle mitgeführt. Nach 4 Wochen Kultivierung wurde aus diesen Zellen RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben für eine semiquantitative PCR und Realtime-PCR eingesetzt. Die Werte wurden gegen das *housekeeping gene* GAPDH abgeglichen.

3.4 Untersuchung zur Alterung in Herzen mit kardiomyozyten-spezifischem STAT3 knock out

3.4.1 Analyse des Gehalts an Stamm- und Progenitorzellen mit FACS

Um die Zahl an potentiellen Stamm- und Progenitorzellen zu untersuchen, wurde aus Herzen drei Monate alter Tiere eine kardiomyozytendepletierte Fraktion isoliert und mittels FACS-Analyse auf Zellen sortiert, die dreifach positiv sind für Sca-1, CD31 und CD38. Dabei konnte ein Anteil von 25 % an dreifach positiven Zellen festgestellt werden.

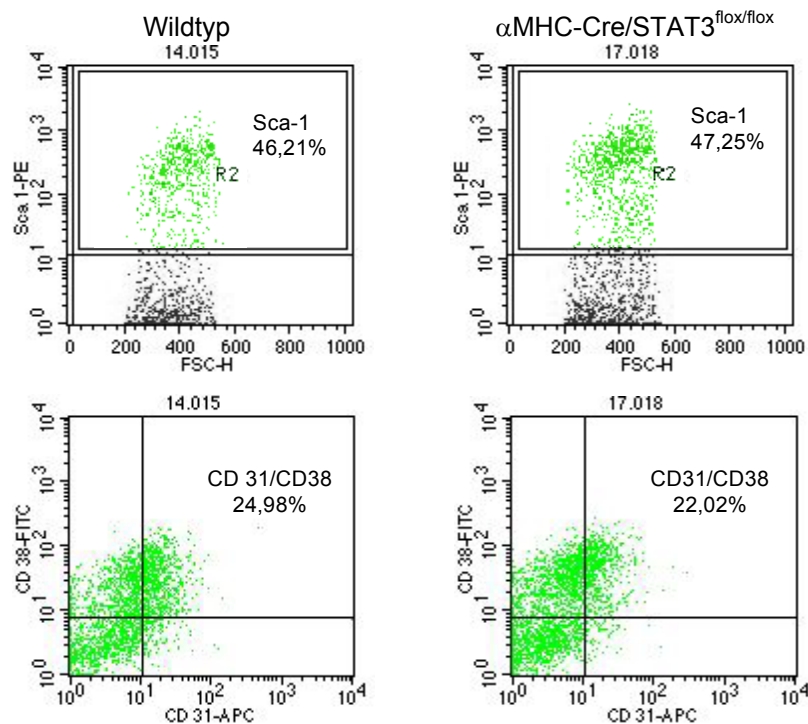


Abb. 3.11: In 3 Monate alten α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren konnten mit FACS-Analyse weniger Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen identifiziert werden als bei Tieren, die STAT3 exprimieren.

Aus drei Monate alten Tieren mit Kardiomyozyten spezifischem *knock out* für STAT3 wurde eine kardiomyozytendepletierte Fraktion isoliert und anschließend mittels FACS-Analyse für CD38-FITC, Sca-1-PE und CD31-APC Oberflächenmarker untersucht.

Herzen aus Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) zeigten neben der in der Literatur (Hilfiker-KLeiner et al. 2004) beschriebenen Vergrößerung des Herzens einen beschleunigte Auflösung der Struktur beim enzymatischen Verdau mit Collagenase II.

Bei der Bestimmung der Konzentration von Sca1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen in der kardiomyozytendepletierten Fraktion konnte ein Anteil von nur 22% in den Herzen mit myokardialem STAT3 *knock out* ausgemacht werden (s. Abb. 3.11).

3.4.2 Untersuchung der Alterung in kardialem Gewebe adulter Tieren

In FACS-Analysen (s.o.) wurde festgestellt, dass im kardialen Gewebe von Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* für STAT3 22% weniger CD31⁺CD38⁺Sca1⁺ Zellen vorliegen als im kardialen Gewebe des zugehörigen Wildtyps.

Um die Ursache hierfür und die Zusammenhänge parakriner Mechanismen näher zu beleuchten, wurden bestimmte Faktoren auf Proteinebene nachgewiesen, die auch als Alterungsmarker bezeichnet werden, da sie alterungsabhängig exprimiert werden (Torella et al. 2004). Die verwendeten Mäuse mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* und dem entsprechenden Wildtyp wurden in je drei Gruppen im Alter von drei, sechs und elf bis zwölf Monaten untersucht. Das isolierte Protein wurde auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Kontrolle der Ladung und des Transfers wurde eine Ponceaufärbung verwendet. Der immunochemische Nachweis der Proteine führte zu folgenden Ergebnissen:

3.4.2.1 Untersuchung der Protein-Expression kardialer Marker: GATA4, Nkx2.5 und Mef2c

Die Proteinexpression von GATA4 und Nkx2.5 konnten in jedem Alter nachgewiesen werden. Es konnten keine Unterschiede in der Bandenintensität zwischen den einzelnen Altersgruppen festgestellt werden. Ebenso zeigten sich keine Unterschiede in der Proteinexpression für Tieren mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* für STAT3 vs. Wildtyp. (s. Abb. 3.12)

Der kardiale Transkriptionsfaktor Mef2c ist wie bereits erwähnt ein Marker für die kardiale Differenzierung. Während im sechsten Monat die Expression von Mef2c unverändert war gegenüber der Expression im dritten Monat, kam es im zwölften Monat zur Reduktion um die Hälfte. Bei Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem

STAT3 *knock out* verminderte sich im dritten Monat Bandenintensität um 41%. Mit zunehmendem Alter konnte weniger Mef2c nachgewiesen werden. Hier nahm die nachweisbare Menge bereits im sechsten Monat ab. (s. Abb. 3.12)

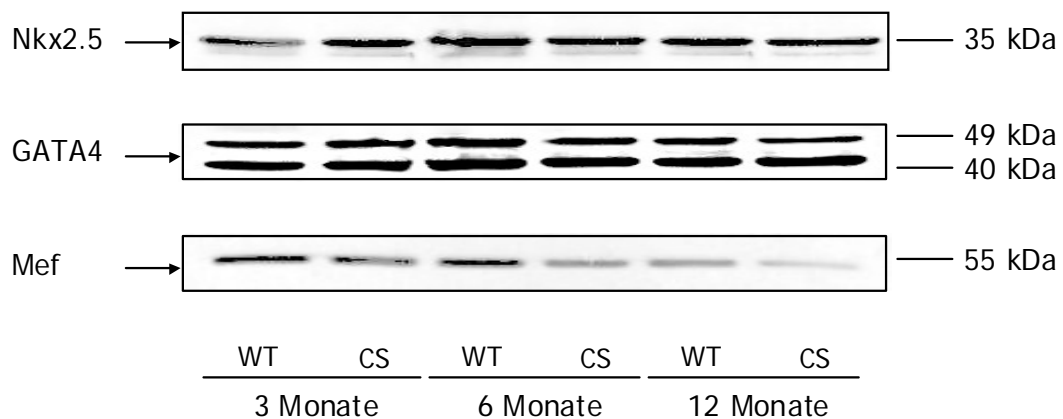


Abb. 3.12: Die Expression früher kardialer Marker

Mef-Proteinexpression ist alterungsabhängig unterschiedlich reguliert bei α MHC-Cre/STAT3^{flx/flx} (CS) vs. Wildtyp (WT); Nkx2.5-Proteinexpression ist nicht alterungsabhängig unterschiedlich reguliert bei CS vs. WT; GATA4-Proteinexpression ist nicht alterungsabhängig unterschiedlich reguliert bei CS vs. WT. Der Abgleich der Ladung erfolgte über eine Ponceaufärbung.

3.4.2.2 Untersuchung zu Zellzyklus und Alterung: p21, p16 und p53

Sowohl p21^{Cip1/Waf1} als auch p16^{Ink4a} wirken inhibitorisch über eine CDK (*Cyclin dependent kinase*) auf den Zellzyklus. p53 ist ein Tumorsuppressorprotein, das unter anderem nach Schädigung der DNA zu einer Inhibition des Zellzyklus führt. Der CDK-Inhibitor p21^{Cip1/Waf1} konnte weder bei den Herzen mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* noch in den Wildtypproben nachgewiesen werden.

Nach sechs Monaten konnte eine doppelt so starke Expression an p16 gezeigt werden wie bei drei Monate jüngeren Tieren. Nach zwölf Monaten konnte nur noch ein Viertel davon nachgewiesen werden.

In Herzen von Mäusen mit kardiomyozytenspezifischen *knock out* für STAT3 kann die gleiche Menge an p16^{Ink4a} nachgewiesen werden, wie beim Wildtyp. (s. Abb. 3.13)

p53 nimmt alterungsabhängig zu. So kann es bereits bei drei Monate alten Mäusen im Gewebe nachgewiesen werden, mit sechs Monaten hat die

Bandenintensität um das dreifache zugenommen und sich bei zwölf Monate alten Tieren auf das sechsfache erhöht. Bei Mäusen mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* für STAT3 ist die Bandenintensität gegenüber dem Wildtyp bereits im dritten Monat um 114 % erhöht. Im sechsten Lebensmonat kann doppelt soviel p53 gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden. Bei Mäusen die fast ein Jahr alt sind, kann nur noch die Hälfte an p53 nachgewiesen werden als bei sechs Monate jüngeren, damit ist sie um 32 % erniedrigt gegenüber dem Wildtyp. (Abb. 3.13)

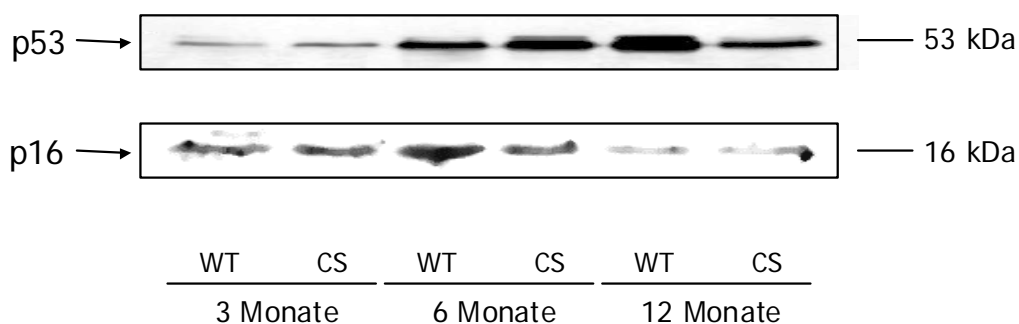


Abb. 3.13: Der Nachweis verschiedener Zellzyklusmarker mittels Westernblot ergab kein einheitliches Bild:

p53 Proteinexpression ist alterungsabhängig unterschiedlich reguliert bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} (CS) vs. Wildtyp (WT); p16 Proteinexpression ist alterungsabhängig, aber nicht genotypbedingt unterschiedlich reguliert; p21 konnte basal nicht nachgewiesen werden.

3.4.3 Sca1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen exprimieren endotheliale und kardiiale Marker

Durch die Arbeitsgruppe von Dr. Ballmaier wurde mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter unterschiedliche Fraktionen aus einer kardiomyozytendepletierten Fraktion isoliert: Die betrachteten Fraktionen waren Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ (+/+/+), Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ (+/-/-) und eine dreifach negative Fraktion Sca-1⁻CD31⁻CD38⁻ (-/-/-).

Dabei wurden die Fraktionen, wie bereits in Kap. 3.3.1 bei Sca-1⁺_{MACS}-Zellen und in 3.4.2 nach Stimulation mit 5-Aza beschrieben auf die Expression verschiedener Zellmarker untersucht. Wichtig war es hierbei Unterschiede zwischen Zellen mit Kardiomyozyten spezifischem STAT3 *knock out* und Wildtypzellen aufzudecken.

Der besondere Fokus lag dabei auf der dreifach positiven Fraktion Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺, da diese Zellen wie bereits erwähnt den Zellen entsprechen, die Oh et al. (2003) als potentielle myokardiale Progenitorzellen beschreiben.

3.4.3.1 Untersuchung endothelialer Marker

Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Zellen um endotheliale Progenitorzellen (EPC) handelt, sollte überprüft werden ob die CD31, CD38 und Sca-1 positiven Zellen endotheliale Marker exprimieren.

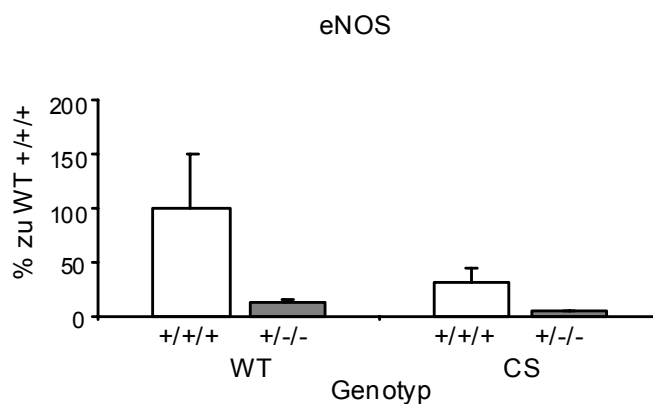


Abb. 3.14: In den untersuchten Zellen konnte eNOS nachgewiesen werden.

eNOS wird in dreifach positiven Zellen aus STAT3 *knock out* Gewebe (CS) 60% schwächer exprimiert als bei Zellen aus Wildtypmyokard (WT). Bei den Zellen die nur Sca-1 positiv sind wird nur 10% davon exprimiert.

Eine kardiomyozytendepletierte Fraktion aus Herzgewebe 6 Monate alter Mäuse wurde über FACS nach Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen(+/+/+) aufgereinigt. Dabei wurde zusätzlich eine Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ (+/-/-) Fraktion gewonnen. Die aus diesen Zellen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben für eine semiquantitative PCR eingesetzt. Die Werte wurden gegen das Housekeeping gene GAPDH abgeglichen.

Die Expression des endothelialen Markers eNOS konnte bei Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen mit semiquantitativer PCR nachgewiesen werden. Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen exprimierten eNOS in sehr viel geringerem Maße. Die Sca-1⁻CD31⁻CD38⁻ Zellen zeigten ungefähr 50% der eNOS-Expression der dreifach positiven Zellen.

Insgesamt wird eNOS in Zellen aus Wildtypmyokard stärker exprimiert als in Zellen mit myokardialem STAT3 *knock out* für Stat 3. (s. Abb.3.14).In den Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen aus Tieren mit myokardialem *knock out* für STAT3 bestand

eine Reduktion um den Faktor 3,5 gegenüber dem Wildtyp. Bei den Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen war die eNOS Expression um den Faktor 3 gegenüber dem Wildtyp gesenkt. In der dreifach negativen Fraktion konnte ein Zehntel der eNOS-Expression des Wildtyps nachgewiesen werden.

Für VEGF und seinen Rezeptor flt-1 konnte sowohl bei den Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen, als auch bei den Zellen, die nur Sca-1 exprimieren, keine Expression nachgewiesen werden. cDNA aus Endothelzellen, die als Positivkontrolle mitgeführt wurde, war für beide Faktoren positiv.

3.4.3.2 Untersuchung kardialer Marker

Als Voraussetzung für die Differenzierung von kardialen Progenitorzellen zu Kardiomyozyten gilt die Expression typischer kardialer Transkriptionsfaktoren. Ein Nachweis der Expression würde auf den Status solcher Zellen als Progenitorzellen hindeuten. Diese Faktoren weisen auf bestimmte Entwicklungsstufen hin, die aus dem embryonalen Herzen hergeleitet wurden, daher müssen nicht alle Faktoren gleichzeitig und in gleichem Maß in den Zellen exprimiert werden.

Der Transkriptionsfaktor MEF2c wird auch von den dreifach positiven Zellen exprimiert, aber in geringerem Maße als in den Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen. Bei Zellen aus STAT3 *knock out* Myokard ist die Expression von MEF2c gegenüber dem Wildtyp grundsätzlich erhöht, besonders bei den Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen (s. Abb. 3.15).

Nkx2.5-mRNA konnte in Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen nachgewiesen werden. In Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen ist die Expression auf 16% im Vergleich dazu reduziert und bei der dreifach negativen Zellpopulation gab es eine Reduktion auf 20%. Bei Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen aus Herzen mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* war die Expression von Nkx2.5 auf 8% gesenkt. Während die Menge an mRNA in Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen dem Wildtyp entsprach. (s. Abb. 3.15)

Eine GATA4-Expression konnte unabhängig vom Genotyp in keiner der untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen werden.

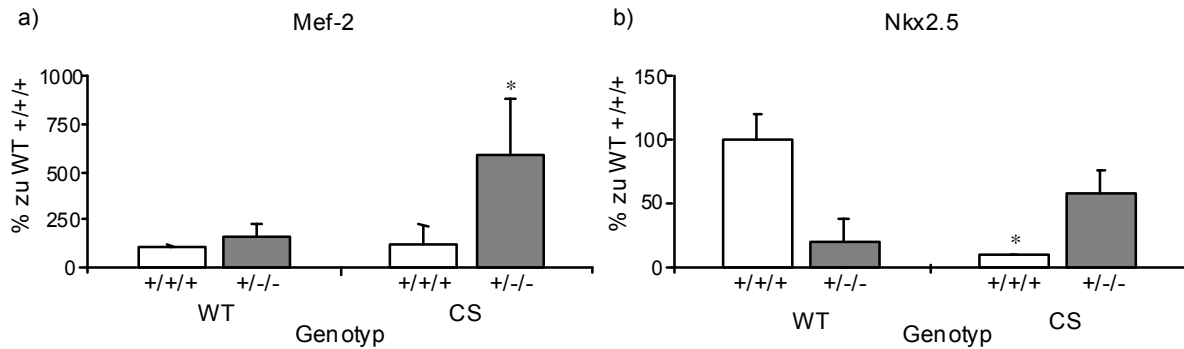


Abb. 3.15: Nkx2.5 wird signifikant schwächer in Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ aus Herzgewebe mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* als aus Wildtypmyokard exprimiert, während MEF2c gleich stark exprimiert wird.

a) MEF2c, früher kardialer Transkriptionsfaktor wird in dreifach positiven Zellen gleich stark beim Wildtyp (WT) und bei Zellen aus STAT3 knock out Gewebe (CS) exprimiert. Bei den Zellen die nur Sca-1 positiv wird im Wildtyp nicht signifikant (*) mehr MEF2C exprimiert, aber in den CS-Zellen wird mehr als dreimal soviel exprimiert. **b)** Nkx2.5, ebenfalls ein früher kardialer Marker wird in Zellen aus Gewebe mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* signifikant weniger exprimiert. Bei den einfach Sca-1 positiven Zellen (+/-/-) ist der Wert in den Zellen aus *knock out* Myokard leicht erhöht.

Eine kardiomyozytendepletierte Fraktion aus Herzgewebe 6 Monate alter Mäuse wurde über FACS nach Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen (+/+/+) aufgereinigt. Dabei wurde zusätzlich eine Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ (+/-/-) Fraktion gewonnen. Die aus diesen Zellen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben für eine semiquantitative PCR eingesetzt. Die Werte wurden gegen das Housekeeping gene GAPDH abgeglichen.

3.4.3.3 Untersuchung zu Apoptose und Zellzyklus-Aktivität

Im folgenden Abschnitt soll in den untersuchten Zellen Apoptose und zyklische Aktivität untersucht werden.

Untersuchungen auf den Gehalt an BNip-3 und Bcl-2 in den Zellen mittels Realtime-PCR sollte Auskunft darüber geben, ob der Unterschied an SPC in *knock out* und Wildtyp Herzen auf Apoptose dieser Zellen zurückzuführen wäre.

Eine Expression des antiapoptotischen Bcl-2 konnte weder beim Wildtyp noch bei Zellen aus Herzen mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* für STAT3 in der PCR nachgewiesen werden. Die Expression des Apoptosemarker BNip3 war nicht genotypabhängig, denn es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression von BNip-3 Zellen aus Wildtyp-Tieren gegenüber denen aus STAT *knock out* Herzen nachgewiesen werden.

Um festzustellen, ob es einen Unterschied in Proliferationsfähigkeit und Zellzyklusaktivität der Zellen unterschiedlicher Herkunft gab, wurde der Zellzyklusmarker CyclinD untersucht.

Bei Untersuchung der RNA aus Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen auf Expression dieses Markers mittels Realtime-PCR zeigte sich, dass die Expression in Zellen aus den Herzen mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* für STAT3 um die Hälfte erniedrigt war. (s. Abb 3.16) Der Zellzyklusmarker CyclinD wird demnach signifikant weniger stark in Zellen von Tieren mit myokardialem *knock out versus* Wildtyp exprimiert.

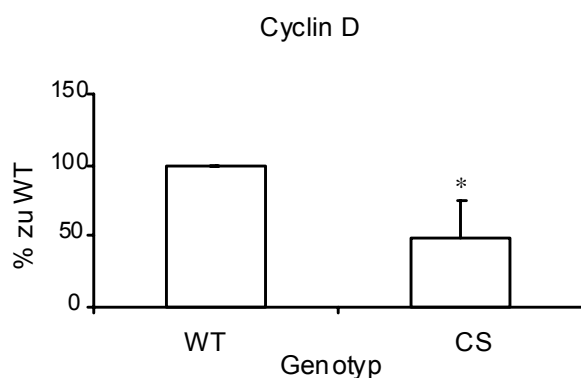


Abb. 3.16: CyclinD wird in Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺-Zellen aus α MHC-Cre/STAT3^{flx/flx}-Gewebe signifikant schwächer exprimiert als in Zellen aus Wildtypmyokard

Cyclin D ist ein Transkriptionsfaktor, der zyklische Aktivität der Zellen anzeigt. Die Expression von Cyclin D ist in Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen (+/+/+) aus Myokard mit kardiomyozytenspezifischem *knock out* (CS) ist signifikant (*) um 50% reduziert gegenüber dem zugehörigen Wildtyp (WT).

Eine kardiomyozytendepletierte Fraktion aus Herzgewebe 6 Monate alter Mäuse wurde über FACS nach Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen aufgereinigt. Die aus diesen Zellen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben für eine semiquantitative PCR eingesetzt. Die Werte wurden gegen das *housekeeping gene* GAPDH abgeglichen. n=3

3.5 Parakrine Faktoren in Überständen

3.5.1 Überstände von adulten Kardiomyozyten im DPD

Zur Gewinnung der Überstände wurden adulte Kardiomyozyten mit einem *knock out* für STAT3 und des zugehörigen Wildtyps für zwölf Stunden mit Medium 199 ohne weitere Zusätze inkubiert.

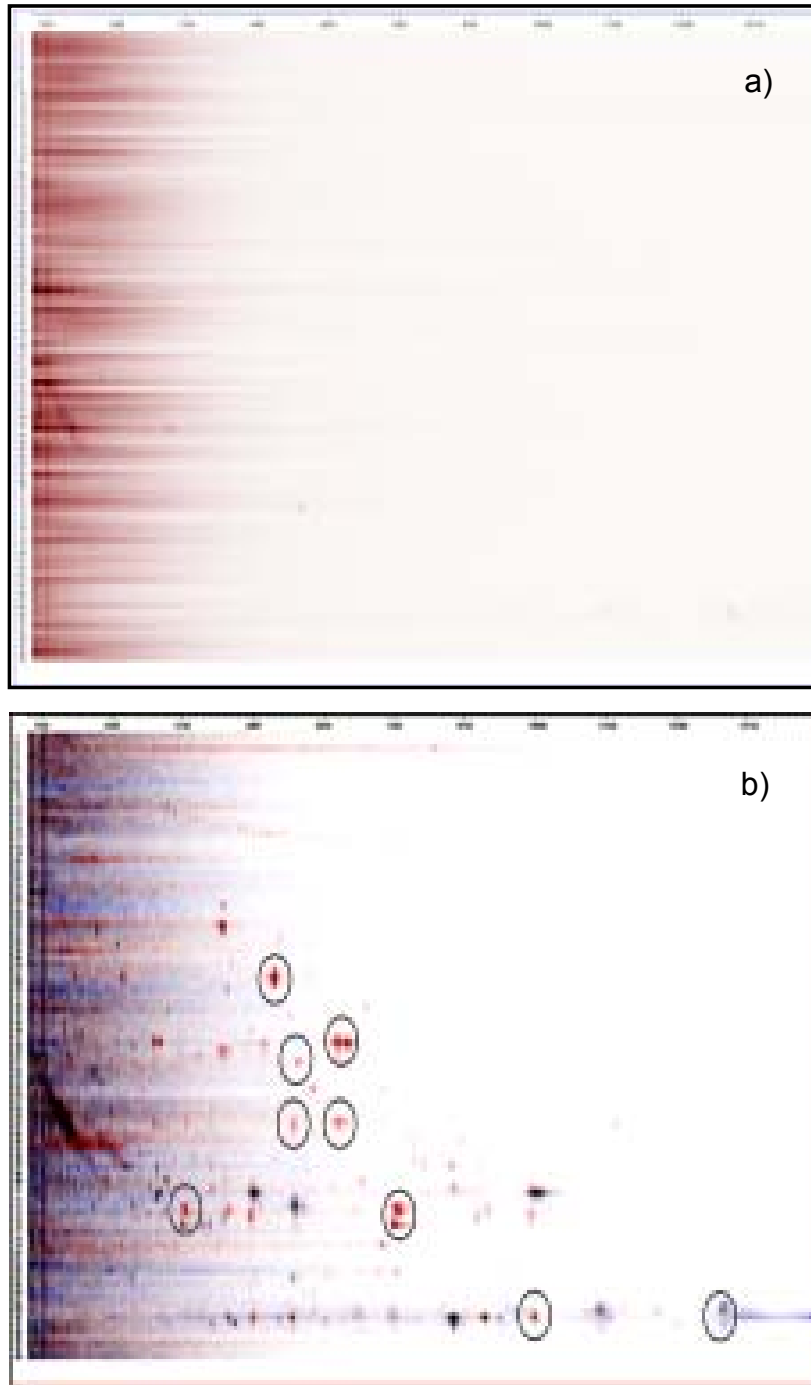


Abb. 3.17: Einige Fraktionen des konditionierten Mediums der STAT3 *knock out* Kardiomyozyten zeigten massenspektrometrische Besonderheiten

Mittels *differential peptide display* (DPD) wurden die mit Massenspektroskopie identifizierten Unterschiede zwischen Überständen von Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* (rot) und Wildtyp (blau) Überständen zusammenfassend dargestellt (b). Die Negativkontrolle (a) zum DPD zeigt den Hintergrund, der durch das eingesetzte Medium bedingt wird. Die auffällig unterschiedlichen Signale wurden mit Kreisen markiert.

Dieses Medium wurde gewählt, da es bei Verzicht auf weitere Zusätze, wie ITS und FCS die Messung nur geringfügig beeinträchtigt (siehe Abbildung 3.17 a).

Mittels HPLC wurden einzelne Protein-Fractionen aufgetrennt und im Massenspektrometer genauer untersucht. Dann wurden die zusammenfassenden DPD-Bilder der Fractionen beider Genotypen zur Deckung gebracht. In einigen Fractionen (in Abb. 3.17 b) umrandet dargestellt) zeigte sich ein unterschiedliches Bild zwischen Überständen von Zellen mit STAT3 *knock out* und Wildtypzellen. Diese wurden in den nachfolgenden Untersuchungen näher betrachtet.

Fraktionierung und DPD wurden durch die Firma Biovision durchgeführt.

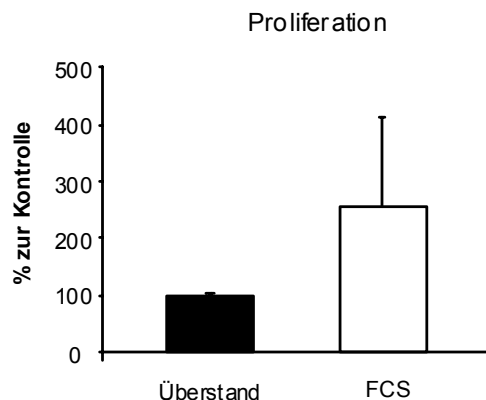


Abb. 3.18: Überstände neonataler Kardiomyozyten wirken nicht proliferationsfördernd auf Sca-1 positive Zellen

Das Proliferationsverhalten der Sca-1 positiven Zellen wurde nach 24 Stunden Stimulation mit Überständen neonataler Kardiomyozyten im Proliferationsassay untersucht.

3.6 Proliferationsassay kardialer Zellen

3.6.1 Stimulation mit serumfreien Überständen neonataler Rattenkardiomyozyten

Um den Einfluss neonataler Rattenkardiomyozyten auf das Proliferationsverhalten der Sca-1⁺_{MACS} Zellen zu untersuchen, wurden serumfreie Überstände der Kardiomyozyten als konditioniertes Medium gewonnen.

Mit diesem Medium wurden die Sca-1⁺_{MACS} Zellen 24 Stunden inkubiert und anschließend das Proliferationsverhalten ausgewertet. Nach Stimulation zeigten die

Zellen einen nur geringfügigen Anstieg der Proliferationsrate gegenüber der Kontrolle. (s. Abb. 3. 18)

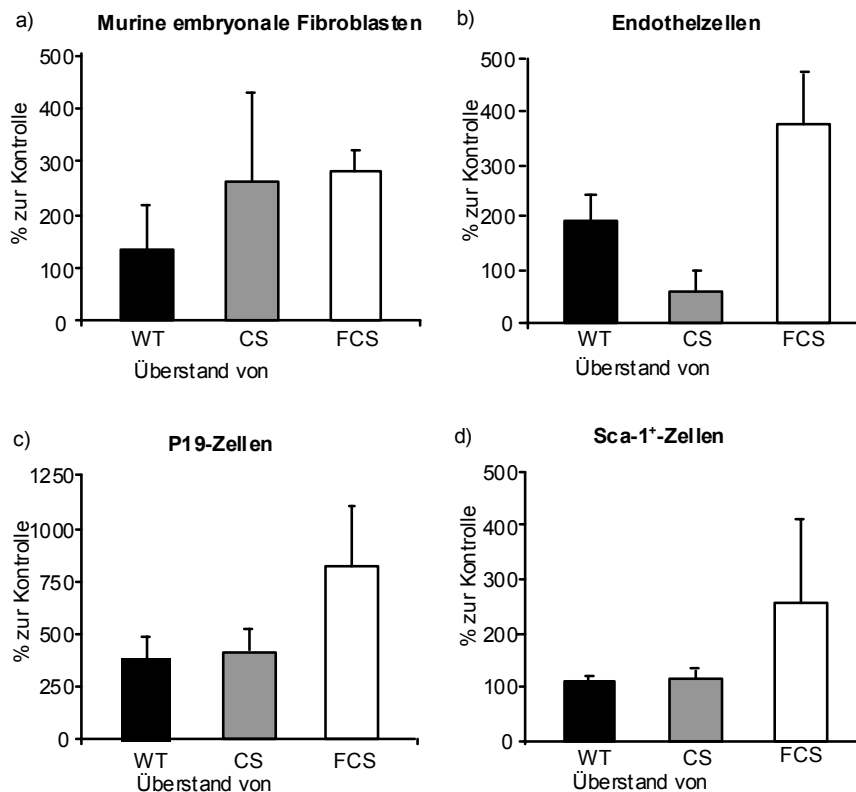


Abb. 3.19: Überstände adulter Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* beeinflussen das Proliferationsverhalten kardialer Zellen anders als Überstände von Wildtypzellen

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurden nach 24 Stunden Stimulation mit Überständen adulter Kardiomyozyten von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} (CS) und Wildtyp (WT) im Assay ausgewertet. Die Werte wurden gegen eine unstimulierte Kontrolle abgeglichen. Als Positivkontrolle wurde das zelltypensprechende Wachstumsmedium eingesetzt. **a)** Fibroblasten proliferierten stärker unter dem Einfluss von *knock out* Kardiomyozyten. **b)** Bei Endothelzellen kam es zu einer Verminderung der Zellzahl gegenüber der unstimulierten Kontrolle, während die Wildtypüberstände zu einer verstärkten Proliferation führten. **c)/d)** Sowohl bei P19-Zellen als auch bei Sca-1 positiven konnte kein signifikanter Unterschied zwischen *knock out* Überständen und Wildtyp in der Wirkung auf das Proliferationsverhalten festgestellt werden.

3.6.2 Stimulation mit konditioniertem Medium adulter Kardiomyozyten

Zur Gewinnung von Überständen wurden adulte Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* und dem zugehörigen Wildtyp für zwölf Stunden nur mit Medium 199 ohne weitere Zusätze inkubiert. Die unter diesen Bedingungen freigesetzten Faktoren wurden in Form von konditioniertem Medium zunächst direkt auf Zellen des Myokards getestet. (s. Abb. 3.19)

Eine Fibroblastenprimärkultur aus murinen Herzen war für diese Versuche nicht stabil genug, denn diese Zellen alterten in Kultur rasch und teilten sich langsam oder ungleichmäßig. Daher wurden Murine Embryonale Fibroblasten (MEF) eingesetzt.

Die MEF zeigten nach Stimulation mit konditioniertem Medium von Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* eine Verdopplung der Zellzahl gegenüber den MEF, die mit Überständen von STAT3 exprimierenden Kardiomyozyten stimuliert wurden. Dieses ließ sich sowohl nach vier als auch nach 24 Stunden Stimulationszeit im Proliferationsassay nachweisen. Bei Endothelzellen konnte eine entgegengesetzte Wirkung der Überstände gemessen werden, durch Überstände der Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* wurde das Proliferationsverhalten geringer stimuliert als durch den Wildtyp. (s. Abb. 3.19 b) Sowohl bei P19 Zellen als auch bei Sca-1⁺_{MACS} Zellen konnte kein Unterschied im Einfluss auf Proliferationsverhalten zwischen den Überständen gemessen werden, allerdings zeigte sich in beiden Fällen eine Induktion der Proliferation gegenüber Kontrollzellen, die nur in serumarmem Medium inkubiert wurden. (s. Abb. 3.19 c,d)

3.6.3 Stimulation mit Fraktionen des konditionierten Mediums adulter Kardiomyozyten

Die Zellüberstände wurden durch die Firma Biovision in je 96 Fraktionen aufgetrennt, die im Proliferationsassay mit MEF auf ihre Aktivität getestet wurden.

Um die Differenz im Proliferationsverhalten unter Einfluss der Genotypen zu veranschaulichen und unabhängig von der Wirkung gemeinsamer Faktoren zu betrachten, wurde die Ratio ermittelt, indem die prozentuale Proliferation unter Einfluss der STAT3 *knock out* Kardiomyozyten durch die prozentuale Proliferation unter Einfluss des Wildtyps dividiert wurde. Andernfalls hätten die zum Teil starken Unterschiede der Proliferationsstimulation durch die einzelnen Fraktionen bei der Auswertung störend gewirkt. Bei der Auswahl wurden die Fraktionen berücksichtigt, die eine Ratio über drei zeigten. Außerdem wurden benachbarte Fraktionen in die weiteren Untersuchungen einbezogen. Dabei wurden in den Fraktionen 45 bis 48 und 50 Unterschiede in der Proteinzusammensetzung ausgemacht. (Abb. 3.20) Zusätzlich wurden die Fraktionen, die im DPD auffällig waren, besonders berücksichtigt.

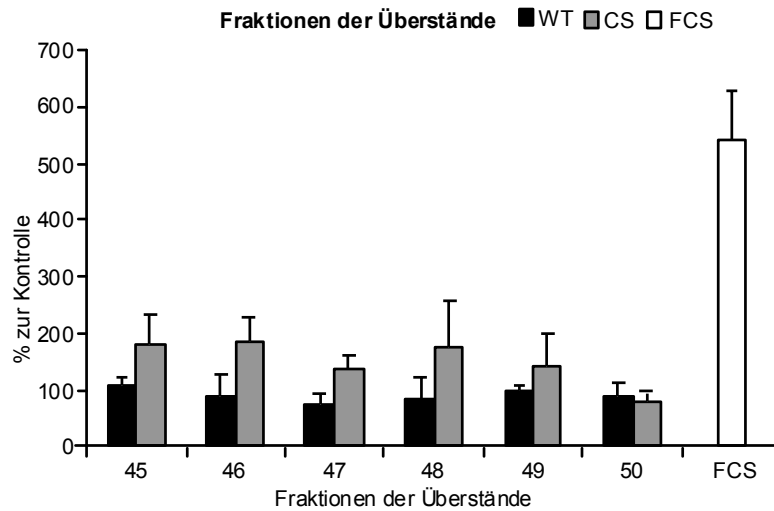


Abb. 3.20: Fraktionen des konditionierten Mediums adulter STAT3 *knock out* Kardiomyozyten, die für die Sequenzierung eingesetzt wurden, zeigten meist proliferationsverstärkende Wirkung gegenüber dem Wildtyp, bei Fraktion 50 war die Wirkung umgekehrt.

Das Proliferationsverhalten der Zellen wurden nach 24 Stunden Stimulation mit Fraktionen der Überstände adulter Kardiomyozyten von α MHC-Cre/STAT3^{fl^{ox}/fl^{ox}} (CS) und Wildtyp (WT) im Assay auf murinen embryonalen Fibroblasten ausgewertet. Die Werte wurden gegen eine unstimulierte Kontrolle abgeglichen. Als Positivkontrolle wurde das zelltypentsprechende Wachstumsmedium mit 10% FCS eingesetzt.

3.6.4 Stimulation mit IL-15 und BMP-3

Es ist bekannt, dass in Herzgewebe von Tieren mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* die Expression von Interleukin 15 und BMP-3 gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (Hilfiker-Kleiner et al. 2004). (s. Kap. 1.9)

Stimulation mit Interleukin-15

Nach 24 Stunden Stimulation mit Interleukin-15 (IL-15) konnten keine signifikanten Veränderungen im Proliferationsverhalten von murinen embryonalen Fibroblasten, P19-Zellen und Sca-1⁺_{MACS} Zellen ermittelt werden (s. Abb. 3.21). Bei MLEC konnte dagegen eine signifikant verminderte Aktivität der Zellen nach Stimulation mit 500 ng/ μ l IL-15 gegenüber der unstimulierten Kontrolle gemessen werden (s. Abb. 3.21 b).

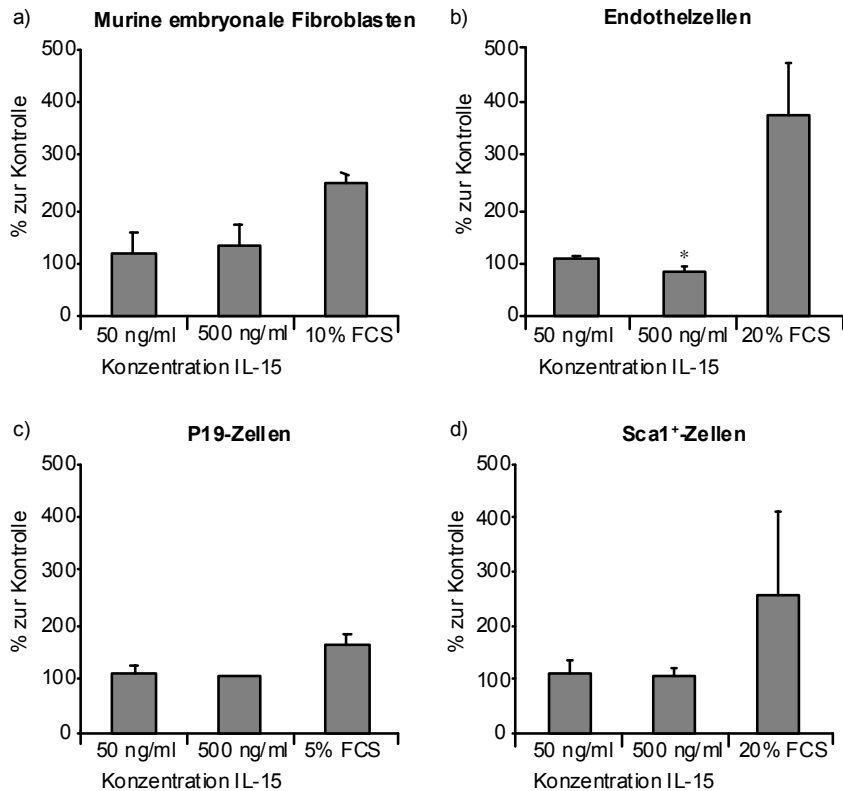


Abb. 3.21: IL-15 Stimulation beeinflusst die Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten, aber nicht von Sca-1 positiven und P19-Zellen

IL-15 führte bei 24 stündiger Stimulation **a)** in Fibroblasten zu einer verstärkten Proliferation im Proliferationsassay gegenüber der unstimulierten Kontrolle, dagegen bewirkt es **b)** bei Endothelzellen eine signifikante Verminderung der Zellzahl. Sowohl **c)** bei P19-Zellen als auch **d)** bei Sca-1 positiven Zellen konnte für die untersuchten Konzentrationen keine Änderung im Proliferationsverhalten festgestellt werden.

Stimulation mit BMP3

Nach 24 Stunden Stimulation mit BMP3 (*bone morphogenetic protein 3*) konnte ein signifikant gesteigertes Proliferationsverhalten der MEF gemessen werden. Nach Gabe von 1000 ng/μl BMP-3 war die Aktivität der Zellen um 37,56% erhöht (s. Abb. 3.22 a). Ebenso war es bei MLEC, die bei Stimulation mit 1000 ng/μl BMP-3 eine signifikante Steigerung des Proliferationsverhaltens zeigten (s. Abb. 3.22 b). P19-Zellen proliferierten nach vierundzwanzigstündiger Stimulation mit 100 ng/μl signifikant verstärkt gegenüber unstimulierten Zellen. Bei Stimulation mit 1000 ng/μl BMP3 proliferierten die Zellen nicht stärker als die unstimulierten Zellen. (s. Abb. 3.22 c) Für die Sca-1⁺_{MACS} Zellen konnte allerdings kein Einfluss von BMP-3 ermittelt werden (s. Abb. 3.22 d).

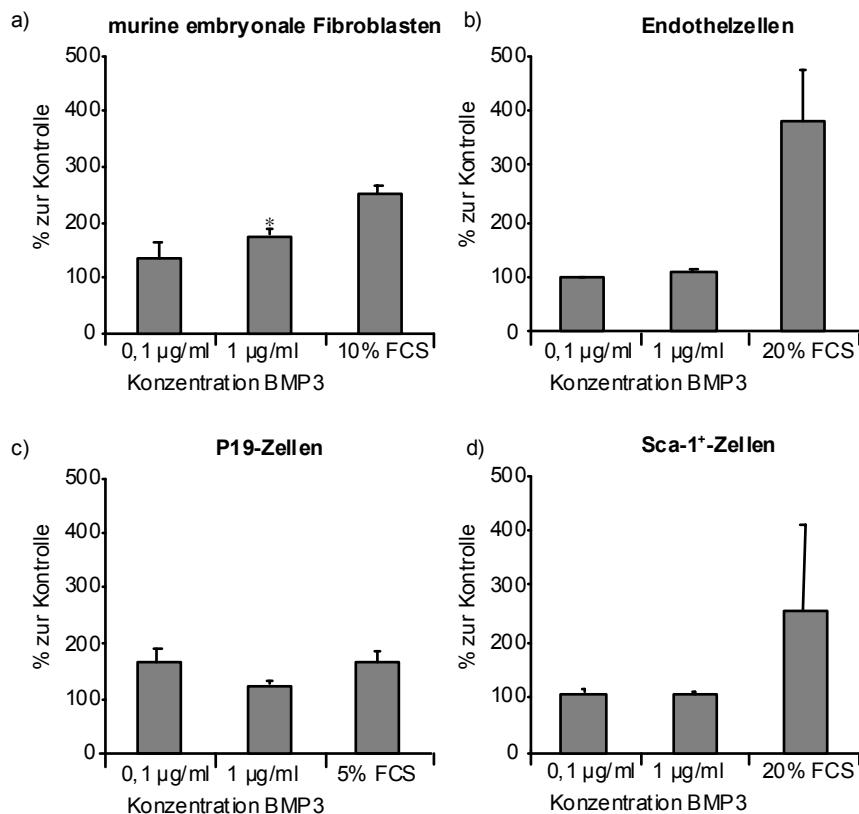


Abb. 3.22: BMP-3 beeinflusst die Proliferation von Fibroblasten und P19-Zellen, aber nicht von Sca-1 positiven und Endothelzellen

BMP-3 bewirkte bei 24 stündiger Stimulation **a)** in Fibroblasten signifikant erhöhte Proliferation im Proliferationsassay gegenüber der unstimulierten Kontrolle, dagegen konnte **b)** bei Endothelzellen kein Unterschied zu Kontrolle festgestellt werden, **c)** bei P19-Zellen führte eine geringere BMP-3 Konzentration zu einer stärkeren Proliferation, während höhere Konzentrationen wiederum zu einer Hemmung führten. **d)** Bei Sca-1 positiven konnte für die untersuchten Konzentrationen keine Änderung im Proliferationsverhalten festgestellt werden.

3.6.5 Sequenzierung der Peptide ausgewählter Fraktionen

Durch Sequenzierung und anschließenden Sequenzvergleich mittels des NCBI-Datenbanksystems konnten artentsprechende Peptide in Überständen identifiziert werden (s. Anhang). Dabei wurden kurze Fragmente von *myosin heavy chain* (α MHC bzw. β MHC), Cytochrom C Oxidase Untereinheit VIA2 (COX6A2), Cytochrom C-Oxidase Untereinheit VIIA1 (COX7A1) und NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 α Subkomplex 4 (Ndufa4) in verschiedenen Fraktionen aufgereinigt. Diese konnten in den entsprechenden Fraktionen der Überstände von Kardiomyozyten mit STAT3

knock out nicht oder in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (s. Tab. 3.2). Sowohl die Sequenz COX6A2, COX7A1 und Ndufa4 lagen bei den *knock out* Tieren nicht vor. Die kurzen Sequenzen des MHC-Gens lagen in Abschnitten unterschiedlicher Länge vor. Diese Sequenzen, die sowohl aus dem Bereich MYH6 als auch MYH7 entstammen können, waren in den Überständen von Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* heraufreguliert. Im Wildtyp konnten solche Sequenzen nicht nachgewiesen werden.

Fraktion	Sequenz	Regulation bei STAT3 <i>knock out</i>	Herkunft
45	RQAEAEQANTNLSKFR	↑	MHC
45	KVQHELDEAEERADIAESQVNK	↑	MHC
46	HNPVHVNPLPTGYEHP	—	COX6A2
47	LENRVAEKQKLF	—	COX7A1
48	SVNVDYSLKKEGPDF	—	Ndufa4
48	KVQHELDEAEERADIAESQVNLRA	↑	MHC
48	KVQHELDEAEERADIAESQVNLRAK	↑	MHC
50	LENRVAEKQKLF	—	COX7A1
50	HNPVHVNPLPTGYEHP	—	COX6A2
50	SVNVDYSLKKEGPDF	—	Ndufa4

Tabelle 3.2: Unterschiede in der Peptidzusammensetzung der Überstände von STAT3-exprimierenden Zellen gegenüber Zellen mit STAT3 *knock out*

Auf Kardiomyozyten gewonnenes konditioniertes Medium wurde durch die Firma Biovision fraktioniert und analysiert. Die Tabelle stellt die Ergebnisse der Sequenzierung geordnet nach der Fraktionsnummer dar. Dabei sind die alle Peptide dargestellt die bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} und Wildtyp unterschiedlich vorlagen. Durch „↑“ ist die Regulation der Peptide gekennzeichnet, die nur bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Tieren vorkamen, nicht aber beim Wildtyp, durch „—“ sind solche Peptide gekennzeichnet, die nur beim Wildtyp gefunden wurden

4 Diskussion

Über die Wirkung parakriner Mechanismen im Myokard ist derzeit nur wenig bekannt. Dies liegt sowohl am großen Umfang dieses Gebietes als auch am technischen Aufwand für die Identifizierung parakriner Faktoren.

Die Untersuchung parakriner Mechanismen im Myokard stellt uns vor die Frage, welche Zellen durch diese beeinflusst werden? Welche Eigenschaften bringen die Zellen primär mit? Welche Veränderungen rufen parakrine Faktoren in den Zielzellen hervor? Erst nach Beantwortung dieser Fragen kann man sich der eigentlichen Fragestellung zuwenden, welche von Kardiomyozyten sezernierten Faktoren eine parakrine Wirkung haben.

Die Untersuchung der zellulären Sekretion ist technisch aufwendig, insbesondere wenn sie die Isolierung homogener myokardialer Zellkulturen voraussetzt. Adulte Kardiomyozyten sind nach heutiger Lehrmeinung postmitotische, ausdifferenzierte Zellen. Die Kultivierung adulter Kardiomyozyten erweist sich als problematisch, da adulte Zellen des Myokards sehr empfindlich gegen äußere Einflüsse - wie z.B. Hypoxie, Temperatur- und pH-Änderung - sind. Gerade die Untersuchung dieser Zellen ist interessant, da das adulte Myokard zu einem großen Prozentsatz (ca. 80%) von Kardiomyozyten gebildet wird und man davon ausgehen kann, dass diese Zellen lokal ein hohes parakrines Potential besitzen.

4.1 Zellen des Herzens

Die länglich unregelmäßig geformten Kardiomyozyten neigen zu Eigenkontraktionen. Nach erfolgreicher Isolation setzen sich die Zellen mit Erhalt ihrer Form auf der vorbehandelten Oberfläche von Zellkulturgefäßen ab, was eine Unterbrechung der Eigenkontraktion voraussetzt. Kardiomyozyten in Kultur sind empfindlich gegenüber Erschütterungen des Untergrunds. Nur bei optimaler Kultivierung in optimalem Milieu kann eine Kultivierungszeit von über 90 Stunden erreicht werden (O'Connell et al. 2003; Zhou et al. 2000). Dieses optimale Milieu war allerdings nicht unbedingt vereinbar mit den erforderlichen Bedingungen für die Folgeversuche dieser Arbeit.

Das Protokoll zur Isolation von Kardiomyozyten, um konditioniertes Medium zu gewinnen, ist an eine Veröffentlichung von Tytgat (1994) angelehnt. Es wurde bereits

von M. Fuchs modifiziert und durch die Arbeitsgruppe Wollert erweitert.

Für die notwendigen Bedingungen der Folgeversuche mußte es optimiert werden, da es in dieser Form nicht auf eine Isolierung und Kultivierung größerer Zellzahlen ausgelegt war. Außerdem zeigten die Zellen nur eine mangelnde Adhärenz an der Oberfläche der Zellkulturgefäße, solange sie kontrahierten. Um die Kontraktionsfähigkeit der Zellen zu hemmen, wurde daraufhin ein Calciumchloridgradient eingesetzt. Calciumchlorid führt in hohen Konzentrationen zum Abrunden der Zellen, und damit zu deren funktioneller Veränderung (Wolska et al. 1996). Deshalb musste die optimale Calciumchloridkonzentration durch Titrieren ermittelt werden.

Ein weiteres Problem bestand in der Zusammensetzung des Mediums. ITS ist zwar für die Adhärenz und Erholung der Zellen nach Isolation unerlässlich (O'Connell et al. 2003; Wolska et al. 1996), störte aber die anschließende Untersuchung des konditionierten Mediums. Weitere Besonderheiten zur Medienzusammensetzung, die sich aus den Bedingungen für die Auswertung ergaben, werden später diskutiert (s. Kap. 4.5.2). Unter den gegebenen Bedingungen war die Kultivierung der adulten Kardiomyozyten auf 72 Stunden begrenzt (O'Connell et al. 2003).

Im Gegensatz zu Kardiomyozyten findet sich im Gewebe ein großes Reservoir an proliferativen Endothelzellen und nicht vollständig differenzierten Fibroblasten.

Aus Gewebe isolierte Fibroblasten teilten sich zu langsam und ungleichmäßig für nachfolgende Versuche. Außerdem konnten die Zellen nur in geringer Dichte eingesetzt werden, da sie bei Zellkontakt vollständig ausdifferenzierten und die Teilung einstellten. Daher wurde eine immortalisierte murine embryonale Fibroblasten Zelllinie (MEF) verwendet, die eine gleichmäßige Teilungsrate, allerdings auch spezifische Eigenschaften embryonaler und immortalisierter Zellen zeigte.

Die eingesetzten Endothelzellen wurden aus dem Lungengewebe von Mäusen isoliert. Die adhärennten Zellen zeichnen sich durch gutes Anwachsen auf fibronectinbeschichteten Oberflächen und gleichmäßige Proliferation aus. Sie sind über mehrere Passagen gut in Kultur zu halten. Es wurde auch ein Versuch der Isolation von Endothelzellen aus Herzgewebe gemacht, der sich bei geringer Ausbeute als zu aufwendig erwies. Kommerziell erhältliche murine Endothelzelllinien sind oft gegenüber Primärkulturen verändert (Cavallaro et al. 2000).

Oh et al. (2003) beschrieb die Isolation Sca-1 positiver Zellen aus dem Myokard (Sca-1⁺_{MACS}⁻-Zellen), die CD31 und CD38 exprimieren, aber gleichzeitig c-kit negativ sind. Diese Zellen sind in der Lage, zu Kardiomyozyten zu differenzieren, so dass er sie als kardiomyozytäre Vorläuferzellen definierte. Allerdings sind die Sca-1⁺_{MACS}⁻-Zellen im Myokard nur in geringer Zellzahl vorhanden sind. P19-Zellen der murinen Teratokarzinomzelllinie CL6 zeigen das Potential zu Kardiomyozyten zu differenzieren und werden experimentell als Modell kardialer Vorläuferzellen eingesetzt (Habara-Ohkubo 1996; van der Heyden & Defize 2003). Diese Zellen wurden in Proliferationsversuchen verwendet, da sie als homogene Zellpopulation ein gleichmäßig reproduzierbares Proliferationsverhalten zeigten.

4.2 Untersuchung potentieller Stamm- und Progenitorzellen aus dem Myokard

Da es bisher keine einheitliche Definition für myokardiale Stamm- und Progenitorzellen gibt, ist es bei der Arbeit mit solchen Zellen von besonderer Bedeutung, die jeweils eingesetzten Zellen zu charakterisieren. Die Eigenschaften, die gewebespezifische Progenitorzellen auszeichnen, sind ihr Vorkommen im entsprechenden Gewebe, ihre Fähigkeit zu proliferieren und zu differenzieren.

Die aus Myokard gewonnene Zellpopulation umfasste alle Bestandteile der Präparation, Zellen und Zelltrümmer, die kleiner als 70 µm waren und sich nicht in der ersten Stunde nach Isolation in einer unbeschichteten Zellkulturflasche absetzten (Preplating). Durch spezielle Medien- und Kulturbedingungen wurde aus diesem Zellgemisch eine möglichst homogene Sca-1⁺-Zellpopulation gezogen. Nach einer Kultivierungszeit von drei Tagen, wurde eine Reinheit der Zellpopulation von über 90% erreicht, was den Literaturangaben entspricht (Oh et al. 2003).

Um zu überprüfen, inwieweit diese Zellen die Fähigkeit besitzen, zu Kardiomyozyten zu differenzieren, wurden die isolierten Sca-1⁺_{MACS}⁻-Zellen weiter in Kultur betrachtet.

4.2.1 Das Proliferationspotential der Sca-1⁺_{MACS}⁻-Zellen

Eine wichtige Voraussetzung für weitere Experimente war der Zustand der Sca-1⁺_{MACS}⁻-Zellen nach Isolation, insbesondere die proliferativen Eigenschaften. Stamm-

und Progenitorzellen besitzen die Fähigkeit zu proliferieren. Diese Fähigkeit ermöglicht es ihnen, durch fortlaufende Teilung neue Zellen zu erzeugen, die ausdifferenzieren können. Die isolierten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen waren durch Steigerung der FCS-Konzentration zur Proliferation stimulierbar.

Die optimale Zelldichte, die über FCS-Stimulationskurven und unterschiedliche Kulturbedingungen ermittelt wurde, lag bei 5×10^4 Zellen pro 1 ml 2%-FCS-haltigem Minimalmedium. Die Sca-1⁺_{MACS}-Zellpopulation zeigte ohne FCS keine Stimulierbarkeit, daher wurden grundsätzlich 2% FCS den Kulturen zugesetzt, die keine proliferationsstimulierende Wirkung hatten. Der für die Versuchsbedingungen optimale Proliferationszustand, bei dem die Zellen im messbaren Bereich gleichmäßig proliferierten, wurde nach einer Woche und der zweiten Passagen erreicht.

Sca-1⁺_{MACS}-Suspensionszellen zeigten nur eine geringe Adhärenz, es bildeten sich keine Zellhaufen. Eine fibroblastenfreie reine Population wurde nach einer Woche und nach zwei Passagen der Zellen erreicht. Nach längerer Vorkultivierung nehmen Stimulierbarkeit der Zellproliferation und Differenzierungspotential, z.B. in Kokulturversuchen, ab.

4.2.2 Differenzierung von Sca-1⁺-Zellen in Kokultur mit Kardiomyozyten

In „Monokulturen“ zeigten die Sca-1⁺_{MACS}-Zellen auch bei Langzeitversuchen nur eine geringe Neigung zur Differenzierung. Eine spontane Differenzierung zu adulten Kardiomyozyten konnte in Reinkultur nicht gezeigt werden. Eine Differenzierung ist *in vivo* nur im Zellverband mit Kardiomyozyten sinnvoll. Mögliche Mechanismen, die eine Differenzierung der Zellen im Myokard einleiten können, sind neben mechanischen und elektrischen Reizen parakrine Mechanismen.

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen sollten in Gegenwart adulter, muriner Kardiomyozyten *in vitro* differenzieren. Kultivierung adulter Kardiomyozyten über mehr als 72 Stunden (O'Connell et al. 2003), ohne BDM als Kontraktionshemmer war nicht möglich. BDM hemmt die Mg²⁺-ATPase-Aktivität und wirkt auf die Integrationsrate von Adeninnukleotiden, was Funktion und Differenzierung von Sca-1⁺_{MACS} Zellen beeinflussen könnte (Fryer et al. 1988; Levitskaya et al. 1992).

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen zeigten in Kokultur mit adulten Kardiomyozyten keine Adhärenz oder Zeichen der Differenzierung. Im Beobachtungszeitraum hatten sich alle adulten Kardiomyozyten abgerundet und abgelöst.

Kokultivierung von Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit neonatalen Mauskardiomyozyten führte zu einem besseren Habitus der Kardiomyozyten gegenüber Reinkulturen, was auf eine Wirkung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen zurückzuführen ist.

Nach einer zweiwöchigen Kokultivierung ungefärbter, neonataler Kardiomyozyten und Tamra-gefärbter Sca-1⁺_{MACS}-Zellen wurden die Zellen fixiert und gegen sarcomerisches α -Aktinin, ein kardiomyozytenspezifisches Strukturprotein, immunhistologisch FITC gefärbt. Neben Tamra gefärbten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen und FITC-markierten Kardiomyozyten zeigten einzelne Zellen der Kultur Doppelfärbung.

Da die Möglichkeit der dreidimensionalen Mikroskopie fehlte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um zwei einander überlagernde einfach gefärbte Zellen handelt. Ein Hinweis darauf, dass der Farbstoff Tamra in Kokultur ungefärbte Zellen gefärbt haben könnte, fand sich nicht.

Vermutlich exprimieren Tamra gefärbte Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nach Differenzierung in adulte Kardiomyozyten sarcomerisches Aktinin oder eine Fusion der Kardiomyozyten mit Sca-1⁺_{MACS}-Zellen führt zu doppelt positiven Zellen (Oh et al. 2003).

Auch die Kokultur von murinen Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte eine Zellinteraktion mit positivem Effekt auf den Habitus der Rattenkardiomyozyten durch die Sca-1⁺_{MACS}-Zellen.

In Kokultur Tamra-gefärbter Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten bildeten sich kontrahierende Cluster, in die Tamra-gefärbte Zellen eingebunden waren, die synchron kontrahierten. Diese Daten weisen ebenfalls auf eine Differenzierung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen zu Kardiomyozyten oder eine Fusion mit Rattenkardiomyozyten hin.

Wie wichtig für die Differenzierung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen der Gewebeverband ist (Iijima et al. 2003), zeigte sich bei der Stimulation der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit konditioniertem Medium von adulten murinen Kardiomyozyten und neonatalen Rattenkardiomyozyten, die zu keiner Veränderung der Zellen führte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass bei Kokulturen von Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit Kardiomyozyten die Zell-Zellinteraktion eine große Bedeutung hat. In Kokultur verbesserte sich der Habitus der Kardiomyozyten und verlängerte sich das Überleben *in vitro*. Aus dem Myokard isolierte Sca-1⁺_{MACS}-Zellen haben in direktem

Zellkontakt das Potential in Kardiomyozyten zu differenzieren, was der Stammzelldefinition entspricht (vgl. Kap. 4.2).

Sca-1⁺_{MACS}-Zellen fungieren nicht nur als myokardiale Progenitorzellen, sondern haben einen positiven Einfluss auf das Überleben der Kardiomyozyten.

4.2.3 Charakterisierung der Sca-1⁺-Zellen auf transkriptioneller Ebene

Zur näheren Charakterisierung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen wurden Apoptosemarker und zellspezifische Marker auf transkriptioneller Ebene untersucht.

Der antiapoptotische Faktor Bcl-2, der die Cytochrom C bedingte Apoptose inhibiert, wird JAK/STAT abhängig exprimiert und basal in geringen Mengen produziert (Bhattacharya et al. 2005). Bcl-2 war in den Sca-1⁺_{MACS}-Zellen geringfügig exprimiert, was ein Hinweis auf einen guten Zustand der Zellen nach Isolation ist.

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die von Sca-1⁺_{MACS}-Zellen exprimiert wird, ist ein Marker für vaskuläre Zellen, wurde aber in Kardiomyozyten nachgewiesen (Belligand et al. 1993; Champion et al. 2004; Gyurko et al. 2000). Verunreinigende Endothelzellen, die ein definiertes, sehr reichhaltiges Medium benötigen, gehen unter Kultivierungsbedingungen der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen verloren.

Der endotheliale Wachstumsfaktor VEGF wird von Endothel umgebendem Gewebe produziert, um Angiogenese z.B. nach Infarkt anzuregen (Funamoto et al. 2000). Er wird nicht von Sca-1⁺_{MACS}-Zellen exprimiert.

Die frisch isolierten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen zeigten keine Expression des frühen kardialen Markers GATA4, allerdings waren die kardialen Expressionsfaktoren Mef2C und Nkx2.5 exprimiert. Obwohl Nkx2.5 hauptsächlich eine Rolle bei der Bildung der Herzstruktur spielt, ist es schon zu Beginn der Zelldifferenzierung von Bedeutung, da es die Expression von anderen kardialen Markern beeinflusst, wie z.B. GATA4 und Mef2c (Durocher et al. 1997; Lee et al. 1998; Skerjanc et al. 1998).

Eine Erklärung für die fehlende GATA4-Expression in frisch isolierten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen ist die differenzierungsbedingte Expressionsschwankung von GATA4 in myokardialen Progenitorzellen während der Herzentwicklung. Nach vierwöchiger Kultivierungszeit ohne zusätzliche Stimulanzen exprimierten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen GATA4. Vermutlich befinden sich die Zellen bei Isolation in einem GATA4 armen Stadium und differenzieren während der Kultivierung weiter. Als Ursache für die

schwankende GATA4-Expression kommt der hohe Nkx2.5-Spiegel in Frage, der GATA4-Expression senkt (Riazi et al. 2005).

Die Nkx2.5 und Mef2c Expression der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen weisen auf ein kardiomyozytäres Differenzierungspotential dieser Zelle hin (Skerjanc et al. 1998; Vanpoucke et al. 2004). Durch zunehmende Expression von GATA4 bei Langzeitkultivierung, konnte das Potential dieser Zellen als kardiomyozytäre Progenitorzellen gezeigt werden.

4.2.3.1 Differenzierung der Sca-1⁺-Zellen durch 5-Azacytidin

5-Azacytidin ist als typisches Agens beschrieben, das eine Differenzierung von Progenitorzellen induziert bzw. beschleunigt. 5-Azacytidin (Lodish et al. 2001) ist ein nicht methylierbares Cytidinderivat. Nach Einbau in die DNA proliferierender Zellen bewirkt es eine unspezifische Demethylierung der DNA. Die Expositionszeit der Zellen mit 5-Azacytidin von drei Tagen muss eingehalten werden (Oh et al. 2003), um eine unspezifische Expression verschiedener Gene zu vermeiden, die unter Umständen zur Bildung von Zellen anderer Zellreihen oder undifferenzierter Tumorzelllinien führen können. Während nach 5-Azacytidinbehandlung die Expression von Mef2c und Nkx2.5 in Sca-1⁺_{MACS}-Zellen unverändert gegenüber den Kontrollen war, führte es zu einer signifikanten Steigerung der Expression von GATA4 und sarcomerischem α -Aktinin, als typisch kardiomyozytärem Protein.

Sowohl die Expression von GATA4 als auch die Expression von sarcomerischem α -Aktinin unter 5-Azacytidin-Stimulation weisen auf eine Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten hin (Kuo et al. 1997; Masino et al. 2004; Torella et al. 2004). Wichtiger ist der Nachweis einer Expression von GATA4 in den Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nach vier Wochen Kultivierung ohne weitere Stimulanzen, da die Stimulation mit 5-Azacytidin wegen seiner unspezifischen Wirkung unter Vorbehalten zu betrachten ist.

4.2.3.2 Sca-1⁺-Zellen wirken als myokardiale Progenitorzellen

Somit können wir aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über Vorkommen, Fähigkeit zur Mitose und Differenzierungspotential zusammenfassend sagen, dass die hier betrachtete Sca-1⁺_{MACS}-Population die oben definierten Kriterien für gewebespezifische Progenitorzellen erfüllt.

4.3 Charakterisierung der potentiellen Stamm- und Progenitorzellen

Während Oh et al. (2003) die Stammzellpopulation als CD31 positiv beschreiben, behaupten Pfister et al. (2005), dass CD31 negative und nicht Sca-1⁺CD31⁺ Zellen kardiomyozytäre Vorläuferzellen sind. Die untersuchten Sca-1⁺_{MACS}⁻ Suspensionszellen konnten bezüglich der Oberflächenmarker nicht näher spezifiziert werden, da sie nach ein paar Tagen *in vitro* in einen eigenfluoreszierenden Zustand übergingen, der eine FACS-Messung behinderte. Bei Isolation war die Sca-1⁺CD31⁻ Population gleichzeitig CD38⁻, so dass die untersuchten Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen den von Pfister beschriebenen Sca-1⁺CD31⁻ Zellen entsprachen.

Um auszuschließen, daß es sich um Zellen der endothelialen Linie handelt, wurden sie auf die Expression von flt-1, eNOS und VEGF untersucht. Die Zellen zeigten keinen endothelialen Charakter, da sie den typischen endothelialen Marker VEGF-Rezeptor flt-1 nicht exprimierten. Auch eine Expression von VEGF, das ebenso wie die endotheliale NO-Synthase (eNOS) von Kardiomyozyten gebildet kann, zeigten sie nicht (Jackson et al. 2001; Funamoto et al. 2000; Champion et al. 2004; Orlic et al. 2002). eNOS war bei Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen stärker exprimiert als bei Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen.

Progenitorzellen, die in ihrer Differenzierung festgelegt sind, exprimieren frühe gewebespezifische Marker. Bei kardiomyozytären Vorläuferzellen sind als solche Mef2c, Nkx2.5 und GATA4 beschrieben (Jamali et al. 2001), deren Expression vom Entwicklungsstadium der Zelle abhängt. Der Transkriptionsfaktor Mef2c wird von Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen signifikant geringer exprimiert als in Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen. Nkx2.5 war in Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen und der dreifachnegativen Zellpopulation gegenüber Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Wildtypzellen um ca. 80% vermindert. Eine GATA4-Expression konnte in den beschriebenen Zellpopulationen nicht nachgewiesen werden. Das zeigt an, dass etwaige Progenitorzellen noch nicht zu GATA4 exprimierenden Myoblasten (Jamali et al. 2001; Morin et al. 2000) differenziert sind.

Aber diese Daten weisen auf Progenitoreigenschaften beider Sca-1⁺-Subpopulationen hin, da sie Mef2c und Nkx2.5 exprimieren, sich jedoch in der Expressionsstärke unterscheiden, da die Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen Nkx2.5, die Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Mef2c verstärkt exprimiert. Es kann sich bei beiden Populationen um kardiale Vorläuferzellen handeln, die sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden.

4.4 Auswirkung des kardiomyozytenspezifischen STAT3 knock out auf die Myokardalterung

Um die Bedeutung parakriner Mechanismen im Myokard zu untersuchen, wurde das Modell eines α MHC-Promotor gesteuerten STAT3 *knock outs* gewählt.

STAT3 ist ein essentieller Faktor, sein Fehlen während der Embryonalentwicklung ist letal (Hilfiker-Kleiner et al. 2004). Die Wirkung eines Genverlusts im intra- und interzellulären Stoffwechsel lässt sich bei einem gewebespezifischen *knock out* anhand phänotypischer Merkmale besser auf ihren Ursprung zurückführen und dadurch genauer bestimmen. Männliche Tiere mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) zeigen einen auffälligen Phänotyp. In den ersten Lebensmonaten sind keine phänotypischen Unterschiede zwischen *knock out* und Wildtyp-Tieren zu beobachten. Ab dem sechsten Lebensmonat zeigen die STAT3 *knock out* Tiere Anzeichen einer globalen Herzinsuffizienz. Nach dem 11. spätestens im 13. Lebensmonat sterben die männlichen Mäuse unter dem Bild einer hochgradigen Herzinsuffizienz. Histologisch zeigte sich eine verringerte Kapillarisation und eine erhöhte interstitielle Fibrose (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2004). Die molekularen Grundlagen, die zu diesem Phänotyp führen, sind noch nicht geklärt.

Der beschriebene Phänotyp könnte durch eine verfrühte Alterung des Myokards bedingt sein. Alterung zeichnet sich durch Abnahme der DNA-Reparaturkapazität der Zelle aus, die als letzter Schritt der Ontogenese zum Tode führt. Zunehmende DNA-Schäden können zu verminderter Gewebeerneuerung und Zellverlust durch Zellzyklusunterbrechung und Apoptose führen.

Noch vor wenigen Jahren war es Lehrmeinung, dass das Herz als postmitotisches Organ, über keine Regenerationsmöglichkeiten im Myokard verfüge, also praktisch alt ist. Dieses Dogma ist überholt. Man konnte zeigen, dass die Anwesenheit von Progenitorzellen eine begrenzte Regeneration ermöglicht, dennoch steigt im Alter die Gefahr von Infarkten mit komplikationsreichem Verlauf. Tatsächlich zeigen sich bei Tieren mit myokardialem STAT3 *knock out* phänotypische Anzeichen einer vorgezogenen Alterung mit Fibrose und reduzierter Angiogenese, was sich in schlechterer Prognose nach Infarkt und der Entwicklung einer Herzinsuffizienz äußert (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2004).

4.4.1 Untersuchung der Progenitorzellzahl im Myokard

Bei Untersuchung von Alterungsprozessen sind Progenitorzellen wichtig, ihr Vorkommen im Gewebe macht eine Regeneration möglich. Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺-Progenitorzellen machen 25% der Kardiomyozyten depletierten Fraktion bei Wildtyptieren aus. Bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren konnte eine Minderung der Zellzahl festgestellt werden. Ursächlich können mangelnde Neubildung der Zellen, frühzeitige Differenzierung und Absterben dieser Zellen sein. Dieses kann und soll im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Aber die reduzierte Progenitorzellzahl kann sowohl eine Ursache als auch eine Folge der Alterung sein. Liegen zu wenig Progenitorzellen im Myokard vor, ist das Gewebe nicht mehr in der Lage sich zu regenerieren. Andererseits kann die Alterung des Herzens zu einer Alterung der Stammzellen führen, so dass weniger Stammzellen für den Erhalt des Gewebes verfügbar sind (Capogrossi 2004; Morrison et al. 1996; Sudo et al. 2000).

4.4.2 Untersuchung der Alterung auf Protein- und Nukleinsäureebene

Als Alterungsmarker werden Proteine bezeichnet, die im Gewebe alterungsabhängig exprimiert werden und Hinweise auf die Alterung des Gewebes liefern. Zur Untersuchung der Marker auf Proteinebene wurde Herzen von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren und Wildtyptieren im Alter von 3 Monaten, 6 Monaten und 11-12 Monaten lysiert.

Chimenti et al. (2003) beschreiben, dass kardiale Alterung und Herzinsuffizienz mit Zelltod von primitiven Zellen und Kardiomyozyten assoziiert sind. Daher ist eine Aussage über die Menge an myokardialen Transkriptionsfaktoren, wie Mef2c, Nkx2.5 und GATA4 von essentieller Bedeutung für die Alterung des Herzgewebes (Pashmforoush et al. 2004). Die Proteinexpression von GATA4 und Nkx2.5 im Lysat blieb unabhängig vom Genotyp und Alter konstant. Dagegen ging die nachweisbare Menge an Mef2c mit zunehmendem Alter zurück. Bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} war Mef2c gegenüber dem Wildtyp vermindert. Dieses deutet auf eine vorgezogene Alterung des Herzgewebes, durch verminderte Differenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten hin.

Zellzyklusmarker geben Auskunft über mitotische Aktivität der Zellen. p21^{Cip1/Waf1} und p16^{Ink4a} regulieren zyklinabhängige Kinasen (CDKs). Der CDK-Inhibitor p21^{Cip1/Waf1} ist notwendig für einen ungestörten G₁-G₂-Übergang am G₁-Zellzykluskontrollpunkt. Fehlen und Überexpression von p21^{Cip1/Waf1} konnte führen zu Apoptose und Alterung (Chang et al. 1999; Fang et al. 1999; Kagawa et al. 1997; Vigneron et al. 2005). Der Zellzyklusregulator p21^{Cip1/Waf1} konnte in den untersuchten Proben nicht nachgewiesen werden. Niedrige Konzentrationen an p21^{Cip1/Waf1} sind ein Zeichen für transiente Inhibition (Torella et al. 2004). Der Zellzyklusregulator p16^{Ink4a}, ein Mitglied des p16^{Ink4a} /pRB-Signalweg, verhindert einen G₀-G₁-Übergang und ist assoziiert mit Telomerverkürzung (Brookes et al. 2002; Hara et al. 1996; Sinibaldi et al. 2000). Der Zellzyklusregulator p16^{Ink4a} wurde alterungsspezifisch, aber nicht genotypabhängig unterschiedlich reguliert, so dass auch hier kein Nachweis für eine STAT3 *knock out* bedingte vorgezogene Alterung gefunden werden konnte.

Der Tumorsuppressor p53 bewirkt eine Unterbrechung des Zellzyklus in G₁ und G₂/M Stadium und gilt als Alterungsmarker, der bei Überexpression zu Apoptose führt und assoziiert ist mit Telomerverkürzung (Kim et al. 2002; Sussman et al. 2004).

Alterungsabhängig wird p53 heraufreguliert. Bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Tieren ist die Bandenintensität ungefähr doppelt so stark wie beim Wildtyp. Bei einjährigen Tieren konnte aber weniger p53 als beim Wildtyp detektiert werden. Eine Erhöhung der Konzentration des Alterungsmarkers p53 deutet auf eine vorgezogene Alterung der jungen STAT3 *knock out* Tiere hin.

Torella et al. (2004) beschrieben p53, p21^{Cip1/Waf1}, p16^{Ink4a} als Alterungsmarker. Deutlich wird, dass p53 in den jungen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren verändert ist. Die Ergebnisse zeigen auch, dass sich die veränderten Verhältnisse vermutlich nicht auf p16^{Ink4a} und p21^{Cip1/Waf1} auswirken.

4.4.3 Veränderung der Expression der Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen und Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen unter dem Einfluss von STAT3

Um weitere Hinweise auf den Einfluss des kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* auf myokardiale Stammzellen des Herzens in einem frühen Stadium zu finden, wurden Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ und Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen aus drei Monate alten Tieren mittels FACS isoliert und auf die Expression von Alterungsmarkern auf transkriptioneller Ebene untersucht. Da beide Zelltypen als Progenitorzellen in Frage

kommen, werden beide in ihrer Reaktion auf den STAT3 *knock out* betrachtet. Bei drei Monate alten Tieren sind noch wenig sekundäre Einflüsse z.B. durch Fibrose zu erwarten.

Veränderungen in der Expression von Mef2c, Nkx2.5 und GATA4 bei kardiomyozytären Vorläuferzellen zeigen mögliche Ursachen für den veränderten Phänotyp der Kardiomyozyten, die sich aus solchen Zellen differenzieren, und für eine verstärkte Alterung und eine verminderte Regeneration des Myokards.

Die Expression des Transkriptionsfaktors Mef2c ist in Zellen aus STAT3 *knock out* Myokard erhöht. Ein umgekehrtes Verhältnis im Gesamtherzlysat ist durch die unterschiedliche Progenitorzahl im Myokard der Tierstämme zu erklären. Außerdem werden die Ergebnisse aus dem Lysat durch Kardiomyozyten gesteuert, die einen weitaus größeren Anteil im Herzvolumen ausmachen, als die Stammzellen.

Nkx2.5 war am stärksten bei Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen des Wildtyp exprimiert. Bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Zellen und Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen war die Expression demgegenüber um über 80% vermindert.

Eine Expression von GATA4, die eine Differenzierung in das Myoblastenstadium voraussetzt, konnte weder beim Wildtyp- noch bei STAT3 *knock out* Gewebe in den beschriebenen Zellpopulationen festgestellt werden (Jamali et al. 2001; Grépin et al. 1997).

Die Expression von Mef2c und Nkx2.5 war durch den kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* beeinflusst. Da die Zellen, noch keine Cre-Rekombinase exprimieren, wie man aus der GATA4 Expression schließen kann, können sie keine STAT3 *knock out* Zellen sein (Molkentin, 2000). Die veränderte Expression weist auf den Einfluss der Kardiomyozyten auf die Entwicklung möglicher Progenitorzellen hin. In Zellen aus Wildtypmyokard war eNOS stärker exprimiert als bei Zellen aus α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Gewebe. Dennoch zeigen die Zellen keinen endothelialen Charakter, denn VEGF und flt-1 wurden nicht exprimiert.

Marker für Apoptose und zyklische Aktivität zeigen an, in welchem Zustand sich Zellen befinden. Bei Stammzellen sollte ein hohes Proliferationspotential vorliegen und eine geringe Apoptoseneigung, aber Stammzellen können sich auch vorübergehend in einer arretierten Phase befinden.

Die Expression des antiapoptotischen Bcl-2 und des proapoptotischen BNip-3 (Zhang et al. 2003) wurde nicht durch den kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock*

out beeinflusst. Der Unterschied an SPC in α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Herzen und Wildtypherzen ist nicht auf Apoptose dieser Zellen zurückzuführen.

Um festzustellen, ob es einen Unterschied in der Zellzyklusaktivität der Zellen unterschiedlicher Herkunft gab, wurde der Zellzyklusmarker CyclinD untersucht.

Bei Untersuchung der Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen auf Expression dieses Markers zeigte sich, dass die Expression in Zellen aus α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Herzen signifikant verringert war. Dies zeigt, dass Wildtypzellen über ein höheres Proliferationspotential verfügen, aber weniger Differenzierungsbereitschaft zeigen, da eine hohe CyclinD Expression die Differenzierung hemmt (Lodish et al. 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* beschleunigte Alterungserscheinungen des Herzgewebes auftreten. Eine Folge des *knock outs* ist unter anderem eine erhöhte Fibrose, eine verminderte Kapillardichte (Hilfiker-Kleiner et al. 2004) und eine Verminderung der Zahl potentieller kardiomyozytärer Vorläuferzellen. Der beschriebene Phänotyp setzt durch den kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* veränderte Bedingungen für kardiale Zellen, die selbst keine STAT3 *knock out* Zellen sind, da sie keine Cre-Rekombinase exprimieren. Die Ursache für das veränderte Bild solcher Zellen, muss daher in Veränderungen parakriner Signale der Kardiomyozyten zu suchen sein.

		Sca-1 ⁺ _{MACS}	Wildtyp		MHC-Cre/STAT3 ^{flox/flox}	
			+ / + / +	+ / - / -	+ / + / +	+ / - / -
Endothelzellen	VEGF	-	-	-	-	-
	eNOS	*	***	*	**	*
	flt-1	-	-	-	-	-
Kardiomyozyten	GATA4	-	-	-	-	-
	Mef2c	*	*	**	*	***
	Nkx2.5	*	***	**	*	**
Zellzyklus und Apoptose	Cyclin D	/	**	/	*	/
	BNIP-3	-	-	-	-	-
	Bcl-2	*	-	-	-	-

*** verstärkt
 * exprimiert
 - nicht nachweisbar
 / nicht untersucht

+ / + / + Sca1⁺CD31⁺CD38⁺
 + / - / - Sca1⁻CD31⁻CD38⁻

Tabelle 4.1: Das Expressionsmuster der Sca1⁺CD31⁺CD38⁺ und Sca1⁺CD31⁻CD38⁻ unter Berücksichtigung des Genotyps

4.5 parakrine Mechanismen

Die parakrine Bedeutung von Kardiomyozyten ist weitgehend unbekannt. Potentielle Kandidatenproteine für die Zellkommunikation müssen bestimmte Anforderungen an parakrine Faktoren erfüllen: Ein parakriner Faktor sollte extrazellulär zu finden sein und auf andere Zellen stimulierend wirken. Am Modell des α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} sollen parakrine Faktoren ermittelt werden. Dieses Modell zeigt verstärkte Fibrose, verminderte Angiogenese und ein verändertes Expressionsmuster der Subpopulationen der Sca-1⁺-Zellen gegenüber dem Wildtyp.

Es wird verschiedenerseits die Möglichkeit diskutiert, dass die Cre-Rekombinase aus der Ursprungszelle diffundiert, in andere Zellen gelangt und dort einen *knock out* verursacht. Der Beweis, dass der *knock out* nur die Zellen betrifft, die α MHC exprimieren, wurde mit Hilfe von Reporter genen in verschiedenen Geweben und *in vitro* geführt (Agah et al. 1997).

Man kann also davon ausgehen, dass dieser Phänotyp eine Folge veränderter parakriner Bedingungen ist. Deshalb wird vorausgesetzt, dass parakrin wirkende Faktoren im Medium von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Zellen gegenüber dem Wildtyp verändert vorliegen.

4.5.1 Wirkung von Zytokinen kardialen Ursprungs

Zur Untersuchung parakriner Mechanismen können Faktoren auf ihre Wirkung an Zellkulturen getestet werden, wenn die Kandidaten bereits bekannt sind. Mit DPD (*differential peptide display*) und Stimulationsversuchen können unbekannte parakrine Faktoren in Seren und Überstände identifiziert werden.

Die Zytokine Interleukin 15 (IL-15) und BMP-3 (*bone morphogenetic protein 3*) werden von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Kardiomyozyten verstärkt exprimiert (Hilfiker-Kleiner et al. 2004). Sie wurden in ihrer Wirkung auf nicht kardiomyozytäre Zellen nach 24 Stunden in einem Proliferationsassay betrachtet. Murine embryonale Fibroblasten (MEF), P19-Zellen und Sca-1⁺_{MACS}-Zellen zeigten nach Stimulation mit Interleukin-15 keine signifikante Veränderung im Proliferationsverhalten. Dagegen konnte bei murinen Endothelzellen der Lunge (MLEC) eine signifikant verminderte proliferative Aktivität der Zellen nach Stimulation gemessen werden. IL-15, das verstärkt in α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Herzgewebe exprimiert wird, hat direkten

Einfluss auf das Verhalten der Endothelzellen und kann die verminderte Kapillardichte in α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Herzen erklären.

BMP-3, welches ebenfalls verstärkt bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Herzgewebe exprimiert wurde, induzierte bei Fibroblasten, Endothelzellen und P19-Zellen ein gesteigertes Proliferationsverhalten, aber nicht bei Sca-1⁺_{MACS}-Zellen. Die Reaktion der Fibroblasten auf Stimulation mit BMP-3 erklärt, warum α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere eine erhöhte Fibroseneigung mit zunehmendem Alter und nach Myokardinfarkt zeigen (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2004).

Diese Daten unterstützen frühere Untersuchungen (Hilfiker-Kleiner et al. 2004). Es zeigt allerdings auch, dass eine parallele Ausschüttung teilweise entgegengesetzt wirkender Faktoren die finale Wirkung hervorruft.

4.5.2 Untersuchung konditionierten Mediums

Als zweite Methode zur Eingrenzung relevanter parakriner Faktoren wurden, Zellüberstände direkt untersucht. Die Gewinnung des konditionierten Mediums ist artifiziell, da adulte Kardiomyozyten aus ihrem üblichen Zellverband gelöst und zwölf Stunden in serumfreiem Medium unter Verzicht auf bestimmte essentielle Salze kultiviert wurden. Dieses Vorgehen war aufgrund der weiteren Methodik notwendig, da das gewählte Medium in Vorversuchen im Massenspektrometer wenig Artefakte gezeigt hatte. Unterschiedliche zugesetzte Salze, FCS und ITS hatten die Auswertung des Tests behindert. Diese nicht physiologischen Bedingungen setzten die Zellen Stress aus, der dazu führte, dass die Zellen verstärkt verschiedene autokrine und parakrine Signalstoffe in die Umgebung abgaben. Parakrine Botenstoffe, die die Kardiomyozyten *in vitro* sezernierten, wurden mit dem Medium abgenommen. Unter Stimulation mit diesem unaufgereinigten konditionierten Medium von STAT3 *knock out* Kardiomyozyten versus Überständen von Wildtypkardiomyozyten wurde eine gesteigerte Proliferation bei Fibroblasten und eine verminderte Proliferation bei Endothelzellen induziert.

Aufgrund der Aufreinigung und Auftrennung des konditionierten Mediums war mit einer Schwächung des Signals zu rechnen. Da das Signal der verstärkten Proliferation der Fibroblasten deutlicher war als die verminderte Proliferation bei Endothelzellen, wurden für die weiteren Untersuchungen murine embryonale Fibroblasten eingesetzt.

Das konditionierte Medium wurde zur besseren Differenzierung und Identifizierung einzelner Faktoren chromatographisch in 96 Einzelfraktionen zerlegt. Einzelne Fraktionen der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere führten bei Fibroblasten zu verstärkter Proliferation, was die Ursache für die verstärkte Fibrose sein kann (Jacoby et al. 2003; Hilfiker-Kleiner et al. 2003).

4.5.3 Proteinsequenzierung einzelner Fraktionen

Für die Proteinsequenzierung wurden die Fraktionen nach zwei Kriterien ausgewählt. Sie zeigten eine auffällige Wirkung in Stimulationsversuchen mit genotypabhängig starkem Wirkungsunterschied. Fraktionen, die benachbart zu anderen stimulierenden Fraktionen lagen, wurden besonders berücksichtigt, da die gesuchten Peptide selten in einer Fraktion eluieren, sondern eher auf mehrere Fraktionen verteilt sind.

Außerdem wurden solche Fraktionen ausgewählt, bei denen ein starker Unterschied zwischen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} und Wildtyp im DPD gemessen werden konnte.

Im Proliferationsassay, der auf MEF durchgeführt wurde, war der Wirkungsunterschied der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Fraktionen gegenüber dem Wildtyp meist gering. Nur in wenigen Fraktionen war ein deutlicher Unterschied festzustellen. In diesen Fällen, war die Proliferation der MEF durch Zugabe der Überständen von STAT3 *knock out* Kardiomyozyten meist verstärkt.

Besonders geeignet für die Peptidsequenzanalyse waren nach den gegebenen Kriterien die Fraktionen 45-48 und 50. Die Fraktionen 45-48 bewirkten bei den Fibroblasten eine verstärkte Proliferation unter der Wirkung der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Kardiomyozyten gegenüber dem Wildtyp. Dabei zeigten die Zellen, die durch die Wildtypfraktionen 46 und 47 stimuliert waren, eine verminderte Proliferation gegenüber den unstimulierten Zellen der Negativkontrolle. Die Fraktion 50 wurde ebenfalls untersucht, da hier der Wildtyp eine stärkere Proliferation induzierte als α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}. Die Peptidsequenzanalyse wurde für die Fraktionen 45-48 und 50 vorgenommen. In den verschiedenen Fraktionen konnten in unterschiedlicher Zusammensetzung Abschnitte der folgenden Proteine identifiziert werden: *myosin heavy chain* (MHC), Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit VIA2 (COX6A2), Cytochrom-C-Oxidase Untereinheit VIIA1 (COX7A1) und NADH-Dehydrogenase (Ubiquinone) 1 α 4 (Ndufa4).

Sowohl MHC als auch Ndufa4 haben eine proliferationsstimulierende Wirkung, wie sich an den Fraktionen 45, 48 und 50 zeigt, während sich die Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase proliferationshemmend auf MEF gegenüber der Negativkontrolle auswirken. Dies kann man vor allem in der Wirkung der Fraktion 46 und 47 aus den Wildtypüberständen erkennen, die nur COX6 (Fraktion 46) bzw. COX7 (Fraktion 47) enthalten und die Proliferation von MEFs geringer induzierten als die entsprechenden Fraktionen, die aus konditioniertem Medium der *STAT3 knock out* Kardiomyozyten gewonnen wurden.

Betrachtet man die stimulierenden Fraktionen der Überstände der *STAT3 knock out* Kardiomyozyten, so findet man dort im Gegensatz zu den entsprechenden Fraktionen der Wildtypüberstände Abschnitte von MHC-Peptiden. Alle diese Sequenzen stammen aus einem Abschnitt des MHC-Gens, der sehr konserviert ist und bei verschiedenen Tierarten (z.B. bei der Maus) sowohl im Gen MyH6, das für α MHC codiert, als auch im Gen MyH7, das für β MHC codiert, vorkommt.

Einige im konditionierten Medium des Wildtyps identifizierte Peptitabschnitte kamen in den identischen Fraktionen von *STAT3 knock out* nicht vor (COX6A2, COX7A1 und Ndufa4). Diese Faktoren sind Bestandteile der Elektronentransportkette der Mitochondrien. Die Fragmente entstammen Cox6 und Cox7, kleinen Untereinheiten des Cytochrom-C-Oxidase Komplexes, deren genaue Funktion noch nicht geklärt ist. Allerdings sind sie für die Komplexbildung der Cytochrom-C-Oxidase notwendig. Im Gegensatz zu den drei großen Untereinheiten Cox1, Cox2, und Cox3 sind die kleinen Untereinheiten nicht mitochondrialen Ursprungs. Die Gene der kleinen Untereinheiten sind im Nukleus lokalisiert, Cox6 auf Chromosom 6 der Maus und Cox7 auf Chromosom 7. Die Proteinsynthese erfolgt im Zytoplasma vor dem Transport in die Mitochondrien. Über eine *STAT3*-Abhängigkeit dieser Faktoren ist bisher nichts bekannt (Wan et al. 1995).

Ndufa4 ist eine wenig bekannte Untereinheit der NADH-Dehydrogenase α , Ubiquinon (Melo et al. 2004). Das Gen ist wie Cox6 auf dem Chromosom 6 lokalisiert. Die Bedeutung der Untereinheit für die Funktion der NADH-Dehydrogenase ist unklar.

Von keinem der Proteine ist bisher bekannt, dass es sezerniert wird. Neben einem aktiven bzw. passiven Transport der Peptide aus den Zellen können sie bei Zerstörung der Zellstruktur herausgetreten sein. Jedoch wurde durch eine parallele Versuchsanordnung versucht, sekundäre Einflüsse gering zu halten.

Die Untersuchung im Proliferationsassay lieferte Hinweise darauf, dass die Fragmente von Cox6A2 und Cox7A1 hemmend auf die Proliferation der Fibroblasten wirken, während Ndufa4 die Proliferation zu stimulieren schien.

In Fraktionen der STAT3 *knock out* Kardiomyozyten, die proliferationsstimulierend auf Fibroblasten wirkten, konnten MHC-Fragmente nachgewiesen werden. Dieses kann die Ursache der vermehrten Fibrose im α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Myokard sein.

4.5.4 Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs für die α MHC-Expression

Eine direkte Abhängigkeit der α MHC-Expression von STAT3 ist bisher nicht bekannt, eine indirekte Wirkung ist wahrscheinlich. Die beiden Gene der MHC, MyH6 (α MHC) und MyH7 (β MHC), liegen auf Chromosom 14 mit 4,5 kb Abstand hintereinander als Tandem geschaltet. Beide stimmen bis auf das β MHC-Exon 13 überein. Demzufolge können die sequenzierten Peptide ebenso Fragmente von β MHC sein. Die β MHC-Expression wird aber durch gp130 Aktivierung induziert und durch STAT3-Überexpression heraufreguliert (Ancy et al. 2003; Kunisada et al. 2000). Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich bei MHC-Peptidsequenzen, die von STAT3 *knock out* Kardiomyozyten ausgeschüttet wurden, um α MHC-Fragmente handelt. Hier könnte jedoch ein Mechanismus liegen, der zur vermehrten α MHC Expression und ihren oben genannten Folgen führt (Gulick et al. 1991; Subramaniam et al. 1991).

Bei verminderter β MHC-Expression liegt vermehrt α MHC vor. Die β MHC-Expression wird durch STAT3 heraufreguliert. Bei STAT3 *knock out* wird das Gleichgewicht zwischen α MHC und β MHC, das durch einen *gene switch* aufrechterhalten wird, gestört. Es muss ein Übergewicht an α MHC in der Zelle vorliegen, welches eine Zunahme von α MHC im Überstand zur Folge hat. Das heißt, in Folge eines STAT3 *knock out* wird die β MHC-Expression reduziert, so dass der andere Tandempartner, α MHC, vermehrt exprimiert wird (Haddad et al. 2003; Omura et al. 2000).

Für die Sekretion der α MHC-Fragmente, die als Auslöser für die Fibroblastenproliferation in Betracht kommt, kann es verschiedene Ursachen geben:

Die Expression von α MHC könnte durch die JAK/STAT-Signalkaskade gesteuert werden. Für eine Hemmung der α MHC-Expression durch STAT3 gibt es aber bisher keine Anhaltspunkte. Ein Zusammenhang zwischen den Transkriptionsfaktoren, die in der Promotorregion von α MHC binden, und dem STAT3 Signalweg konnte bisher nicht gefunden werden.

Viele kardiale Gene werden STAT3 abhängig exprimiert. Von GATA4, einem Transkriptionsfaktor des MyH6-Promotors, ist beschrieben, dass er mit STAT1 bzw. STAT3 den ANF-Promotor bedient (Wang et al. 2005). Die Autoren zeigen weitere kardiale und nicht kardiale Gene auf, die neben einer GATA4 Promotorbindungsstellen über STAT1/STAT3-Bindungsstellen verfügen. Die Verbindung weiterer Transkriptionsfaktoren des α MHC-Promotors kann zu STAT3 hergestellt werden (Kataoka et al. 2003; Winter & Arnold, 2000).

In einigen *knock out* Tieren z.B. GATA4 α MHC-Cre/loxP (Zeisberg et al. 2005), in denen ebenfalls der *knock out* über das α MHC-Cre/loxP System gesteuert wurde, konnte ein ähnlicher Phänotyp gezeigt werden, wie er in diesem Fall für STAT3 beschrieben wurde. Auch die GATA4 *knock out* Tiere zeigten Erscheinungen, die auf vorzeitige Alterung schließen ließen. Im Gegensatz zu *Ckmm*-Cre gesteuerten *knock out* starben Mäuse mit einem α MHC-Cre gesteuerten *knock out* des gleichen Gens bereits binnen der ersten drei Monate (Li et al. 2000). Allerdings wurden bei all diesen Tieren Gene ausgeschaltet, die essentiell sind und eine entsprechende Erscheinungsform zeigen müssen.

In einer Studie fanden Carniel et al. (2005) heraus, dass Mutationen im β MHC-Gen zu Hypertrophie und dilatativer Kardiomyopathie führen können und in Fällen humaner Herzinsuffizienz eine Niederregulation der α MHC mRNA und des Proteins korreliert mit systolischer Dysfunktion korreliert. Mit Hilfe weiterer Beispiele aus unterschiedlichen Studien lässt sich aufzeigen, dass beim Menschen Veränderungen im α MHC Gen zu verschiedenen Herzerkrankungen führen (Ching et al. 2005). Dieses konnte auch bei der Maus gezeigt werden (Gao et al. 1999). Mäuse, bei denen Arginin 403 durch Glutamin heterozygot ersetzt war, überlebten nur ein Jahr (Geisterfer-Lowrance et al. 1996). Falls ein *knock in* mit α MHC-Mutation an dem Phänotyp beteiligt ist, wird er vermutlich nur eine signalverstärkende Funktion haben, denn dieser Phänotyp ist bei reinen α MHC-Cre Tieren nicht beschrieben.

4.5.5 α MHC als parakriner Faktor

Zu Beginn dieses Abschnitts wurden Kriterien für parakrine Faktoren aufgestellt. Ein parakriner Faktor soll außerhalb der Zelle vorliegen und auf andere Zellen stimulierend wirken. Außerdem soll der parakrin wirkende Faktor durch den STAT3 *knock out* beeinflusst sein.

Die potentiellen parakrinen Faktoren wurden in den Fraktionen 45-48 und 50 des konditionierten Mediums gefunden. Die beschriebenen Peptide, die nach Sequenzierung aus den Fraktionen identifiziert wurden, zeichnen sich durch genotypabhängige unterschiedliche Konzentrationen in den Fraktionen aus. Dabei konnten die Peptidabschnitte von COX6A2, COX7A1 und Ndufa4 nur in Überständen der Wildtypkardiomyozyten gefunden werden, während MHC-Abschnitte nur bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Kardiomyozyten identifiziert wurden.

Die stimulierende Wirkung von α MHC ersichtlich durch Steigerung der Proliferation von Fibroblasten, erklärt die verstärkte Fibrose der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Mäuse.

Unter Berücksichtigung all dieser Faktoren kann α MHC als parakrin wirkender Faktor für den Habitus von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren identifiziert werden.

Die Wirkung von α MHC, das bei Zelluntergang verstärkt in den Extrazellularraum gelangt, ist als pathophysiologischer Mechanismus interessant, weil es ein Hinweis auf Entstehung des Narbengewebes nach Myokardinfarkt oder bei dilatativer Kardiomyopathie durch Fibroblastenproliferation nach Zelluntergang bietet.

4.6 Abschließende Betrachtung

Parakrine Mechanismen im Myokard sind ein bisher wenig erforschtes Gebiet. Dennoch liegt eine hohe Bedeutung parakriner Mechanismen in diesem engen Zellverband für physiologische Abläufe und pathophysiologische Mechanismen nahe. Parakrine Mechanismen wirken zwischen verschiedenen Zellsystemen des Herzens. Eine bedeutende Zellpopulation bilden die Kardiomyozyten, darüber hinaus spielen Endothelzellen und Fibroblasten in der Entwicklung und Funktion des Herzens eine große Rolle. Eine Zellpopulation, die in ihrer Bedeutung bisher unterschätzt ist, sind Progenitorzellen. Von verschiedenen Forschergruppen werden unterschiedliche Zellen propagiert. Aufgrund der Ergebnisse zeigt sich in dieser Arbeit und Arbeiten anderer Forschungsgruppen, dass Sca-1 positive Zellen, die aus Myokard isoliert wurden, das Potential haben in Kardiomyozyten zu differenzieren. Unter Betrachtung des Expressionsmusters spricht vieles für die myokardialen Progenitoreigenschaften von Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻ Zellen und Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺ Zellen. Die Sca-1⁺-Zellpopulation zeigt Eigenschaften die man von Progenitorzellen erwartet: Ortsbezogenheit, Potential zur Differenzierung und Zellzyklusaktivität. Diese

Progenitorzellen haben eine protektive Wirkung auf Kardiomyozyten. Unter Einfluss von Kardiomyozyten differenzieren Sca-1⁺-Zellen zu Kardiomyozyten. Zur weiteren Untersuchung parakriner Mechanismen wurde das Modell des kardiomyozytenspezifischen STAT3 *knock out* (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) eingesetzt.

Es zeigte sich, dass ein kardiomyozytenspezifischer STAT3 *knock out* eine Wirkung auf potentielle Stamm- und Progenitorzellen, sowie auf Endothelzellen und Fibroblasten hat. Dieses zeigte sich in einer durch Alterung hervorgerufenen Veränderung des Herzgewebes von Tieren mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out*.

Analysen der von adulten Kardiomyozyten sezernierten Faktoren zeigten, dass einige dieser Faktoren nur bei Kardiomyozyten mit STAT3 *knock out* sezerniert werden. Andere wiederum sind in Überständen von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox} Kardiomyozyten nicht nachzuweisen, obwohl sie vom Wildtyp sezerniert werden. Besonders auffällig war, dass adulte Kardiomyozyten unter Einfluss des STAT3 *knock out* kurze Fragmente des α MHC-Proteins sezernieren, obwohl es sich hierbei um ein intrazelluläres Strukturprotein der Kardiomyozyten handelt. Die Fraktionen, in denen α MHC in den Überständen nachgewiesen werden konnte, verursachten eine verstärkte Proliferation der Fibroblasten.

Da α MHC und das STAT3-abhängig exprimierte β MHC sich in einem *gene switch* befinden, können wir davon ausgehen, dass durch den STAT3 *knock out* das Gleichgewicht zwischen diesen Proteinen gestört und in Folge dessen vermehrt α MHC produziert wird. Diese in den Extrazellularraum gelangten Proteine können anschließend eine verstärkte Fibroblastenproliferation auslösen.

Die eingangs gestellte Frage, ob es parakrine Signalstoffe gibt, die die Funktion und Regeneration des Herzens beeinflussen, kann eindeutig mit ja beantwortet werden.

4.7 Zusammenfassung

Die parakrine Bedeutung adulter Kardiomyozyten ist bisher wenig untersucht worden, obwohl diese Zellen 80% des Herzgewebes ausmachen. Dies mag an den Schwierigkeiten bei Kultivierung und Untersuchung liegen. Bei einem Mausmodell mit kardiomyozytenspezifischem STAT3 *knock out* (α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}) sollten parakrine Ursachen eines durch vorgezogene Alterung geprägten Phänotyps untersucht werden. Die α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere zeigten mit zunehmendem Alter eine erhöhte Fibrose, verminderte Kappillarisation gegenüber dem Wildtyp und starben innerhalb eines Jahres an Herzinsuffizienz (Jacoby et al., 2003; Hilfiker-Kleiner et al., 2004).

Für *in vitro* Untersuchungen wurden adulte Kardiomyozyten, murine embryonale Fibroblasten (MEF) und murine Lungenendothelzellen (MLEC) kultiviert. Des Weiteren sollte die Bedeutung potentieller, myokardialer Progenitorzellen untersucht werden. Neben der bereits bekannten Teratokarzinomzelllinie P19PCL6, wurden Sca-1 positive myokardiale Zellen (Sca-1⁺_{MACS}-Zellen) etabliert und charakterisiert. Die Isolierung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen erfolgte anhand eines Protokolls von Oh (2003), der diese Zellen als c-kit negative kardiale Stammzellen beschrieb.

Da es bisher keine einheitliche Definition der myokardialen Progenitorzellen gibt, war es notwendig, die eingesetzten Zellen zu charakterisieren. Die Eigenschaften, die die gewebespezifischen Progenitorzellen auszeichneten, waren ihr Vorkommen im Myokard, ihre Fähigkeit zu proliferieren und zu differenzieren.

Die optimalen Kultivierungsbedingungen und das Proliferationspotential der Zellen wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays festgestellt. Der molekulare Hintergrund der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen wies auf ihr Potential als kardiale Vorläuferzellen hin. Sie exprimieren die kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und Mef2c, aber nicht GATA4. Dabei zeigen sie kein endotheliales Expressionsmuster. Dieses auszuschließen war wichtig, da endotheliale Zellen vereinzelt die Expression von Sca-1 zeigen. Bei Langzeitversuchen zeigen die Zellen nach 4 Wochen eine Expression des kardialen Transkriptionsfaktors GATA4. Dieses zeigt deutlich ihr Potential selbstständig myokardial zu differenzieren. Unter Einfluß von 5-Azacytidin, das nach einer Stimulationszeit von drei Tagen die myokardiale Differenzierung verschiedener Stammzellen fördert (Oh et al., 2003), konnte bei Sca-1⁺_{MACS}-Zellen anhand der verstärkten Expression von α -Aktinin und GATA4 die myokardiale Differenzierung nachgewiesen werden. Die Exponierung der Zellen mit 5-Azacytidin ist ein sehr artifizielles System, da der Einbau von 5-Azacytidin in die DNA eine unspezifische Demethylierung verschiedener Gene fördert.

In vivo erscheint nur eine Differenzierung der Zellen im Myokard sinnvoll. Daher wurde eine Kultivierung der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit Kardiomyozyten und auf Kardiomyozyten präkonditioniertem Medium vorgenommen. Unter dem Einfluß der

Überstände von adulten murinen Kardiomyozyten und neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigten die Zellen keine Differenzierung. Die zunächst besonders physiologisch erscheinende Kokultivierung gefärbter Sca-1⁺_{MACS}-Zellen mit adulten murinen Kardiomyozyten, scheiterte an den Kulturbedingungen. Sekundäre Einflüsse sollten minimiert werden, aber eine maximale Kultivierungszeit adulter Kardiomyozyten von 72 Stunden ließ ein Absetzen der Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nicht zu. Die Differenzierung der Zellen konnte dagegen bei einer Kokultivierung mit neonatalen Mauskardiomyozyten und neonatalen Rattenkardiomyozyten beobachtet werden. Es konnte sowohl α -Aktinin bei kokultivierten Sca-1⁺_{MACS}-Zellen nachgewiesen werden, als auch im Cluster kontrahierende Sca-1⁺_{MACS}-Zellen. Somit können wir aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse über Vorkommen, Fähigkeit zur Mitose und Differenzierungspotential zusammenfassend sagen, dass die hier betrachtete Sca-1⁺_{MACS}-Population die oben definierten Kriterien für gewebespezifische Progenitorzellen erfüllt.

Eine Charakterisierung der Progenitorzellen innerhalb der Sca-1⁺_{MACS}-Population als CD31⁺CD38⁺-Zellen oder CD31⁻CD38⁻-Zellen, wie sie von Oh (2003) bzw. Pfister (2005) vorgenommen wurde, konnte nicht bestätigt werden, doch das Expressionsmuster der Zellen deutet darauf hin, dass es sich bei beiden Populationen um kardiale Progenitorzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien handelt, da sie sich in der Expression von Mef2c und Nkx2.5 unterschieden.

Hinter dem Phänotyp der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere wurde Gewebeeralterung vermutet. Abnahme der DNA-Reparaturkapazität der Zelle führt durch Unterbrechung des Zellzyklus und Apoptose zu Gewebeeruntergang. Merkmale für Alterung sind verminderte Geweberegeneration durch Verlust an proliferativen Zellen, Zunahme an Apoptose und Unterbrechung des Zellzyklus als Folge von DNA-Schäden.

Es konnte mittels FACS-Analyse eine leichte Verminderung der Progenitorzellzahl bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

Außerdem zeigte sich, dass sowohl Sca-1⁺CD31⁺CD38⁺-Zellen als auch Sca-1⁺CD31⁻CD38⁻-Zellen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere ein verändertes Expressionsmuster vs. Wildtyp aufwiesen. Die CyclinD-Expression war bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere vermindert, und die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren verändert, Nkx2.5 war bei Wildtyp stärker exprimiert im Gegensatz zu Mef2c, das bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren verstärkt exprimiert wurde. Trotz einer veränderten Zellzyklusaktivität konnten bei allen Zellen keine Apoptosemarker nachgewiesen werden.

Proteine des Myokards wurden von Tieren unterschiedlichen Alters gewonnen. Die Untersuchung kardialer Transkriptionsfaktoren zeigte einen deutlich verminderten Mef2c-Gehalt bei α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren. Anhand des Tumorsuppressorproteins p53 wurde eine vorgezogene Alterung der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere deutlich. Die anderen Faktoren zeigten keine Unterschiede zwischen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren und Wildtyp auf.

Der Phänotyp der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere zeigt einen Einfluß des auf die Kardiomyozyten begrenzten STAT3 *knock out* auf nichtkardiale Zellen. Diese Ergebnisse deuten auf parakrinen Mechanismen. So wurden zunächst die myokardialexprimierten Cytokine IL-15 und BMP-3 untersucht. IL-15 verursachte bei MLEC eine verminderte Proliferation und BMP-3 steigerte die Proliferation bei MEF. Beide Faktoren werden von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren verstärkt exprimiert. (Hilfiker-Kleiner et al., 2004)

Präkonditioniertes Medium muriner adulter α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Kardiomyozyten steigerte im Gegensatz zu Wildtypkardiomyozytenüberständen das Proliferationsverhalten von MEF und hemmte die Proliferation von MLEC. Eine Wirkung auf P19- und Sca-1⁺_{MACS}-Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Die Wirkung der Überstände verdeutlichte den Ursprung des Phänotyps der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tiere in der Wirkung myokardialer parakriner Faktoren. Fraktionen der Überstände, in denen aufgrund ihrer proliferationsstimulierenden Wirkung auf MEF die parakrinen Faktoren vermutet wurden, und die auch einen massenspektrometrisch im *differential peptide display* (DPD) erfaßten Unterschied zwischen α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Tieren und Wildtyp gezeigt hatten, wurden durch Peptidsequenzierung analysiert. Dabei konnten in MEF-Proliferation hemmenden Fraktionen des Wildtyps Fragmente der Cytochrom C-Oxidaseuntereinheiten CoxVIA2 und CoxVIIA1 identifiziert werden. In Fraktionen der Wildtypüberstände, die die MEF-Proliferation steigerten, konnten Peptidfragmente des NADH-Dyhydrogenase 1 α Subkomplex 4 identifiziert werden. In Fraktionen der α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Kardiomyozytenüberstände, die eine proliferationssteigernde Wirkung auf MEF hatten, konnte *myosin heavy chain* (MHC-) Fragmente nachgewiesen werden, die sich nicht in präkonditioniertem Medium der Wildtypkardiomyozyten fanden. Dieser MHC Abschnitt entstammt einem sehr konservierten Abschnitt des Proteins. Aufgrund der Expressionsbedingungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Abschnitte des α MHC-Proteins handelt, denn die β MHC-Expression ist abhängig vom Transkriptionsfaktor STAT3, der in diesen Zellen ausgeschaltet ist.

α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Myokard zeigte mit zunehmendem Alter und nach Infarkt eine verstärkte Fibrose gegenüber dem Wildtyp, wie Jacoby (2003) und Hilfiker-Kleiner (2004) zeigen konnten. α MHC wurde als parakrin wirkender Faktor identifiziert, der ursächlich auf die verstärkte Fibrose von α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}-Myokard wirkt.

5 Literatur

- Agah, R., Frenkel, P.A., French, B.A., Michael, L.H., Overbeek, P.A., and Schneider, M.D.: Gene recombination in postmitotic cells, *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 169-179
- Alonzi T., Maritano, D., Gorgoni, B., Rizzuto, G., Libert, C., and Poli, V.: Essential role of STAT3 in the control of the acute phase response as revealed by inducible gene activation in the liver, *Mol Cell Biol.*, 2001, 21(5), 1621-1632
- Ancey, C., Menet, E., Corbi, P., Fredj, S., Garcia, M., Rucker-Martin, C., Bescond, J., Morel, F., Wijdenes, J., Lecron, J.C., and Potreau, D.: Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation, *Card Res.*, 2003, 59, 78-85
- Anversa, P., and Nadal-Ginard, B.: Myocyte renewal and ventricular remodelling, *Nature*, 2002, 415, 240-243
- Anversa, P., Palackal, T., Sonnenblick, E.H., Olivatti, G., Meggs, L.G., and Capossa, J.M: Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart, *Circ Res.*, 1990, 67, 871-885
- Balligand, J.-C., Kelly, R.A., Marsden, P.A., Smith, T.W., and Michel, T.: Control of cardiac muscle cell function by endogenous nitric oxide signalling system, *PNAS.*, 1993, 90, 347-351
- Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L. and Robbins, R.C.: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischemic myocardium, *Nature*, 2004, 428, 668-673
- Beltrami, A.P., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S.-M., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., Silvestri, F., Leri, A., Beltrami, A. and Anversa, P.: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction, *N Engl J Med*, 2001, 344 (23), 1750-1757
- Bhattacharya, S., Ray, R.M., and Johnson, L.R.: STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-2 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells, *Biochem J.*, 2005, 392(2), 335-344
- Borlak, J., Thum, T.: PBCs alter gene expression of nuclear transcription factors and other heart-specific genes in cultures of primary cardiomyocytes: possible implications for cardiotoxicity, *Xenobiotica.*, 2002, 32, 1173-1183
- Brookes, S., Rowe, J., Ruas, M., Llanos, S., Clark, P.A., Lomax, M., James, M.C., Vatcheva, R., Bates, S., Vousden, K.H., Parry, D., Gruis, N., Smit, N., Bergman, W., and Peters, G.: INK4a-deficient human diploid fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence, *EMBO J.*, 2002, 21(12), 2936-2945
- Bruneau, B.G.: Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis, *Circ Res.*, 2002, 90, 509-519
- Capogrossi, M.C.: Cardiac stem cells fail with aging - A new mechanism for the age-dependent decline in cardiac function, *Circ Res.*, 2004, 94, 411-413
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A. Harpel, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A.: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature*, 1996, 380, 435-439
- Carniel, E., Taylor, M.R.G., Sinagra, G., Di Lenarda, A., Ku, L., Fain, P.R., Boucek, M.M., Cavanaugh, J., Miocic, S., Slavov, D., Graw, S.L., Feiger, J., Zhu, X.Z., Dao, D., Ferguson, D.A., Bristow, M.R., and Mestroni, L.: α -myosin heavy chain: A sarcomeric gene associated with dilated and hypertrophic phenotypes of cardiomyopathy, *Circ.*, 2005, 112, 54-59
- Cavallaro, U., Castelli, V., Perilli, A., Dossi, R., Giavazzi, R., Pepper, M.S., Soria, M.R., and Montesano, R.: Characterization of novel clonal murine endothelial cell lines with an extended life span, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 2000, 36(5), 299-308
- Champion, H.C., Georgakopoulos, D., Takimoto, E., Isoda, T., Wang, Y., and Kass, D.A.: Modulation of in vivo cardiac function by myocyte-specific nitric oxide synthase-3, *Circ. Res.*, 2004, 94, 657-663
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B.: Role of p53 and

Literatur

- p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs, *Oncogene*, 1999, 18(34), 4808-4818
- Chimenti, C., Kajstura, J., Torella, D., Urbanek, K., Heleniak, H., Colussi, C., Di Meglio, F., Nadal-Ginard, B., Frustaci, A., Leri, A., Maseri, A., and Anversa, P.: Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure, *Circ Res.*, 2003, 93, 604-613
- Ching Y.-H., Ghosh, T.K., Cross, S.J., Packham, E.A., Honeyman, L., Loughna, S., Robinson, T.E., Dearlove, A.M., Ribas, G., Bonser, A.J., Thomas, N.R., Scotter, A.J., Caves, L.S.D., Tyrrell, G.P., Newbury-Ecob, R.A., Munnich, A., Bonnet, D., and Brook, J.D.: Mutation in myosin heavy chain 6 causes atrial septal defect, *Nat Genet.*, 2005, 37(4), 423-428
- Dai, W., Hale, S.L., Martin, B.J., Kuang, J.-Q., Dow, J.S., Wold, L.E., and Kloner, R.A.: Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: Short- and long-term effects, *Circ.*, 2005, 112, 214-223
- D'Amico, M., Wu, K., Fu, M., Rao, M., Albanese, C., Russell, R.G., Lian, H., Bregman, D., White, M.A., and Pestell, R.G.: The inhibitor of Cyclin-dependent kinase 4a/alternative reading frame (Ink4a/ARF) locus encoded proteins p16^{Ink4a} and p19^{ARF} repress cyclin D1 transcription through distinct cis elements, *Canc Res.*, 2004, 64, 4122-4130
- Délot, E.C., Bahamonde, M.E., Zhao, M., and Lyons, K.M.: BMP signaling is required for septation of the outflow tract of the mammalian heart, *Development*, 2002, 130, 209-220
- Durocher D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R.J., and Nemer, M.: The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors, *EMBO J.*, 1997, 16(18), 5687-5696
- Estes, B.T., Gimble, J.M., and Guilak, F.: Mechanical signals as regulators of stem cell fate, *Curr Top Dev Biol.*, 2004, 60, 91-126
- Fang, L., Igarashi, M., Leung, J., Sugrue, M.M., Lee, S.W., and Aaronson, S.A.: p21Waf1/Cip1/Sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53, *Oncogene*, 1999, 18(18), 2789-2797
- Fredj, S., Bescond, J., Louault, C. and Potreau, D.: Interactions between cardiac cells enhance cardiomyocyte hypertrophy and increase fibroblast proliferation, *J.Cell.Physiol.*, 2005, 202, 891-899
- Fryer, M.W., Neering, I.R., and Stephenson, D.G.: Effects of 2,3-Butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibers, *J Physiol.*, 1988, 407, 53-75
- Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Osugi, T., Hirota, H., Izumi, M., Yoshizaki, K., Walsh, K., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K.: Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glykoprotein130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes, *JBC*, 2000, 275(14), 10561-10566
- Gao, W.D., Perez, N.G., Seidman, C.E., Seidman, J.G., and Marban, E.: Altered cardiac excitation-contraction coupling in mutant mice with familial hypertrophic cardiomyopathy, *J Clin Invest.*, 1999, 103(5), 661-666
- Geisterfer-Lowrance, A.A., Christe, M., Conner, D.A., Ingwall, J.S., Schoen, F.J., Seidman, C.E., and Seidman, J.G.: A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy, *Science*, 1996, 272, 731-734
- Giron-Michel, J., Caignard, A., Fogli, M., Brouty-Bouyé, D., Briard, D., van Dijk, M., Meazza, R., Ferrini, S., Lebousse-Kerdilès, C., Clay, D., Bompais, H., Chouaib, S., Péault, B., and Azzarone, B.: Differential STAT3, STAT5, and NF κ B activation in human hematopoietic progenitors by endogenous interleukin-15: implications in the expression of functional molecules, *Blood*, 2003, 102, 109-117
- Grépin, C., Nemer, G., and Nemer, M.: Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor, *Development*, 1997, 124, 2387-2395
- Gulick, J., Subramaniam, A., Neumann, J., and Robbins, J.: Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes, *JBC.*, 1991, 266(14), 9180-9185
- Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M.C., and Huang, P.L.: Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP, *J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2000, 278, H971-H981
- Habara-Ohkubo, A.: Differentiation of beating cardiac muscle cells from derivative of P19 embryonal carcinoma cells, *Cell Struct Funct.*, 1996, 21, 11-110

Literatur

- Haddad, F., Bodell, P.W., Qin, A.X., Giger, J.M., and Baldwin, K.M.: Role of antisense RNS in coordinating cardiac myosin heavy chain gene switching, *JBC.*, 2003, 278(39), 37132-37138
- Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G.: Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implication for cell immortalization and senescence, *Mol Cell Biol.*, 1996, 16(3), 859-867
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Müller-Newen, G. and Schaper, F.: Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem. J.*, 2003, 374, 1-20
- Heng, B.C., Haider, H.K., Sim, E.K.-W., Cao, T., and Ng, S.C.: Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro, *Card. Res.*, 2004, 62, 34-42
- Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., Schaefer, A., Schieffer, B., Hillmer, A., Schmiedl, A., Ding, Z., Podewski, E., Podewski, E., Poli, V., Schneider, M.D., Schulz, R., Park, J.-K., Wollert, K.C., and Drexler, H.: Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix desposition, and heart protection from ischemic injury, *Circ Res.*, 2004, 95, 187-195
- Horvath, C.M., Wen, Z., and Darnell, J.E.Jr.: A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain, *Genes Dev.*, 1995, 9, 984-994
- Iijima, Y., Nagai, T., Mizukami, M., Matsuura, K., Ogura, T., Wada, H., Toko, H., Akazawa, H., Tkan, H., Nakaya, H. and Komuro, I.: Beating is necessary for transdifferentiation of skeletal muscle-derived cells into cardiomyocytes, *The FASEB Journal*, 2003, 17(10), 1361-1363
- Jackson, A.J., Majka, A.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells, *J Clin Invest.*, 2001, 107, 1395-1402
- Jacoby, J.J., Kalinowski, A., Liu, M.-G., Zhang, S. S.-M., Gao, Q., Chai, G.-X., Ji, L., Iwamoto, Y., Li, E., Schneider, M., Russell, K.S., and Fu, X.-Y.: Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age, *PNAS*, 2003, 100(22), 12929-12934
- Jamali, M., Rogerson, P.J., Wilton, S., and Skerjanc, I.S.: Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis, *JBC.*, 2001, 276(45), 42252-42258
- Jost, M.M., Bude, P., Tammen, H., Hess, R., Kellmann, M., Schulte, I., and Rose, H.: The concept of functional peptidomics for the discovery of bioactive peptides in cell culture models, *ComChemHTS.*, 2005, 8(8), 767-773
- Kagawa, S., Fujiwara, T., Hizuta, A., Yasuda, T., Zhang, W.W., Roth, J.A., and Tanaka, N.: p53 expression overcomes p21^{WAF1/CIP1}-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells, *Oncogene*, 1997, 15(16), 1903-1909
- Kajstura, J., Cheng, W., Saragarajan, R., Li, P., Li, B., Nitahara, J.A., Cahpnick, S., Reiss, K., Olivetti, G., and Anversa, P.: Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of fisher 344 rats, *Am J Physiol.*, 1996, 271, H1215-H1228
- Kajstura, J., Rota M., Whang, B., Cascapera, S., Hosoda, T., Bearzi, C., Nurzynska, D., Kasahara, H., Zias, E., Bonafé, M., Nadal-Ginard, B., Torella, D., Nascimbene, A., Quaini, F., Urbanek, K., Leri, A., and Anversa, P.: Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion, *Circ Res.*, 2005, 96, 127-
- Kataoka, Y., Matsumura, I., Ezo, S., Nakata, S., Takigawa, E., Sato, Y., Kawasaki, A., Yokota, T., Nakajima, K., Felsani, A., and Kanakura, Y.: Reciprocal inhibition between MyoD and STAT3 in the regulation of growth and differentiation of myoblasts, *JBC.*, 2003, 45(7), 44178-44187
- Kehat, I., and Gepstein, L.: Human embryonic stem cells for myocardial regeneration, *Heart Failure rev.*, 2003, 8, 229-236
- Kim H., You, S., Farris, J., Kong, B.W., Christman, S.A., Foster, L.K., and Foster, D.N.: Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells, *Exp Cell Res*, 2002, 272(2), 199-208
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Barr, S., Fuchs, M. and Epstein, S.E.: Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms, *Circ Res.*, 2004, 94, 678-685

- Krenz, M., Sanbe, A., Bouyer-Dalloz, F., Gulick, J., Klevitsky, R., Hewett, T.E., Osinska, H.E., Lorenz, J.N., Brosseau, C., Frederico, A., Alpert, N.R., Warshaw, D.M., Perryman, M.B., Helmke, S.M., and Robbins, J.: Analysis of myosin heavy chain functionality in the heart, *J Biol Chem.*, 2003, 278(19), 17466-17474
- Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Yamada, S., Okabe, M., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K.: Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy, *PNAS.*, 2000, 97(1), 315-319
- Kuo, C.T., Morrisey, E.E., Anadappa, R., Sigrist, K., Lu, M.M., Parmacek, M.S., Soudais, C., and Leiden, J.M.: GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation, *Genes Dev.*, 1997, 11(8), 1048-1060
- LeClair, K.P., Palfree, R.G.E., Flood, P., Hammerling, U., and Bothwell, A.: Isolation of a murine Ly-6 cDNA reveals a new multigene family, *EMBO J.*, 1986, 5(12), 3227-3234
- Lee, Y., Shiota, T., Kasahara, H., Jobe, S.M., Wiese, R.J., Markham, B.E., and Izumo, S.: The cardiac tissue-restricted homeobox protein Csx/Nkx2.5 physically associates with the zinc finger protein GATA4 and cooperatively activates strial natriuretic factor gene expression, *Mol Cell Biol.*, 1998, 18(6), 3120-3129
- Leonard, W.J., and O'Shea, J.J.: Jaks and STATs: biological implications, *Annu Rev Immunol.*, 1998, 16, 293-322
- Levy, D.E., and Lee, C.-k.: What does Stat3 do?, *J clin invest.*, 2002, 109(9), 1143-1148
- Levitskaya, E.L., Khatkevich, Veksler, V.I., and V.I.Kapel'ko: Protective effect of 2,3-butanedione monoxime on the myocardial ischemia in rats, *Byulleten'Exp 'noi biol Med.*, 1993, 115(1), 48-49 (original 1992)
- Li, H., Wang, J., Wilhelmsson, H., Hansson, A., Thorén, P., Duffy, J., Rustin, P., and Larsson, N.-G.: Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy, *PNAS*, 2000, 97(7), 3467-3472
- Lodish H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E.: *Molekulare Zellbiologie*, 4. Aufl., - Heidelberg; Berlin: Spektrum Akad. Verl., 2001
- Lovell, M.J., and Mathur, A.: The role of stem cells for treatment of cardiovascular disease, *Cell Prolif.*, 2004, 37, 67-87
- Luna, G., Paez, J., and Cardier, J.E.: Expression of the hematopoietic stem cell antigen Sca-1 (Ly-6A/E) in liver sinusoidal endothelial cells: possible function of Sca-1 in endothelial cells, *Stem Cell Dev.*, 2004, 13(5), 528-535
- Lutgens, E., Daemen, M.J., de Munick, E.D., Debets, J., Leenders, P., and Smits, J.F.: Chronic myocardial infarction in the mouse: cardiac structural and functional changes, *Card Res.*, 1999, 41, 586-593
- Lutz, W., Londowski, J.M., Sanders, M., Salisbury, J., and Kumar, R.: A vasopressin analog that binds but does not activate V1 or V2 vasopressin receptors is not internalized into cells that express V1 or V2 receptors, *J Biol Chem.*, 1992, 267(2), 1109-15
- Masino, A.M., Gallardo, T.D., Wilcox, C.A., Olson, E.N., Williams, R.S. and Garry, D.J.: Transcriptional regulation of cardiac progenitor cell populations, *Circ Res.*, 2004, 95, 389-397.
- Matsuura, K., Nagai, T., Nishigaki, N., Oyama, T., Nishi, J., Wada, H., Sano, M., Toko, H., Akazawa, H., Sato, T., Nakaya, H., Kasanuki, H., and Komuro, I.: Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes, *JBC.*, 2004, 279(12), 11384-11391
- McBurney, M.W., and Rogers, B.J.: Isolation of male murine embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns, *Dev Biol.*, 1982, 89, 503-508
- Melo, A.M.P., Bandejas, T.M., and Teixeira, M.: New insights into type II NAD(P)H:Quinone oxidoreductase, *Micr Mol Biol Rev.*, 2004, 68(4), 603-616
- Molkentin, J.D.: The zinc finger-containing transcription factors GATA4, -5 and -6, *JBC*, 2000, 275(50), 38949-38952

Literatur

- Morin, S., Charron, F., Robitaille, L., and Nemer, M.: GATA-dependent recruitment of MEF-2 proteins to target promoters, *EMBO J.*, 2000, 19, 2046-2055
- Morrison, S.J., Wandycz, A.M., Akashi, K., Globerson, A., and Weissman, I.L.: The aging of hematopoietic stem cells, *Nat.Med.*, 1996, 2, 1011-1016
- Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M. Pasumarthi, K.B.S., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J.D., Williams, D.A. and Field, L.J.: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarction, *Nature*, 2004, 428, 664-668
- Nagy, A.: Cre Recombinase: The universal reagent for genome tailoring, *genesis*, 2000, 26, 99-109
- Nakatsuji, S., Yamate, J., Kuwamura, M., Kotani, T., and Samuka, S.: In vivo responses of macrophages and myofibroblasts in the healing following isoproterenol-induced myocardial injury in rats, *Vichows Arch.*, 1997, 430, 63-69
- Negoro, S., Kunisada, K., Fujio, Y., Funamoto, M., Darville, M.I., Eizirik, D.L., osugi, T., Izumi, M., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Hirota, H., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K.: Activation of Signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase, *Circ.*, 2001, 104, 979-981
- Negoro, S., Kunisada, K., Tone, E., Funamoto, M., Oh, H., Kishimoto, T., and Yamauchi-Takahara, K.: Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction, *Card. Res.*, 2000, 47, 797-805
- Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Säwén, P., Röhl, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., and Jacobsen, S.E.W.: Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation, *Nat Med.*, 2004, 10(5), 494-501
- O'Connell, T.D., Ni, Y.G., Lin, K.-M., Han, H., and Yan, Z.: Isolation and culture of adult cardiac myocytes for signaling studies, *AfCS Research reports*, 2003, 1(5), 1-9
- Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., Entman, M.L., and Schneider, M.D.: Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction, *PNAS*, 2003, 100(21), 12313-12318
- Omura, T., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Hanatani, A., Kim, S., Yoshida, K., Izumi, Y., Iwao, H., and Yoshikawa, J.: Differences in time course of myocardial mRNA expression in non-infarcted myocardium after myocardial infarction, *Basic Res Cardiol.*, 2000, 95, 316-323
- Orlic, D., Hill, J.M. and Arai, A.E.: Stem cells for myocardial regeneration, *Circ Res.*, 2002, 91, 1092-1102
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature*, 2001, 410, 701-705
- Pan, J., Fukuda, K., Saito, M., Matsuzaki, J., Kodama, H., Sano, M., Takahashi, T., Kato, T., and Ogawa, S.: Mechanical stretch activates the JAK7STAT pathway in rat cardiomyocytes *Circ Res.*, 1999, 84, 1127-1136
- Pashmforoush, M., Lu, J.T., Chen, H., St. Armand, T., Kondo, R., Pradervand, S., Evans, S., Clark, B., Feramisco, J.R., Giles, W., Ho, S.Y., Benson, D.W., Silberbach, M., Shou, W., and Chien, K.R.: Nkx2.5 pathways and congenital heart disease: Loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block, *Cell*, 2004, 117, 373-386
- Pfister, O., Mouquet, F., Jain, M., Summer, R., Helmes, M., Fine, A., Colucci, W.S., and Liao, R.: CD31⁻ but not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation, *Circ Res.*, 2005, 97(1), 52-61
- Podewski, E.K., Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Morawietz, H., Lichtenberg, A., Wollert, K.C., and Drexler, H.: Alterations in Janus kinase (JAK)-signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling in patients with end-stage dilated cardiomyopathy, *Circ.*, 2003, 107, 798-802
- Prabhu, S.D.: Cytokine-Induced Modulation of Cardiac Function, *Circ Res.*, 2004, 95, 1040-1153

Literatur

- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A.P., Finato, N., Beltrami, C.A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P.: Chimerism of the transplanted heart, *N Engl J Med.*, 2002, 346(1), 5-15
- Razeghi, P., Young, M.E., Cockrill, T.C., Frazier, O.H., and Taegtmeier, H.: Downregulation of myocardial myocyte enhancer factor 2C and myocyte enhancer 2C-regulated gene expression in diabetic patients with nonischemic heart failure, *Circ.*, 2002, 106, 407-411
- Riazi, A.M., Lee, H., Hsu, C., and van Arsdell, G.: CSX/Nkx2.5 modulates differentiation of skeletal myoblasts and promotes differentiation into neuronal cells in vitro, *JBC.*, 2005, 280(11), 10716-10720
- Satyanarayana, A, and Rudolph, K.L.: p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age, *J Clin Invest.*, 2004, 114(9), 1237-1240
- Sepulveda, J.L., Belaguli, N., Nigam, V., Chen, C.-Y., Nemer, M., and Schwartz, R.J.: GATA-4 and Nkx2.5 coactivate Nkx-2 DNA binding targets: Role for regulating early gene expression, *Mol and Cell Biol.*, 1998, 18(6), 3405-3415
- Shibuya, M., Seetharam, L., Ishii, Y., Sawano, A., Gotoh, N., Matsushime, H., and Yamaguchi, S.: Possible involvement of VEGF-FLT tyrosine kinase receptor system in normal and tumor angiogenesis, Princess Takamatsu Symp., 1994; 24, 162-70
- Simpson, D.A.C., Feeney, S., Boyle, C., and Stitt, A.W.: Retinal VEGF mRNA measured by SYBR Green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR, *Mol Vis.*, 2000, 6, 178-183
- Sinibaldi, D., Wharton, W., Turkson, J., Bowman, T., Pledger, W.J., and Jove, R.: Induction of p21^{WAF1/CIP1} and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling, *Oncogene*, 2000, 19, 5419-5427
- Skerjanc, I.S., Petropoulos, H., Ridgeway, A.G., and Wilton, S.: Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells, *JBC*, 1998, 273(52), 34904-34910
- Stevens, L.C.: The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos, *Dev Biol.*, 1970, 21, 364-382
- Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H.: Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells, *J Exp Med.*, 2000, 192(9), 1273-1280
- Subramaniam, A., Jones, W.K., Gulick, J., Wert, S., Neumann, J., and Robbins, J.: Tissue-specific regulation of the alpha-myosin heavy chain gene promoter in transgenic mice, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 24613-24620
- Sussman, M.A., and Anversa, P.: Myocardial aging and senescence: Where have the stem cells gone?, *Annu. Rev. Physiol.*, 2004, 66, 29-48
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S.: Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality, *Proc Natl Acad Sci.*, 1997 Apr 15; 94(8):3801-3804
- Takizawa, M., Nobuhisa, I., Igarashi, K., Ueno, M., Nakashima, K., Kitamura, T., and Taga, T.: Requirement of gp130 signaling for AGM hematopoiesis, *Exp Hemat.*, 2003, 31, 283-289
- Torella, D., Rota, M., Nurzynska, D., Musso, E., Monsen, A., Shiraiishi, I., Zias, E., Walsh, K., Rosenzweig, A., Sussman, M.A., Urbanek, K., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Anversa, P. and Leri, A.: Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression, *Circ Res.*, 2004, 94, 514-524
- Tytgat, J.: How to isolate cardiac myocytes, *Card. Res.*, 1994, 28, 280-283
- van der Heyden, M.A.G., and Defize, L.H.K.: Twenty one years of P19 cells: what an embryonal carcinoma cell line taught us about cardiomyocyte differentiation, *Card Res.*, 2003, 58, 292-302
- Vanpoucke, G., Goosens, S., De Craene, B., Gilbert, B., van Roy, F., and Berx, G.: GATA-4 and MEF2C transcription factors control the tissue-specific expression of the α T-catenin gene CTNNA3, *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32(14), 4155-4165
- Vigneron, A., Roninson, I.B., Gamelin, E., and Coqueret, O.: Src inhibits Adriamycin-induced senescence and G₂ checkpoint arrest by blocking the induction of p21waf1, *Cancer Res.*, 2005, 65(19), 8927-8935

Literatur

- Wan, B., and Moreadith, R.W.: Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa, *JBC.*, 1995, 270 (44), 26433-26440
- Wang, J., Paradis, P., Aries, A., Komati, H., Lefebvre, C., Wang, H., and Nemer, M.: Convergence of protein kinase C and JAK-STAT signaling on transcription factor GATA-4, *Mol Cell Biol.*, 2005, 25 (22), 9829-9844
- Winter, B., and Arnold, H.-H.: Activated Raf kinase inhibits muscle cell differentiation through a MEF2-dependent mechanism, *J Cell Science*, 2000, 113, 4211-4220
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., and Drexler, H.: Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial, *the lancet*, 2004, 364, 141-148
- Wollert, K.C., and Drexler, H.: Clinical applications of the Stem Cells for the heart, *Circ. Res.*, 2005, 96, 151-163
- Wolska, B.M., and Solaro, R.J.: Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry, *Am.J. Physiol.*, 1996, 271, (*Heart Circ. Physiol.* 40) H1250-H1255
- Wozney, J.M.: Overview of bone morphogenetic proteins, *Spine*, 2002, 27, 2-8
- Xu, X., Sun, Y.-L., and Hoey, T.: Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain, *Science.*, 1996, 273, 794-797
- Zeisberg, E.M., Ma, Q., Jurasek, A.L., Moses, K., Schwartz, R.J., Izumo, S. and Pu, W.T.: Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4, *J Clin Invest*, 2005, 115(6), 1522-1531
- Zhang, H.M., Cheung, P., Yanagawa, B., McManus, B.M., and Yang, D.C.: BNips: A group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family, *Apoptosis*, 2003, 8, 229-236
- Zhou, Y.Y., Wang, S.Q., Zhu, W.Z., Chruscinski, A., Kobilka, B.K., Ziman, B., Wang, S., Lakatta, E.G., Cheng, H., and Xiao, R.P.: Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for cellular genetic physiology, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2000, 279(1), 429-36

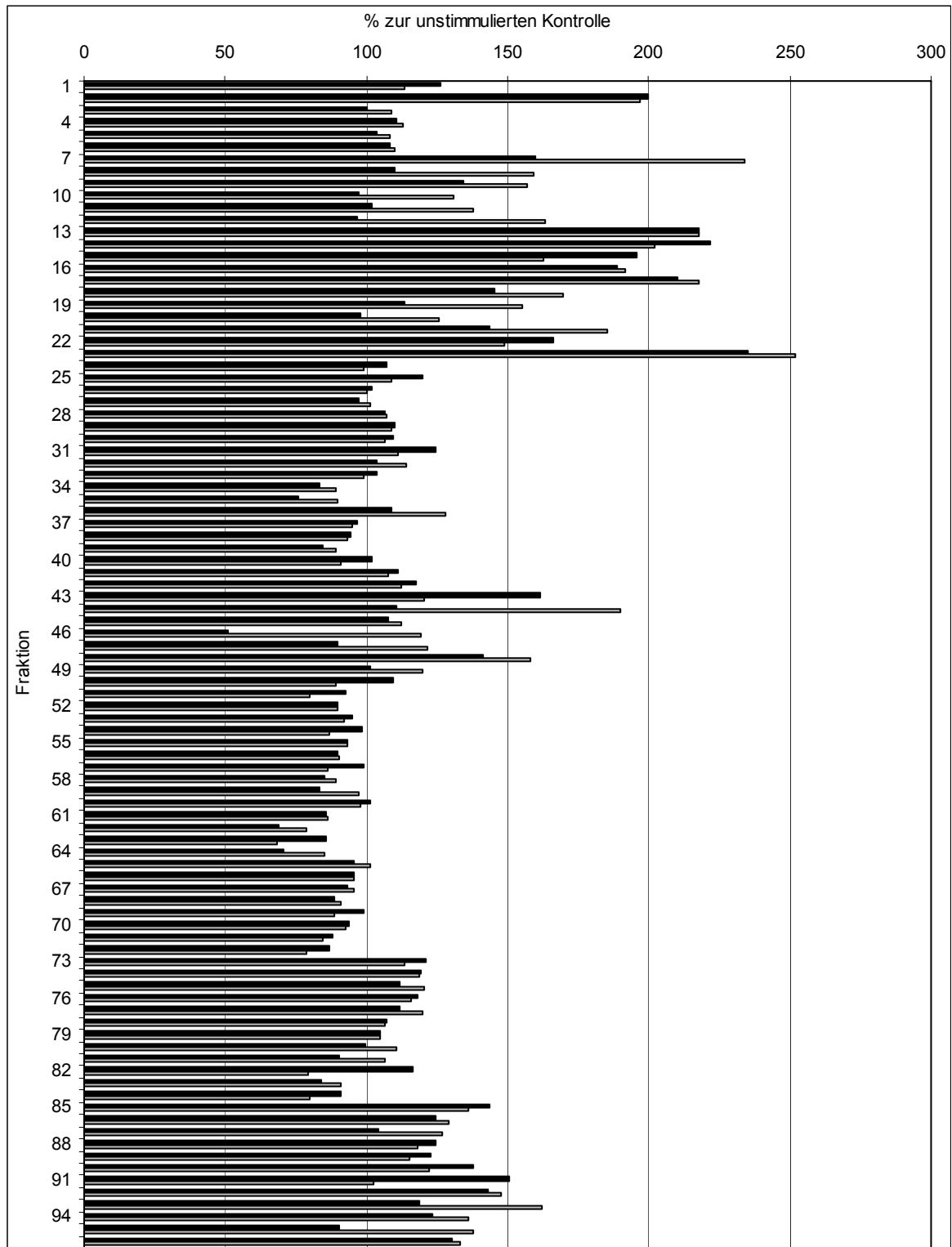
6 Anhang

Ergebnis der Sequenzanalyse des konditionierten Mediums der α MHC-Cre/STAT3^{fox/fox}-Mäuse vs. Wildtyp

AA-Sequenz	Reliability	Regulation	Fraktion	Precursor	AAStart	AAStop	M/Z	Score
RQAEAEAEQANTLSKFR	4	UP	45	MYH6_MESAU	1882	1899	2120,052784	29,09
KVQHELDEAEERADIAESQVNK	4	UP	45	MYH6_MESAU	1900	1921	2537,270724	46,93
HNPVNPLPTGYEHP	2	NONE	46	CX6A2_MOUSE	83	97	1707,814134	71,87
LENRVAEKQKLF	3	NONE	47	CX7A1_MOUSE	22	33	1473,823044	47,65
SVNVDYSKLLKEGPDF	4	NONE	48	Ndufa4_MOUSE	67	82	1824,900924	44,63
KVQHELDEAEERADIAESQVNLRA	4	UP	48	MYH6_MESAU	1900	1924	2877,456724	39,18
KVQHELDEAEERADIAESQVNLRAK	4	UP	48	MYH6_MESAU	1900	1925	3005,551724	44,71
LENRVAEKQKLF	4	NONE	50	CX7A1_MOUSE	22	33	1473,846114	34,21
HNPVNPLPTGYEHP	2	NONE	50	CX6A2_MOUSE	83	97	1707,843794	80,52
SVNVDYSKLLKEGPDF	3	NONE	50	Ndufa4_MOUSE	67	82	1824,917404	61,72

Proliferation muriner embryonaler Fibroblasten unter Einfluss fraktionierter Überstände:

Stimulation durch α MHC-Cre/STAT3^{flox/flox}- (grau) und Wildtypüberstände (schwarz)



Aminosäuresequenzvergleich der identifizierten Peptide

Die identifizierten Peptide wurden über NCBI-Blast identifiziert und den folgenden Proteinen zugeordnet (grau unterlegt, untertrichen die zweite identifizierte Sequenz im MHC-Protein)

Myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha [Mus musculus], αMHC (NP_034986)

```

1  MTDQMADFG AAAQYLRKSE KERLEAQTRP FDIRTECFVP DDKEEYVKAK VVSREGGKVT
61  AETENGKTVT IKEDQVMQON PPKFDKIEDM AMLTFLHEPA VLYNLKERYA AWMIYTYSGL
121 FCVTVNPKYK LPVYNAEVVA AYRGKKRSEA PPHIFSISDN AYQYMLTDRE NQSILITGES
181 GAGKTVNTKR VIQYFASIAA IGDRSKKENP NANKGTLEDQ IIQANPALEA FGNAKTVRND
241 NSSRFGKFIR IHFGATGKLA SADIETYLLS KSRVIFQLKA ERNYHIFYQI LSNKKPELLD
301 MLLVTNPNPYD YAFVSQGEVS VASIDDSEEL LATDSAFDVL SFTAEKAGV YKLTGAIMHY
361 GNMKFKQKQR EEQAEPDGTE DADKSAYLMG LNSADLLKGL CHPRVKVGNV YVTKGQSVQQ
421 VYYSIGALAK SVYEKMFNWM VTRINATLET KQPRQYFIGV LDIAGFEIFD FNSFEQLCIN
481 FTNEKLQQFF NHMFMVLEQE EYKKEGIEWE FIDFGMDLQA CIDLIEKPMG IMSILEEECM
541 FPKASDMTFK AKLYDNHLGK SNNFQKPRNV KGKQEAHFSL VHYAGTVDYN IMGWLEKNKD
601 PLNETVVGLY QKSSLKLMAT LFSTYASADT GDSGKGGKGGK KKGSSFQTVS ALHRENLNKL
661 MTNLKTTTHPH FVRCIIPNER KAPGVMDNPL VMHQLRCNGV LEGIRICRKG FPNRILYGDF
721 RQRYRILNPA AIPEGQFIDS RKGAEKLLGS LDIDHNQYKF GHTKVFFKAG LLGLLEEMRD
781 ERLSRIITRI QAQARGQLMR IEFKKIVERR DALLVIQWNI RAFMGVKNWP WMKLYFKIKP
841 LLKSAETEKE MANMKEEFGR VKDALEKSEA RRKELEEKMV SLLQEKNDLQ LQVQAEQDNL
901 NDAEERCDQL IKNKIQLEAK VKEMTERLED EEEMNAELTA KKRKLEDECS ELKKDIDDLE
961 LTLAKVEKEK HATENKVKNL TEEMAGLDEI IAKLTKEKKA LQEAHQALD DLQAEEDKVN
1021 TLTKSKVKLE QQVDDLEGSL EQEKKVRMDL ERAKRKLEGD LKLTQESIMD LENDKLQLEE
1081 KLKKKEFDIS QQNSKIEDEQ ALALQLQKKL KENQARIEEL EEELEAERTA RAKVEKLRSD
1141 LSRELEEISE RLEEAGGATS VQIEMNKKRE AEFQKMRRDL EEATLQHEAT AAALRKKHAD
1201 SVAELGEQID NLQRVKQKLE KEKSEFKLEL DDVTSNMEQI IKAKANLEKV SRTLEDQANE
1261 YRVKLEEAQR SLNDFTTQRA KLQTEGELA RQLEEKEALI SQLTRGKLSY TQQMEDLKRQ
1321 LEEEGKAKNA LAHALQSSRH DCDLLREQYE EEMEAKAELQ RVLKANSEV AQWRTKYETD
1381 AIQRTEEELE AKKKLAQRLQ DAEEAVEAVN AKCSSEKTK HRLQNEIEDL MVDVERSNA
1441 AAALDKKQRN FDKILAEWKQ KYEESQSELE SSQKEARSLS TELFKLKNAY EESLEHLETF
1501 KRENKNLQEE ISDLTEQLGE GGKNVHELEK IRKQLEVEKL ELQSALEAE ASLEHEEGKI
1561 LRAQLEFNQI KAEIERKLAE KDEEMEQAQR NHLRMVDSLQ TSLDAETRSR NEALRVKKKM
1621 EGDNLNEMIQ LSQANRIASE AQKHLKNSQA HLKDTQLQLD DAVHANDDLK ENIAIVERRN
1681 NLLQAELEEL RAVVEQTTERS RKLAEQELIE TSERVQLLHS QNTSLINQKK KMESDLTQLQ
1741 TEVEEAVQEC RNAEEKAKKA ITDAAMMAEE LKKEQDTSAH LERMKNMEQ TIKDLQHRLD
1801 EAEQIALKGG KKQLQKLEAR VRELENELEA EQKRNAESVK GMRKSERRIK ELTYQTEEDK
1861 KNLMLRLQDLV DKLQLKVKAY KRQAEAEAEQ ANTNLKSKFRK VQHELDEAEE RADIAESQVN
1921 KLRAKSRDIG AKKMHDEE

```

Anhang

Cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2 [Mus musculus], COX6 (AAH28514)

1 MALPLKVLSR SMASAAKGDH GGAGANTWRL LTFVLALPGV AHCSLNCWMH AGHHERPEFI
61 PYHHLRIRTK PFAWGDGNHT LFFHNPHVNPL PTGYEHP

Cytochrome c oxidase, subunit VIIa 1 [Mus musculus], COX7 (AAH60974)

1 MRALRVSQAL VRSFSSSTRS HLENRVAEKQ KLFQADNDLP VHLKGGGMDN VLYRLTMTLT
61 LGGTAYCLYC LGWASFPHKK

NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4 [Mus musculus], Ndufa4 - (NP_035016)

1 MLRQILGQAK KHPSLIPLFV FIGAGGTGAA LYVMRLALFN PDVSWDRKNN PEPWNKLGPN
61 EQYKFYSVNV DYSKLLKEGP DF

Abkürzungen

-/-	Sca-1 ⁻ CD31 ⁻ CD38 ⁻
+/-	Sca-1 ⁺ CD31 ⁻ CD38 ⁻
+/+	Sca-1 ⁺ CD31 ⁺ CD38 ⁺
5-Aza	5-Azacytidin
αMHC-Cre/STAT3 ^{flx/flx}	αMHC-Promotor gesteuerte Cre-Rekombinase / gefloxtes STAT3-Gen
A _{260nm}	Absorbtion bei 260 nm
Abb.	Abbildung
ANF	<i>atrial natriuretic factor</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
bp	Basenpaar
Bcl-2	B-Cell-Leukemia 2 Protein
BDM	2,3-butanedione monoxime
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BMP3	<i>bone morphogenetic protein 3</i>
BNIP3	<i>Bcl-2/adenovirus E1B interacting protein 1</i>
BSA	<i>bovines serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CDK 4/6	Cycline dependent kinase 4/6
<i>Ckmm</i>	<i>Creatin kinase muscle type</i>
COX6A2	Cytochrome-C-Oxidase subunit VIA2
COX7A1	CytochromeC-Oxidase subunit VIIA1
Cre	<i>causes recombination</i>
CS	αMHC-Cre/STAT3 ^{flx/flx}
CT	Cardiotrophin
DAPI	4',6 diamidino-2-phenylidol
DEPC	Dimethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPD	<i>differential peptide display</i>
DTT	Dithiothreitol
ECGS/H	Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>endothelial nitric-oxide synthase</i>)
EPC	endotheliale Progenitorzellen
et al.	et alteri (und andere)
FACS	Fluoreszenz aktivierten <i>Cell sort</i>
FCS	Fetales Kälberserum
flt-1	<i>FMS related tyrosine kinase 1</i>
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase
gp130	Glycoprotein 130

Abkürzungen

h	Stunde
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (Hank's buffered salt solution)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IGF-1	<i>Insulin like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IFN	Interferon
Ink4a	<i>inhibitor of Cyclin-dependent kinase 4a</i>
ITS	<i>insulin transferin sodium selenite</i>
JAK	Janus-Kinase
K ⁻	Negativkontrolle
K ⁺	Positivkontrolle
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
L	Liter
LIF	Leukemia inhibitory factor
loxP	<i>locus of crossing over aus Bacteriophage P1</i>
M	molar
M199	Medium 199
MACS	<i>magnetic activated cell sort</i>
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i>
Mdm	<i>murine double minute 2</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MEF2c	<i>myocyte enhancer factor 2C</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
MLC	<i>myosin lighth chain</i>
MLEC	murine Lungenendothelzellen (<i>murin lung endothelial cells</i>)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyH6	<i>myosin heavy chain gene 6</i>
MyH7	<i>myosin heavy chain gene 7</i>
n	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
Ndufa4	NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) 1α Subkomplex 4
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
p16	Protein 16
p53	Protein 53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRB	Retinoblastoma-Protein
Q-PCR	Realttime quantitative PCR
ROS	<i>reactive oxygene species</i> (reactive Sauerstoffspezies)
RP-HPLC	<i>reversed-phase high performance liquid chromatography</i>

Abkürzungen

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription
α -Aktinin	alpha Aktinin des Sarkomers
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i>
Sca-1 ⁺ _{MACS}	nach Sca-1 im MACS sortierte Zellen einer Kardiomyozyten depletierten Fraktion
Scr	nicht transmembrane Tyrosin-Proteinkinase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SH2	Scr Homology 2
SP-Zellen	Stamm- und Progenitorzellen
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TAMRA	5-(and-6)-carboxytetramethyl-rhodamine succinimidyl ester (5(6)-TAMRA,SE)
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tromethamine [C ₄ H ₁₁ NO ₃]
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
vs.	<i>versus</i>
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewichtsanteil pro Volumen)
xg	(mehrfache) Erdbeschleunigung
α MHC	<i>α myosin heavy chain</i>
α MHC-Cre/STAT3 ^{flox/flox}	α MHC-Promotor gesteuerte Crerekombinase/ in beiden Allelen gefloxtes STAT3

7 Lebenslauf

Dipl. Biol. Eva Christine Podewski

Geburtstag: 21. April 1978, Bielefeld

Schulbildung

1984-1988	Volksschule II in Burgdorf
1988-1992	Orientierungsstufe I in Burgdorf
1992-1997	Gymnasium Burgdorf
Schulabschluß:	Allgemeine Hochschulreife

Studium

Studium	1997-2003 Biologiestudium an der Universität Hannover Diplomarbeit: „Molekulare Mechanismen der T-Zellantigenrezeptor induzierten Signaltransduktion: Proteinkinase-C epsilon als Regulator der Interleukin-2-Synthese“ am Institut für Pharmakologie des Zentrums für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Hochschule Hannover
Abschluss:	2003 mit Abgabe der Diplomarbeit
Promotion	2003-2006 Promotion an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover: „Untersuchung Kardiomyozyten abhängiger parakriner Mechanismen in ihrer Wirkung auf nichtmyozytäre Zellen im Myokard und die Alterung des Herzens: Rolle von STAT3“ in der molekularen Kardiologie, der Abteilung Kardiologie und Angiologie im Zentrum Innere Medizin, Medizinische Hochschule Hannover

Bisherige Publikationen

Hilfiker-Kleiner, D., Hilfiker, A., Fuchs, M., Kaminski, K., Schaefer, A., Schieffer, B., Hillmer, A., Schmiedl, A., Ding, Z., Podewski, E., Podewski, E., Poli, V., Schneider, M.D., Schulz, R., Park, J.-K., Wollert, K.C., and Drexler, H.: Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix desposition, and heart protection from ischemic injury, *Circ Res.*, 2004, 95, 187-195

Klein, G., Schaefer, A., Hilfiker-Kleiner, D., Oppermann, D., Shukla, P., Quint, A., Podewski, E., Hilfiker, A., Schröder, F., Leitges, M., and Drexler, H.: Increased collagen deposition and diastolic dysfunction but preserved myocardial hypertrophy after pressure overload in mice lacking PKC ϵ , *Circ Res.*, 2005, 96, 748-755

Abstracts

Hilfiker-Kleiner, D., Kaminski, K., Hilfiker, A., Michel, K., Podewski, E.C., Völker, M., Park, J.-K., Weitzman, J.B., and Drexler, H.: Lac of JunD reduces ischemic injury and prevents cardiac rupture following myocardial infarction, *Suppl. to Circ.*, 2004, 110(17), 1276

Hilfiker-Kleiner, D., Podewski, E.K., Hilfiker, A., Kaminski, K., Quint, A., Apuya, D., Podewski, E.C., Poli, V.P., Schaefer, A., and Drexler, H.: Prolactin confers cardioprotective effects postpartum via the JAK2-STAT3 signaling pathway, *Suppl. to Circ.*, 2004, 110(17), 30

Hilfiker-Kleiner, D., Schaefer, A., Fuchs, M., Quint, A., Podewski, E.C., Hilfiker, A., and Drexler, H.: Essentielle Rolle von STAT3 für reaktive Hypertrophie nach Myokardischämie, nicht aber für Hypertrophie bei Druckbelastung, *70. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Kardiologie*, 2004, V306

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. W. Müller herzlich für die Übernahme des Referats und für die intensive Betreuung, besonders in der Endphase der Promotion.

Herrn Prof. Dr. H. Drexler und Frau Dr. D. Hilfiker-Kleiner danke ich für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit diese Arbeit in den Räumen der molekularen Kardiologie an der MHH anfertigen zu können.

Ich möchte meiner Schwester Dr. Edith Podewski für ihre tatkräftige Unterstützung und intensive Betreuung nicht nur während meiner Doktorarbeit danken. Ihr und Anja Quint danke ich für die vielen wissenschaftlichen Dispute bei Tee und Spaghetti, und den Einsatz in der Endphase meiner Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Birgit Brandt und Silvia Gutzke für die Einführung ins Labor und ihre Unterstützung. Danken möchte ich der Arbeitsgruppe Hilfiker für das aufbauende Arbeitsklima und den Dres. Anne und Florian Limbourg für die technischen und inhaltlichen Ratschläge.

Der Arbeitsgruppe Templin danke ich für den intensiven geistigen Austausch über Stammzellen, ihren Einsatz am FACS und die viele Unterstützung. Den Arbeitsgruppen Schieffer und Wollert danke ich für effektiven Austausch von Methoden und Kenntnissen.

Martin Fuchs und Gunnar Klein danke ich vor allem für die Langendorffapparatur.

Für die Durchführung der DPD-Analysen danke ich den Dres. Tammen und Hess der Firma Biovision.

Thomasz und Praful danke ich für die fruchtbare Diskussion und Anregungen.

Anja, Dania, Daniel, Diana, Malte, Praful, Tanja und Thomasz danke ich für die schöne Zeit an der Sterilbank.

Ani, Danni, Georg, Kim, Antje und der Lucas-Community danke ich für den seelischen Beistand in mancher Anfechtung.

Meiner Familie danke ich nicht zuletzt für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Meiner Mutter danke ich dafür, dass sie mich besonders in der Endphase meiner Promotion umsorgt hat.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel Kardiomyozyten abhängige parakrine Mechanismen und ihre Wirkung auf nichtmyozytäre Zellen im Myokard und die Alterung des Herzens: Rolle von STAT3 selbstständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Eva Podewski

Hannover, Oktober 2006