

Aus der Abteilung Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)  
im Zentrum Innere Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens auf die  
Aktionspotentiale von frühen aus  
embryonalen Stammzellen differenzierten  
Kardiomyozyten

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

Stefan Neef

aus

Berlin-Charlottenburg

**Göttingen 2011**

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. L. S. Maier

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. H. Zimmermann

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. A. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2011

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Frühe Kardiogenese .....	1
1.2	Aktionspotentiale .....	3
1.2.1	AP-Verlauf (Phasen).....	3
1.2.2	Verlaufsformen adulter APs.....	5
1.3	Stammzellen .....	7
1.3.1	Totipotenz und Pluripotenz .....	8
1.3.2	Gewinnung und Kultur von ESC .....	9
1.3.3	Gentechnische Veränderungen: Loss / Gain of Function .....	10
1.3.4	In-vitro-Differenzierung von ESC .....	11
1.3.4.1	Embryoidkörperchen/embryoid bodies.....	11
1.3.4.2	ESC können sich zu einer Vielzahl spezialisierter Zelltypen differenzieren.....	11
1.3.4.3	Äußere Einflussgrößen auf die Differenzierung von ESC ...	12
1.4	In-vitro-Differenzierung von ESC als Modell zur Untersuchung früher Prozesse der Kardiomyogenese.....	13
1.4.1	Kardiomyozytäre Differenzierung von ESC .....	14
1.4.2	Elektrophysiologische Differenzierung von ESCDC .....	16
1.5	Extrazellulärmatrix, Kollagene und Integrine.....	20
1.5.1	Extrazellulärmatrix .....	20
1.5.2	Kollagene.....	21
1.5.3	Integrine.....	25
1.6	Herzinsuffizienz .....	26
1.7	Mögliche therapeutische Anwendung von Stamm- und Vorläuferzellen.....	28
1.8	Fragestellung .....	29
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1	Zellkultur .....	32
2.1.1	Routinevorgänge in der Zellkultur .....	32
2.1.1.1	Einfrieren von Zellen („Kryokonservierung“).....	32
2.1.1.2	Auftauen von Zellen .....	33

---

2.1.1.3	Hitzeinaktivierung des fetalen Kälberserums .....	33
2.1.2	Feeder-Layer (FL).....	34
2.1.2.1	Gewinnung der murinen Fibroblasten für den Feeder-Layer.....	34
2.1.2.2	Kultivierung / Umsetzen von Feeder-Layer .....	35
2.1.2.3	Mitotische Inaktivierung des Feeder-Layers.....	35
2.1.3	Kultivierung undifferenzierter ESC.....	36
2.1.3.1	Kulturbedingungen der ESC, Beurteilung der Kultur .....	36
2.1.3.2	Passagieren der ESC („Umsetzen“).....	37
2.1.3.3	Pre-Plating .....	37
2.1.4	Differenzierungsversuche .....	37
2.1.4.1	Hanging Drops .....	39
2.1.4.2	Hanging Drops in Suspension.....	39
2.1.4.3	Plattierung der EBs, weitere Kultivierung .....	40
2.2	Morphologische Auswertung.....	40
2.3	Spezielle Isolationstechnik.....	41
2.4	Patch-Clamp-Technik .....	43
2.4.1	Current Clamp .....	44
2.4.2	Kompensation von Störgrößen .....	44
2.4.3	Aufbau des Messstandes .....	45
2.4.4	Patch-Pipette .....	46
2.4.5	Pipettenlösung .....	46
2.4.6	Badlösung.....	47
2.4.7	Prinzipielles Vorgehen beim Patch Clamp.....	47
2.4.8	Modifiziertes Vorgehen beim Patch Clamp.....	48
2.5	Auswertung der Patch-Clamp-Registrierungen.....	49
2.5.1	Auswertung der APs .....	49
2.5.2	AP-Kenngrößen .....	49
2.6	Statistik .....	52
2.7	Verwendete Lösungen.....	53
2.7.1	Patch-Clamp-Lösungen .....	53
2.7.2	Zellkultur-Lösungen .....	54
2.8	Substanzen.....	56

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1	Zur Art der Darstellung der Daten .....	58
3.2	Optimierung der Differenzierungsversuch-Ansätze.....	59
3.3	Morphologische Auswertung.....	60
3.4	Aktionspotentiale .....	62
3.4.1	Umfang der Stichprobe .....	62
3.4.2	AP-Morphologien .....	62
3.4.2.1	Early-Pacemaker-APs .....	62
3.4.2.2	Vorhof- und Ventrikel-ähnliche sowie weitere AP-Morphologien.....	66
3.4.2.3	Subgruppe mit besonders rascher Depolarisation (Subgruppe $V_{\max}$ )	71
3.4.3	AP-Zykluslänge.....	72
3.4.4	Diastolische Depolarisationsrate (DDR) .....	75
3.4.5	Ruhemembranpotential .....	78
3.4.6	Depolarisation: AP-Amplitude .....	80
3.4.7	Depolarisation: $V_{\max}$ .....	83
3.4.8	Repolarisation: APD .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
4.1	Vorbereitende Untersuchungen .....	90
4.1.1	Optimierung der Kulturbedingungen .....	90
4.1.2	Verfahren zur Patch-Clamp-Untersuchung von ESDC mit intakter ECM .....	91
4.2	Der WT zeigt eine normale Differenzierung der ESDC, Mechanismen der Entwicklung .....	91
4.2.1	Morphologische Auswertung .....	91
4.2.2	Early-Pacemaker-APs treten während der Neubildung von ESDC auf.....	92
4.2.3	Weitere Typen von AP-Morphologien im WT.....	93
4.2.4	Entwicklung der AP-Kenngrößen im WT im Verlauf der Differenzierung.....	94
4.2.4.1	Depolarisation: AP-Amplitude .....	94

---

4.2.4.2	Depolarisation: $V_{\max}$ .....	95
4.2.4.3	Repolarisation: APD .....	96
4.2.4.4	AP-Zykluslänge .....	97
4.2.4.5	DDR .....	97
4.3	Der KO zeigt eine veränderte Differenzierung der ESDC .....	98
4.3.1	Diskussion der Vorbefunde .....	98
4.3.2	Die Neubildung von ESDC ist im KO initial stark beschleunigt 100	
4.3.3	Die beschleunigte Bildung von ESDC erklärt die initial höhere AP-Amplitude, nicht aber die niedrigere AP-Frequenz im KO .....	100
4.3.4	Herausbildung neuer Unterschiede im weiteren Verlauf der Differenzierung .....	102
4.3.5	AP-Morphologien im KO .....	103
4.4	Zusammenfassung der Entwicklungen in WT und KO .....	104
4.5	Einordnung der Ergebnisse .....	106
4.5.1	Vergleich mit Vorbefunden zum $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO .....	106
4.5.2	Weitere Befunde zu Kollagenen und ESDC .....	107
4.5.3	Integrine als mögliche Vermittler der Effekte im KO .....	108
4.5.3.1	Parallelen von $\beta_1$ -Integrin-KO und $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO .....	109
4.5.3.2	Mögliche Mechanismen, über welche Integrine ECM- Einflüsse auf die zelluläre Elektrophysiologie vermitteln .....	110
4.6	Physiologische und pathophysiologische Einordnung der Ergebnisse .....	112
4.6.1	Im Rahmen der Herzinsuffizienz .....	112
4.6.2	Kollagen im Sinusknoten .....	113
4.7	Therapeutische Implikationen .....	114
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>
6.1	Abkürzungsverzeichnis .....	116
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	118
6.3	Tabellenverzeichnis .....	119

---

6.4	APD80 und APD90 tabellarisch .....	120
6.5	RT50, RT80 und RT90 tabellarisch.....	121
6.6	Ergebnisse Vorversuche Hanging Drops .....	122
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>124</b>

# **1 Einleitung**

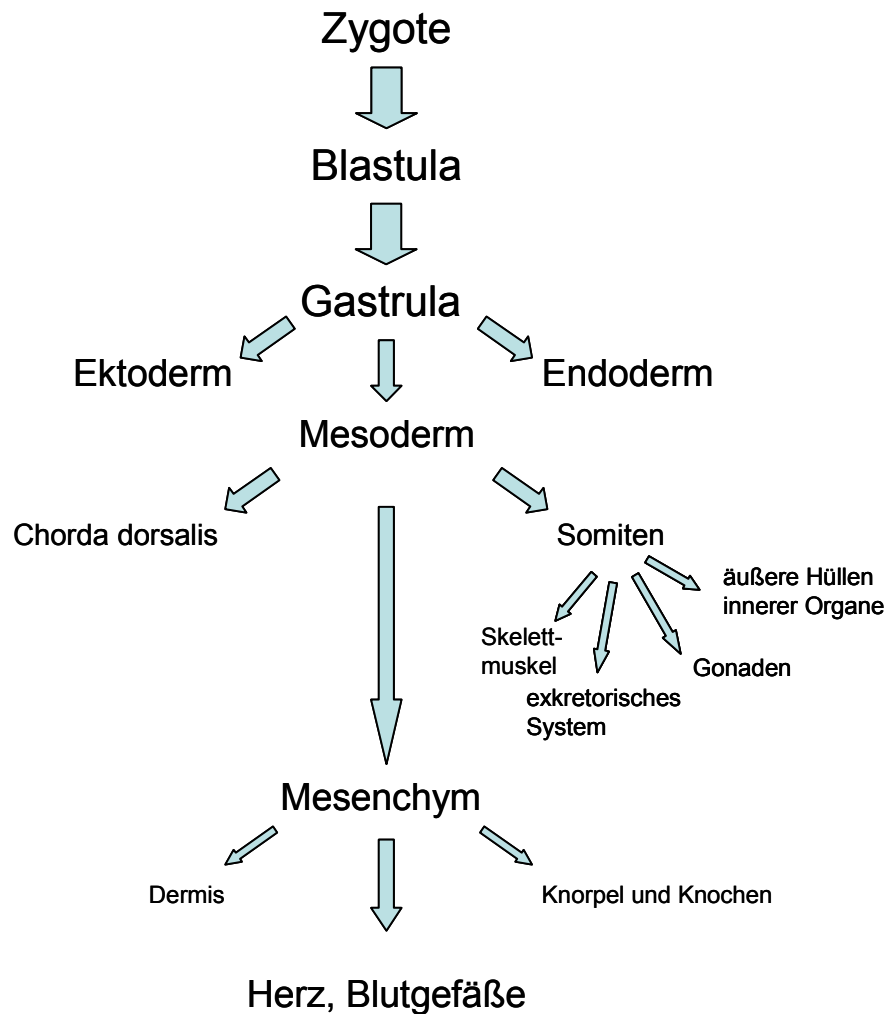
Die Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen (ESC) ist mittlerweile eine etablierte Methode zur Untersuchung früher Prozesse der Organogenese. Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Extrazellulärmatrix entscheidenden Einfluss auf die Richtung der Differenzierung von embryonalen Stammzellen (CZYZ und WOBUS 2001) hat und auch die kardiomyozytäre Differenzierung dieser Zellen beeinflusst (BAHARVAND et al. 2005). Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix im Herzen, es macht dort alleine etwa 85% des Gesamtkollagens aus (DHALLA et al. 1997, HEENEMAN et al. 2003). Verlust der Kollagen-Typ-I-Funktion ist *in vivo* embryonal letal (LOHLER et al. 1984, IRUELA-ARISPE et al. 1996). Die Differenzierung embryonaler Stammzellen *in vitro* erlaubt jedoch in Umgehung dessen, den Einfluss dieses Kollagens auf die Entwicklung von Kardiomyozyten zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der  $\alpha_1$ -Subkette des Typ-I-Kollagens auf die Aktionspotentiale (AP) von aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten untersucht.

## **1.1 Frühe Kardiogenese**

In der Embryonalentwicklung bildet sich zunächst im Prozess der Gastrulation aus den pluripotenten Zellen des einschichtigen Embryo ein mehrschichtiger Embryo - die drei Keimblätter entstehen: Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (mit später visceralem und parietalem Blatt), siehe Abb. 1-1. Im Zusammenspiel dieser Keimblätter miteinander bilden sich die Organe heraus. Die einzelnen Signalmechanismen und Faktoren, die diese Entwicklung steuern, sind noch weitgehend unbekannt, jedoch haben insbesondere auch Studien mit ESC zur beginnenden Aufklärung dieser Zusammenhänge beigetragen (RODDA et al. 2002).

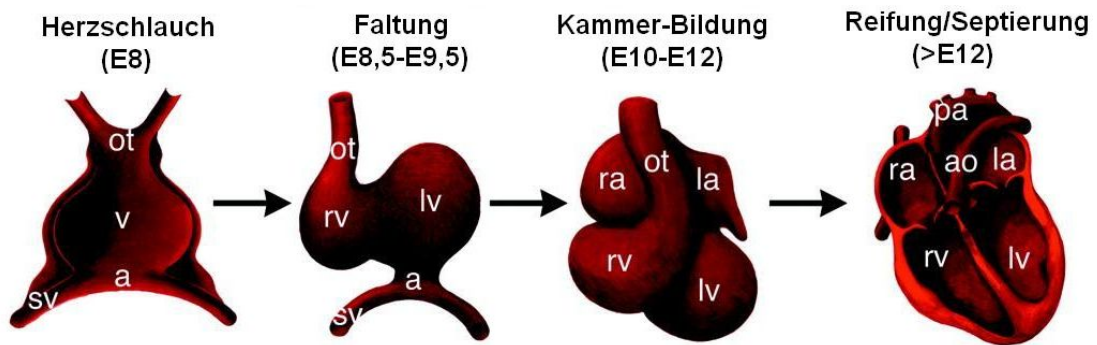




**Abb. 1-1:** Entwicklung verschiedener Organe aus den Keimblättern (nach SACHINIDIS et al. 2002, S. 591)

Dabei ist das Herz das erste Organ, das sich im Embryo des Vertebraten entwickelt. Aus dem Mesoderm bzw. dem daraus gebildeten Mesenchym bilden sich nahe der Prächordalplatte durch Verschmelzung von Hohlräumen die zunächst paarig angelegten Herzschräuche, die bald darauf miteinander zu einem einheitlichen Herzschrlauch verschmelzen. Am etwa 8,5ten embryonalen Tag (E8,5) beginnen bei Mäusen die ersten Anzeichen der Herausbildung der Herzkammern. Gleichzeitig lässt sich erstmals mRNA für ANF (atrialen natriuretischen Faktor) im Bereich der späteren Vorhöfe und Ventrikel nachweisen (CHRISTOFFELS et al. 2000, BRUNEAU 2002). Etwa zum selben Zeitpunkt werden, begleitet von erster ( $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger) elektrischer Aktivität, erste spontane Kontraktionen sichtbar, welche allerdings zunächst noch eher unkoordinierter, peristaltischer Art sind (KAMINO 1991, FISHMAN und CHIEN 1997, MOORMAN et al. 1998). Es

folgt die S-förmige Biegung des Herzschlauches, wobei der Berührungspunkt am späteren Gefäßpol liegt (CHRISTOFFELS et al. 2000). (Abb. 1-2)



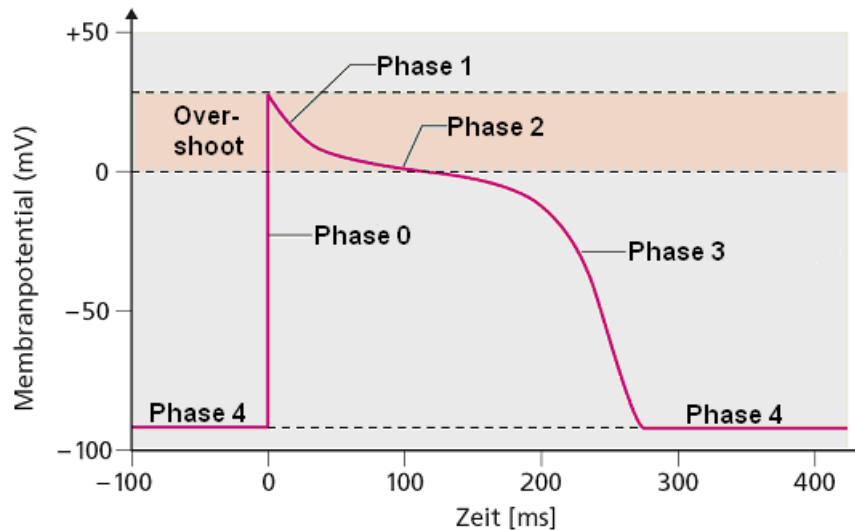
**Abb. 1-2:** ot: outflow tract – Ausflusstrakt; v: Ventrikel; rv: rechter Ventrikel; lv: linker Ventrikel; a: Atria (Vorhöfe); ra: rechtes Atrium; la: linkes Atrium; sv: Sinus venosus; pa: Pulmonalarterie (modifiziert nach BRUNEAU 2002, S. 510)

## 1.2 Aktionspotentiale

Aktionspotentiale (AP) sind kurzzeitige, charakteristisch verlaufende Veränderungen der Membranspannung elektrisch erregbarer Zellen abweichend von deren Ruhemembranpotential. Klassischerweise werden sie durch Depolarisation der Zellmembran bis zu einem gewissen Schwellenwert ausgelöst. Danach folgen sie dem „alles oder nichts“-Gesetz, d.h. ihre Form bzw. ihr zeitlicher Ablauf ist prinzipiell von der Art des auslösenden Stimulus unabhängig.

### 1.2.1 AP-Verlauf (Phasen)

Grundsätzlich lässt sich der zeitliche Verlauf eines APs in eine kurze Depolarisationsphase gefolgt von einer länger dauernden Repolarisationsphase aufteilen. Der Verlauf eines APs mit seinen verschiedenen Phasen ist in Abb. 1-3 anhand eines typischen humanen ventrikulären APs prototypisch dargestellt.



**Abb. 1-3:** Typisches humanes ventrikuläres AP (modifiziert nach PIPER 2003, S. 148)

Vom *Ruhemembranpotential* (Phase 4, siehe Abb. 1-3) aus erfolgt eine Depolarisation der Zellmembran bis zum Schwellenwert, wodurch das „eigentliche“ AP ausgelöst wird. In der nun folgenden *Depolarisationsphase* („Aufstrich“, Phase 0) kommt es zu einem steilen Anstieg der Membranspannung, wobei diese die Null-Volt Linie überschreiten kann („Overshoot“ bis zum Potentialmaximum (engl. „Peak“)). Die Depolarisation ist im adulten Herzen wesentlich bestimmt durch das Öffnen spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle ( $\text{Na}_v$ -Kanäle, aufgrund ihrer sehr schnellen Öffnung in weniger als 1 ms auch als „schnelle Natriumkanäle“ bezeichnet), wodurch es zu einem  $\text{Na}^+$ -Einstrom ( $I_{\text{Na}}$ ) in die Zelle kommt. Dabei besteht ein positives Feedback, in welchem das Öffnen der ersten Kanäle zu weiterer Depolarisation führt, wodurch weitere Kanäle öffnen und sich der Effekt selbst verstärkt. Dies ist jedoch kein dauerhafter Effekt, da die Kanäle nach einigen Millisekunden spontan wieder inaktivieren (schließen) und dann nicht mehr direkt aktivierbar sind. (Die Inaktivierung der  $\text{Na}_v$ -Kanäle beginnt dabei, noch bevor der Peak erreicht ist, entsprechend liegt der Zeitpunkt der maximalen Geschwindigkeit der Depolarisation („ $t_{\text{Vmax}}$ “) noch vor dem Peak.) In der *Repolarisationsphase* wird das Membranpotential wieder zum Ruhemembranpotential zurückgeführt, d.h. negativ polarisiert. Wesentlicher Mechanismus ist hierbei ein  $\text{K}^+$ -Ausstrom ( $I_{\text{K}}$ ) aus der Zelle, welcher durch Öffnen spannungssensitiver Kaliumkanäle ( $\text{K}_v$ ) ermöglicht wird. Deren Schwellenwert ist zwar in etwa mit dem der  $\text{Na}_v$  gleich, jedoch

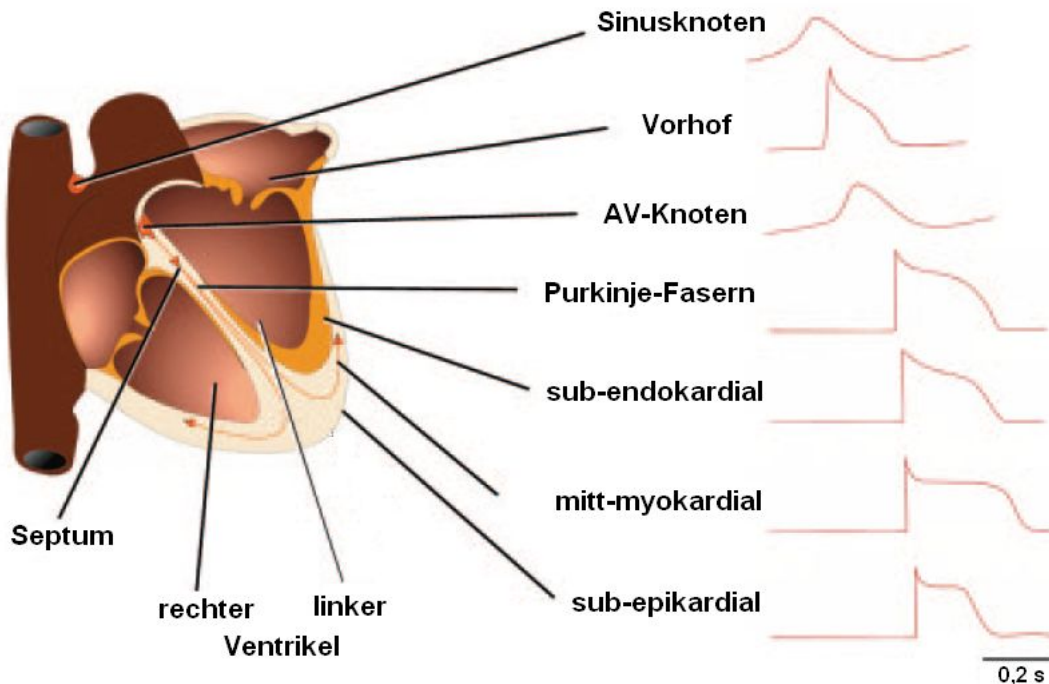
öffnen die  $K_v$  deutlich langsamer (ca. 10 ms), als die  $Na_v$ , wodurch ihr Effekt erst verzögert eintritt. Die anschließende Inaktivierung dieser Kanäle erfolgt bei Eintritt der Repolarisation der Membran (negatives Feedback). Im Herzen kommt es zwischen diesen beiden Phasen noch zu einer je nach Zelltyp unterschiedlich stark (im Vorhof beispielsweise fast gar nicht) ausgeprägten *Plateauphase (Phase 2)*, in welcher das Membranpotential weitgehend konstant bleibt bzw. sich nur sehr langsam ändert. Diese wird dadurch bedingt, dass der (hier dominante verzögerte rückstellende)  $K^+$ -Ausstrom aus der Zelle zeitweise durch einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom ( $I_{CaL}$ ) in die Zelle über spannungssensitive L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle (VDCC – Voltage Dependent Calcium Channels) elektrisch kompensiert wird. Bei Vorhandensein eines Plateaus unterscheidet man in der Repolarisation die *frühe Repolarisationsphase (Phase 1, vor dem Plateau liegend)*, bedingt vorwiegend durch den „schnellen transienten“ auswärts gerichteten  $K^+$ -Strom ( $I_{to}$ ), und die, durch Abnahme/Inaktivierung des L-Typ- $Ca^{2+}$ -Stroms und Zunahme des „langsamen“  $K^+$ -Stroms eintretende, *späte Repolarisationsphase (Phase 3, nach dem Plateau liegend)*. Einige Zellen des Herzens sind zur Rhythmogenese befähigt. In ihnen ist eine *spontane diastolische Depolarisation in Phase 4* zu beobachten.

Im Anschluss an ein AP werden die Ionengradienten zwischen Zytosol und Extrazellulärraum wiederhergestellt, im Wesentlichen durch die  $Na^+/K^+$ -ATPase, den  $Na^+-Ca^{2+}$ -Austauscher und die  $Ca^{2+}$ -ATPase des Sarkoplasmatischen Retikulums.

### **1.2.2 Verlaufsformen adulter APs**

Im adulten humanen Herzen bestehen regional unterschiedliche AP-Morphologien, wobei diese den funktionellen Anforderungen der Zellen zur Erregungsbildung, Erregungsleitung oder Kontraktion entsprechen (vgl. Abb. 1-4 (S. 7)). Die elektrische Erregung des Herzens wird normalerweise im *Sinusknoten* generiert. Dieses geschieht durch *spontane diastolische Depolarisation* in Phase 4 des kardialen APs, bis schließlich der Schwellenwert erreicht und ein AP ausgelöst wird. Wichtigster Mechanismus der spontanen Depolarisation ist  $I_f$ , der nichtselektive hyperpolarisationsaktivierte Kationenstrom durch HCN-Kanäle

(„Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide gated“ – durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide gesteuert).  $I_f$  unterliegt dabei adrenerger (Zunahme, also beschleunigte Depolarisation) und cholinerg (Abnahme) Modulation. Daneben scheinen aber auch intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen in der Rhythmogenese eine wichtige Rolle zu spielen (MALTSEV und LAKATTA 2008). Da in den Schrittmacherzellen des Sinusknotens der das Ruhemembranpotential wesentlich mitbestimmende einwärtsgerichtete Kaliumstrom  $I_{K1}$  nur schwach ausgebildet ist, zeigen sie ein im Vergleich zu Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards weniger polarisiertes (positiveres) Ruhemembranpotential. Auch ist in ihnen der Strom durch  $Na_V$ -Kanäle wesentlich schwächer ausgeprägt, so dass es nur zu einem langsamen Aufstrich in Phase 0 kommt. Neben den Zellen des Sinusknotens zeigen auch diejenigen des *AV-Knotens* eine deutliche, wenn auch schwächer ausgeprägte, Schrittmacheraktivität. Entsprechend besitzen diese Zellen eine ähnliche AP-Morphologie, allerdings mit langsamerer spontaner Depolarisation in Phase 4. Auch *Purkinje-Zellen* als Zellen des Erregungsleitungs-Systems haben aufgrund des im Vergleich zum Arbeitsmyokard etwas geringeren  $I_{K1}$  ein etwas weniger polarisiertes Ruhemembranpotential als dieses. In geringerem Umfang als im Sinusknoten wird auch in ihnen Schrittmacher-Aktivität generiert. Im Gegensatz zu den Schrittmacher-Zellen des Sinus- und AV-Knotens besitzen Purkinje-Zellen jedoch einen ausgeprägten  $Na_V$ -Besatz und zeigen entsprechend einen schnellen Aufstrich in Phase 0. *Vorhof-* und *Ventrikulkardiomyozyten* haben ein deutlich negativeres Ruhemembranpotential als die Zellen des Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems. Eine Schrittmacheraktivität besitzen sie nicht. Sie zeigen den bereits erläuterten schnellen Phase-0-Aufstrich. Aufgrund unterschiedlicher  $K^+$ -Kanal-Expression repolarisieren jedoch Vorhof-Zellen deutlich rascher als Ventrikel-Zellen. (NERBONNE und KASS, 2005, BERS 2001, SCHMIDT und THEWS 1997)



**Abb. 1-4:** Unterschiedliche AP-Morphologien des Herzens (modifiziert nach NERBONNE und KASS 2005, S. 1206)

### 1.3 Stammzellen

Unter der Bezeichnung „Stammzellen“ werden eine Vielzahl von Zellen subsumiert, denen gemein ist, dass sie

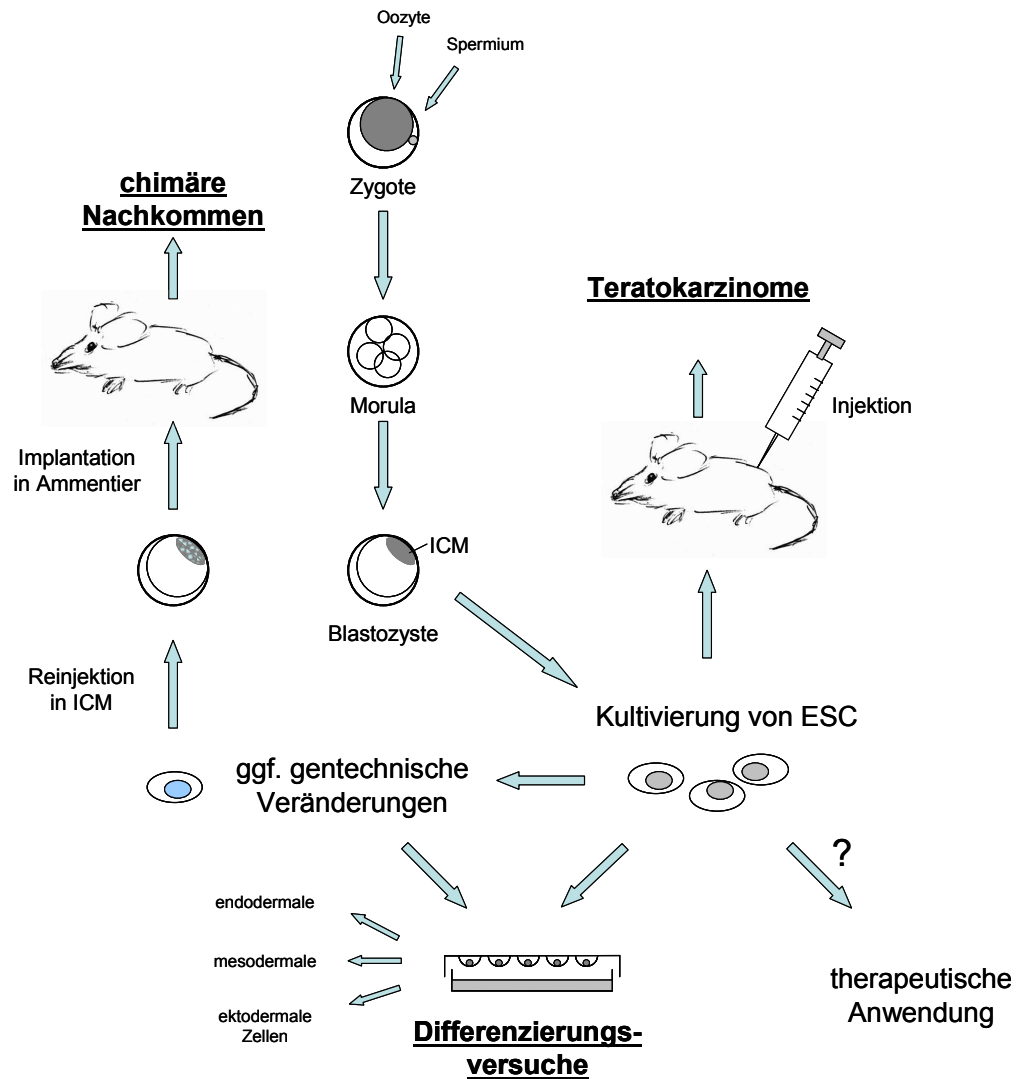
- (noch) undifferenziert sind (im Gegensatz zu den spezialisierten Zellen des adulten Organismus) und dass sie
- in vivo oder in vitro unter bestimmten Bedingungen proliferieren können, ohne dieses Merkmal zu verlieren (d.h. sie besitzen die Fähigkeit zur „Selbsterneuerung“, zur Herstellung identischer Kopien ihrer selbst).

Je nach Ursprung der Zellen spricht man von *embryonalen Stammzellen* (ES-Zellen / ESC), *embryonalen Keimzellen* („embryonic germ cells“, EG-Zellen / EGC) oder gewebespezifischen adulten oder fetalen *somatischen Stammzellen* (welche ansonsten differenzierten Geweben entstammen, z.B. hämatopoetische Stammzellen).

### **1.3.1 Totipotenz und Pluripotenz**

*Totipotenz* bedeutet die Fähigkeit, einen vollständigen Organismus zu bilden. Die einzigen bekannten totipotenten Zellen sind die der Zygote und die nachfolgenden embryonalen Zellen des Zwei- bis Achtzellstadiums bis zur Morula. Danach geht die Totipotenz verloren im Zuge der Trennung der inneren und äußeren Zellmassen am 4. Gestationstag. Es entsteht die Blastozyste mit der äußeren Zellschicht des Trophoblasten und den noch undifferenzierten inneren Zellen der Blastozyste, der sogenannten „*Inner Cell Mass*“ (ICM) des Embryoblasten. Aus dieser können embryonale Stammzellen (ESC) gewonnen werden. Diese Zellen sind nicht mehr totipotent, aber noch *pluripotent*, d.h. sie können sich zu Zellen aller drei Keimblätter (Ectoderm, Mesoderm und Endoderm) differenzieren. Dies bedeutet, dass sie prinzipiell jede Zellart des adulten Organismus hervorbringen, nicht mehr aber einen kompletten Organismus bilden können. Die Pluripotenz von ESC konnte in drei Verfahren gezeigt werden (Abb. 1-5):

- Durch (Re-)Injektion der Zelle in die ICM einer Blastozyste. In dem sich daraufhin in einem Ammentier entwickelnden Embryo beteiligen sich die ESC an der normalen Embryogenese in allen Geweben, es ist eine sogenannte „Chimäre“ entstanden (BRADLEY et al. 1984).
- Durch Injektion von ESC in immunsupprimierte adulte Mäuse. Dort bilden sie dann Teratome, die unterschiedlichste Zelltypen enthalten, was die Fähigkeit der Zellen zeigt, sich in vivo zu unterschiedlichsten Zellen zu entwickeln (THOMSON et al. 1998).
- Durch in-vitro-Kultivierung und (gezielte) Differenzierung in spezialisierte Zelltypen. Dies wird am Beispiel der ESC noch ausführlicher dargestellt werden.



**Abb. 1-5:** Gewinnung und Verwendung embryonaler Stammzellen

Im Laufe der Embryonalentwicklung erlangen die Zellen schließlich die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Zelllinie oder büßen ihre proliferativen Fähigkeiten ein. Man bezeichnet sie nun als *Progenitorzellen* (Vorläufer-Zellen).

### 1.3.2 Gewinnung und Kultur von ESC

Aus der ICM werden die embryonalen Stammzellen gewonnen (Abb. 1-5), aus denen sich nun auch in vitro Zellen aller drei embryonalen Keimblätter differenzieren lassen. 1981 konnten die ersten murinen ESC (mESC)-Linien unabhängig von einander durch Evans und Kaufman (EVANS und KAUFMAN 1981) sowie durch Martin (MARTIN 1981) isoliert und etabliert werden. Mittlerweile existiert eine ganze Reihe etablierter und zum Teil gut



charakterisierter mES-Zelllinien, beispielsweise die für die Untersuchung der Kardiogenese häufig genutzten Zelllinien D3 (DOETSCHMAN et al. 1985), R1 (NAGY et al. 1993) und HM1 (MAGIN et al. 1992). Bislang konnten nur aus drei Säugetieren (Maus, Rhesusaffe und Mensch) ESC gewonnen werden. ESC können zur Beibehaltung ihres undifferenzierten Zustandes und unter Beibehaltung des vollen pluripotenten Differenzierungs-Potentials in Ko-Kultur auf einem Feeder-Layer aus mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten (EVANS und KAUFMAN 1981), in speziellen Kulturmedien mit Differenzierungsinhibitoren (NICHOLS et al. 1990, PEASE et al. 1990) oder in Kombination dieser beiden Möglichkeiten kultiviert werden. Als wesentlicher Faktor zur Beibehaltung des undifferenzierten Zustandes und zur weiteren Vermehrung der Zellen konnte hierbei der Leukämie-inhibierende Faktor (LIF) ausgemacht werden. (WILLIAMS et al. 1988, NICHOLS et al. 1990, PEASE et al. 1990, ZANDSTRA et al. 2000). Unter geeigneten Bedingungen behalten die Zellen so auch in höheren Passagen einen relativ normalen und stabilen Karyotyp bei (SMITH 2001). mESC zeichnen sich dabei durch einen recht schnellen Generationszyklus von nur etwa 14 Stunden aus (ROHWEDEL et al. 1996).

### **1.3.3 Gentechnische Veränderungen: Loss / Gain of Function**

Wichtigster Mechanismus, um gezielte Veränderungen an der Erbsubstanz vorzunehmen, ist die homologe Rekombination, durch welche sehr ähnliche, aber nicht identische DNA-Doppelstrang-Konstrukte (z.B. eine Missense-Mutation oder ein Stop-Codon im Falle des Loss of function, s.u.) in die DNA der ESC integriert werden können (THOMAS UND CAPECCHI 1987).

Mit einer "*Loss of function*"-Mutation (dt.: Funktionsverlust) erreicht man den kompletten oder teilweisen Verlust der Funktion eines Gens. Klassisches Beispiel dafür ist der *Knockout*, in welchem die Funktion eines Gens (und damit des oder davon abhängenden Proteine) komplett inaktiviert wird. Hierüber sind Rückschlüsse über die physiologische Funktion, entwicklungsbiologische Notwendigkeit bzw. Einflussnahme des entsprechenden Produkts möglich.

Durch "*Gain of function*" (dt.: Funktionsgewinn) kann die übermäßige Aktivität eines Gens, in aller Regel die Überexpression eines bestimmten Proteins,

erzielt werden. Auch auf diesem Wege lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion dieses Proteins ziehen.

### **1.3.4 In-vitro-Differenzierung von ESC**

Im Gegensatz zur permanenten Kultur, deren Ziel die Beibehaltung des undifferenzierten Zustands der ESC ist, wird in Differenzierungsversuchen das genaue Gegenteil, nämlich die Differenzierung und Spezialisierung der zuvor pluripotenten Zellen, angestrebt. Hierzu werden die ESC nun ohne Feeder-Layer in einem LIF-*freien* Medium kultiviert.

#### **1.3.4.1 Embryoidkörperchen/embryoid bodies**

Gemeinhin erster Schritt (außer bei gewünschter neuronaler Differenzierung der Zellen (SMITH 2001)) zur Differenzierung von ESC ist, diese zu multizellulären Gebilden, sogenannten „Embryoidkörperchen“ (*embryoid bodies*, EB) aggregieren zu lassen. Hierzu werden in der Methode der *Hanging Drops* („hängende Tropfen“) Tropfen einer Suspension mit definierter ES-Zellzahl frei nach unten herabhängend einige Tage kultiviert. An der Unterseite dieser hängenden Tropfen aggregieren nun die Zellen, proliferieren und bilden so die EBs (WOBUS et al. 1984; vgl. 2.1.4.1 (S.39)). Im Zuge der nun einsetzenden Differenzierung der Zellen entsteht im EB spontan eine Vielzahl an Zelltypen, darunter auch den drei Keimblättern entsprechende Zellen und ihre Abkömmlinge (DOETSCHMAN et al. 1985). Zunächst bildet sich im EB eine äußere Schicht endodermähnlicher Zellen, später eine ektodermale „Rinne“, dann mesodermale Zellen. Nach Plattierung der EB auf Zellkulturschalen bildet sich um diese herum ein „Outgrowth“ (dt.: Auswuchs/Herausgewachsenes), in welchem sich im zeitlichen Verlauf weitere spezialisierte Zellen finden lassen.

#### **1.3.4.2 ESC können sich zu einer Vielzahl spezialisierter Zelltypen differenzieren**

Durch Manipulationen der Wachstumsbedingungen (siehe 1.3.4.3) konnte mittlerweile eine Vielzahl von terminal differenzierten Zelltypen in vitro aus mESC abgeleitet werden, u.a. Kardiomyozyten (WOBUS et al. 1991,

MALTSEV et al. 1993), Endothelzellen (RISAU et al. 1988), hämatopoetische Zellen (WILES und KELLER, 1991, NAKANO et al. 1996), Chondrozyten (KRAMER et al. 2000), Skelettmuskelzellen (ROHWEDEL et al. 1994), Neurone (BAIN et al. 1995) und insulinproduzierende Zellen (LUMELSKY et al. 2001). Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich die ESC während ihrer Differenzierung in vitro über den Zwischenschritt bestimmter Progenitorzellen in die terminal differenzierten Gewebezellen entwickeln und dabei in einem zeitlich kontrollierten Muster gewebespezifische Gene und Proteine exprimieren. Sie folgen dabei weitgehend der natürlichen embryonalen Entwicklung des jeweiligen Zelltyps in vivo (GUAN et al. 1999a). Wozu aber eine einzelne Stammzelle sich letztendlich differenziert, scheint von einer ganzen Vielzahl von Faktoren abzuhängen, so von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Signalmolekülen und der sie umgebenden Extrazellulärmatrix (ECM) (CZYZ und WOBUS 2001). Obwohl bereits einige wichtige Signalwege erkannt wurden (WATT und HOGAN 2000), ist die Rolle, die diese Faktoren im Einzelnen spielen und wie sie zusammenwirken, bislang nur teilweise bekannt (CZYZ und WOBUS 2001, BAHARVAND et al. 2005, BOHELER et al. 2002).

#### **1.3.4.3 Äußere Einflussgrößen auf die Differenzierung von ESC**

Es konnte jedoch in der in-vitro-Differenzierung von ESC eine Reihe von Faktoren ausgemacht werden, welche Differenzierungs-Richtung, Differenzierungs-Muster und Effizienz der Differenzierung beeinflussen. Dabei wird zwischen genetischen Faktoren (dem Genotyp der Zelle) und epigenetischen Faktoren (welche den Phänotyp beeinflussen, ohne den Genotyp zu verändern) unterschieden. Zu letzteren zählen beispielsweise die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien, natürliche oder exogen applizierte Bestandteile der ECM oder die Anzahl der Zellen pro hängendem Tropfen (GUAN 1998, WOBUS et al. 1997, DING 2000, BAHARVAND et al. 2005); zu ersteren natürlich die verwendete ES-Zellreihe (WOBUS et al. 2002). Ein Einfluss auf die kardiomyozytäre Differenzierung konnte als erstes für Retinsäure (engl. Retinoic Acid, „RA“) gezeigt werden, welche abhängig von der Konzentration und dem Zeitpunkt der Gabe die (auch elektrophysiologische) Differenzierung beeinflusst (ROHWEDEL et al. 1999,

WOBUS et al. 1997). Insbesondere auch die Beschaffenheit des im Differenzierungsmedium verwendeten fetalen Kälberserums (FCS, Fetal Calf Serum) scheint die Effizienz und Richtung der Differenzierung der ESC zu somatischen Zellen zu beeinflussen (WOBUS und GUAN 1998, SACHINIDIS et al. 2002). Da dieses nur in begrenzten Chargen mit konstanter Zusammensetzung verfügbar ist, bestehen Bemühungen, weiter standardisierte Kulturbedingungen und alternative Kulturmedien zu etablieren, welche ohne FCS auskommen.

#### **1.4 In-vitro-Differenzierung von ESC als Modell zur Untersuchung früher Prozesse der Kardiomyogenese**

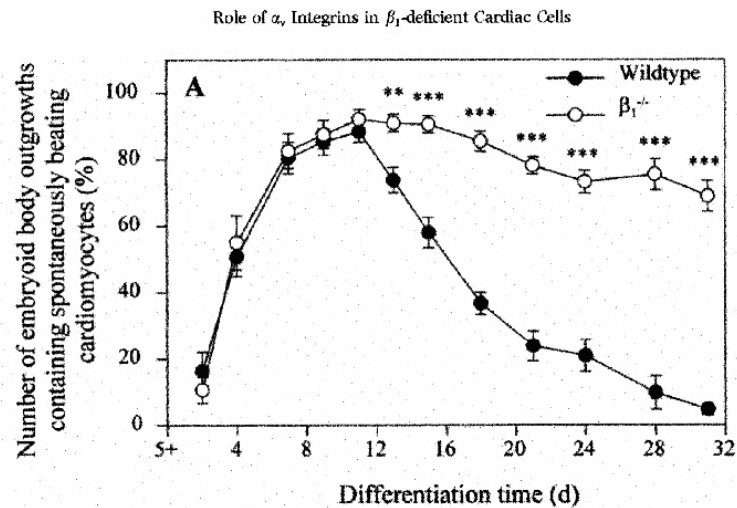
Aus ESC differenzierte Kardiomyozyten (ESDC, ES-cell derived cardioomyocytes) stellen mittlerweile das wichtigste Werkzeug zur Untersuchung der frühen Kardiomyogenese dar. Zwar gelang es, in Primärkultur eine permanente klonale Zelllinie (H9c2) aus embryonalem Rattenherz zu etablieren (KIMES und BRAND 1978). Jedoch dedifferenzieren embryonale Zellen in Kultur rasch bzw. entwickeln sich in Kultur nicht weiter (SPERELAKIS 1978, SPERELAKIS UND PAPPANO 1983). So konnten z.B. in dieser Zelllinie zwar L-Typ  $Ca^{2+}$ -Ströme gezeigt werden, nicht jedoch viele der anderen typischen Ionenströme der Herzmuskulatur (SIPIDO und MARBAN 1991, HESCHELER et al. 1991, MALTSEV et al. 1994). Auch terminal differenzierte adulte Kardiomyozyten vermehren sich in Kultur nicht, dedifferenzieren schnell und sind somit für permanente Linien funktioneller Herzzellen nicht geeignet (MUMMERY et al. 2002). Grundsätzlich gilt für diese permanenten Zelllinien die Einschränkung, dass sie zur Untersuchung der Kardiomyogenese nur sehr bedingt geeignet sind, da sie aufgrund des Fehlens der sie sonst in situ umgebenden Zellen nicht in physiologischer Umgebung (insbesondere nicht in physiologischer ECM) wachsen (HESCHELER et al. 1997). Gerade Kollagen Typ I wird im embryonalen Herzen ausschließlich durch epitheliale Zellen, im fetalen, neonatalen und adulten Herzen ausschließlich durch Fibroblasten

synthetisiert, nicht jedoch von den Kardiomyozyten selbst (EGHBALI et al. 1988, EGHBALI et al. 1989). Es würde also in solchen Kulturen nicht produziert.

#### **1.4.1 Kardiomyozytäre Differenzierung von ESC**

Doetschman et al. konnten bereits 1985 in EBs die Herausbildung spontan kontrahierender Areale („*Cluster*“) von Kardiomyozyten beobachten und über etliche Tage verfolgen (DOETSCHMAN et al. 1985). Die Kardiomyozyten bilden sich in diesen Clustern zwischen einer Deckschicht epithelartiger und einer basalen Schicht mesenchymaler Zellen (HESCHELER et al. 1997, BOHELER et al. 2002). In aller Regel sind unter optimalen Kulturbedingungen erste spontane Kontraktionen etwa 2 Tage nach der Plattierung 7 Tage kultivierter EBs (7d+2) bzw. 3-4 Tage nach der Plattierung 5 Tage alter EBs (5d+3/4) zu beobachten (WOBUS et al. 1991, MALTSEV et al. 1994, ROHWEDEL et al. 1999, GUAN et al. 2001). Man geht davon aus, dass ESC sich über den Zwischenschritt mesodermaler Progenitorzellen zunächst zu frühen Kardiomyozyten entwickeln, die u.a. einen noch unvollständigen Ionenkanalbesatz haben und anschließend einem weiteren Reifungsprozeß unterliegen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Zellen während der Entwicklung Gene in einem kontrollierten Muster exprimieren (BOHELER et al. 2002, FÄSSLER et al. 1996a), Sarkomerstrukturen entwickeln (GUAN et al. 1999b) sowie herzspezifische Ionenströme zeigen (MALTSEV et al. 1994) und damit Prozesse der frühen Kardiogenese nachbilden (WIE et al. 2005, BOHELER et al. 2002). Bereits 2 Tage vor Einsetzen der ersten Kontraktionen wird das die  $\alpha_1$ -Untereinheit des L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals ( $\text{Ca}_v1.2$ ) kodierende Gen exprimiert (FÄSSLER et al. 1996a, GUAN et al. 1999a, ROHWEDEL et al. 1999). Etwa gleichzeitig sind erste L-Typ-Ströme in ESDC-Vorläufern, also noch nicht kontrahierenden Zellen, messbar (KOLOSSOV et al. 1998). Zirka einen Tag später folgt die Expression der Gene für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Myosin-schwere-Ketten (Myosin Heavy Chain, MHC), weitere zwei Tage später die Expression des ANF (im Embryo geschieht dies am 8.5ten Tag, vgl. 1.1), und der ventrikulären Isoform der Myosin-leichten-Kette MLC-2v (Myosin Light Chain) (ROHWEDEL et al. 1999).

Ein semiquantitatives Maß für das Vorhandensein spontan kontrahierender ESDC ist die „morphologische Auswertung“. In dieser wird der Anteil von EB bestimmt, in deren Outgrowth sich mindestens ein Cluster mit spontanen Kontraktionen zeigt. Die maximale Zahl, nicht aber Größe, der kontrahierenden Areale und damit auch der höchste Wert in der morphologischen Auswertung ist meist etwa eine Woche nach Plattierung der EBs erreicht (WOBUS et al. 1991, GUAN et al. 1999a), die überwiegende Mehrzahl der EBs zeigt nun Cluster spontan kontrahierender ESDC. Dieser Anteil nimmt dann im Verlauf der weiteren Differenzierung der Zellen wieder ab. Dies wird als Zeichen der Reifung der Zellen interpretiert und darauf zurückgeführt, dass terminal (beispielsweise ventrikulär) spezialisierte Zellen ihre spontane Aktion einstellen (GUAN et al. 1999a, BOHELER et al. 2002, FÄSSLER et al. 1996a). Dieser Abfall darf somit nicht mit einem Verschwinden der ESDC verwechselt werden, denn er geschieht vielmehr dadurch, dass die weiterhin vorhandenen Zellen ihre spontane Aktivität im Zuge der Ausreifung schließlich einstellen. Der Beginn dieses Rückgangs ist in verschiedenen Untersuchungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu sehen. So wurde beispielsweise in D3-Zellen Rückgang ab 5d+12 gesehen (GUAN et al. 2001), während für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten WT-Zellen (R1-Clone) nach 5d+22 erst ein geringer Abfall berichtet wurde (DING 2000), was ein Hinweis auf eine langsamere Ausreifung dieser ESDC sein könnte. Ein verlangsamter oder ausbleibender Abfall in der morphologischen Auswertung ist ein Hinweis auf eine gestörte terminale Ausdifferenzierung der ESDC, wie in Abb. 1-6 am Beispiel des eine deutlich gestörte terminale Differenzierung zeigenden  $\beta_1$ -Integrin-KO illustriert ist (GUAN et al. 2001).



**Abb. 1-6:** Morphologische Auswertung von Differenzierungsversuchen aus  $\beta_1$ -Integrin-KO vs. WT ESC (aus GUAN et al. 2001, S. 525)

### 1.4.2 Elektrophysiologische Differenzierung von ESDC

In der Erforschung der Differenzierung der Elektrophysiologie der Kardiomyozyten werden vor allem folgende Fragestellungen untersucht (HESCHELER et al. 1997):

- Den Zusammenhang zwischen der Expression herzspezifischer Gene, der Herausbildung des kardialen Phänotyps und der funktionellen Expression verschiedener Typen von Ionenkanälen.
- Die Regulation und genetische Kontrolle der Expression von Ionenkanälen (z.B. durch Wachstumsfaktoren, Hormone, ECM).
- Die Entwicklung der Regulation von Ionenkanälen und morphologischen Korrelaten.

1972 konnten Sperelakis und Shigenobu in 2 Tage alten Hühner-Embryonen mittels intrazellulärer Ableitung durch Mikroelektroden APs mit langsamem,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigem Aufstrich zeigen (SPERELAKIS UND SHIGENOBU 1972). Auch im in-vitro-Modell der kardialen Differenzierung von ESC der Zelllinie D3 (DOETSCHMAN et al. 1985) lässt sich eine solche Entwicklung nachvollziehen: Noch vor dem Einsetzen erster spontaner Kontraktionen sind, wie bereits erwähnt, erste L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme messbar. Diese Ströme spielen eine entscheidende Rolle in schrittmacherähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen AP, wie sie in frühen aus ESC abgeleiteten Kardiomyozyten beobachtet

werden (KOLOSSOV et al. 1998). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass in frühen ESDC weniger die spontane Membrandepolarisation bis zum Schwellenwert, sondern vielmehr intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen der wesentliche Mechanismus der Rhythmogenese zu sein scheinen (VIATCHENKO-KARPINSKI et al. 1999, SASSE et al. 2007).

Im weiteren Verlauf der Differenzierung der ESDC kommt es zu einer Zunahme der Aufstrichgeschwindigkeit ( $dV/dt$ , die maximal erreichte Depolarisationsgeschwindigkeit wird mit  $V_{\max}$  bezeichnet) und auch der Amplitude der APs (FIJNVANDRAAT et al. 2003b, WOBUS et al. 1997, MALTSEV et al. 1994). Auch eine Beschleunigung der Repolarisation (d.h. eine Abnahme der Aktionspotentialdauer (APD)) wurde beobachtet, v.a. für die frühe Phase der Differenzierung der Zellen (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Weiterhin kommt es im Verlauf der Differenzierung zu einer Zunahme der Spontanfrequenz, also einer Verkürzung der Zykluslänge zwischen den AP (FIJNVANDRAAT et al. 2003a, FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Andererseits stellen, wie erwähnt, in der späten Phase der Differenzierung die terminal ausdifferenzierten ESDC ihre spontane Aktivität zunehmend wieder ein (FÄSSLER et al. 1996a, vgl. 4.2.1 (S. 90)). Die Zunahme der  $V_{\max}$  im Verlauf der Differenzierung ist bedingt durch zunehmende Aktivität der  $\text{Na}_v$ -Kanäle (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Gleichzeitig nimmt die Anzahl Zellen mit einer durch relativ depolarisiertes Ruhemembranpotential, geringe  $V_{\max}$ , niedrige Amplitude und relative langsame Repolarisation (lange APD) charakterisierten AP-Morphologie (von einigen Gruppen als „*early pacemaker like*“ bezeichnet) ab (MALTSEV et al. 1994, WOBUS et al. 1997, FIJNVANDRAAT et al. 2003b, SACHINIDIS et al. 2003).

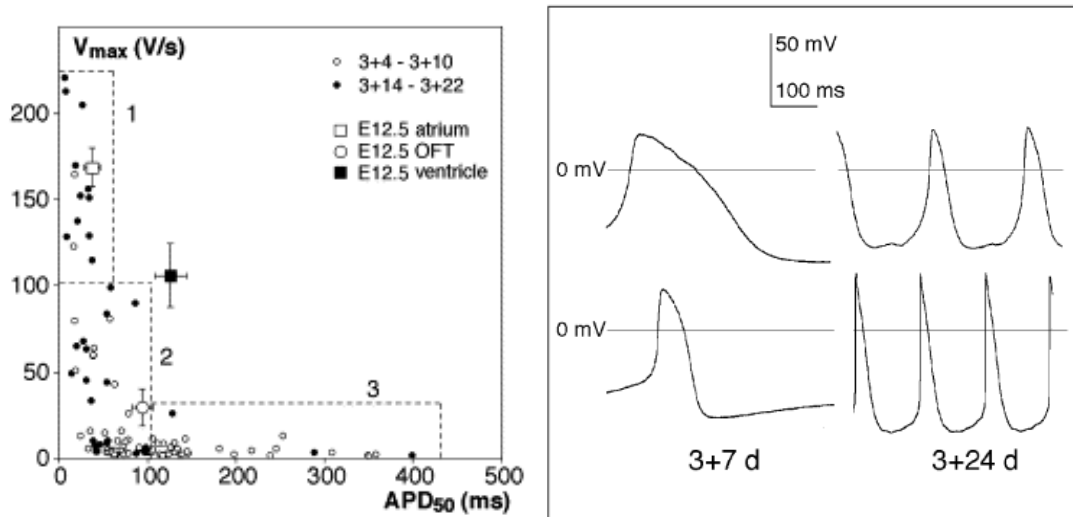
Ebenso wurden als „*atrial like*“ („Vorhof-ähnlich“, hohe  $V_{\max}$ , dreiecksförmige AP-Morphologie, eher schnellere Repolarisation) und „*ventricle like*“ („Ventrikel-ähnlich“, hohe  $V_{\max}$ , stärker ausgeprägte Plateauphase, eher langsamere Repolarisation) bezeichnete prototypische AP-Morphologien charakterisiert (MALTSEV et al. 1993, MALTSEV et al. 1994, WOBUS et al. 1997). Das zunehmende Auftreten dieser AP-Morphologien für späte Differenzierungsphasen (je nach Quelle „terminal differentiation phase“ ((7d+)9-18 Tage nach Plattierung der EBs; MALTSEV et al. 1994) oder



„cardiac specialization stage“ (14-26d) bzw. „terminal differentiation stage“ (37d; FÄSSLER et al. 1996a)) beschrieben. Allerdings gibt es bei einer Einteilung in solche Gruppen wohl keine strenge Trennung (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Vielmehr scheint eine starke Überlappung bzw. ein fließender Übergang zwischen diesen prototypischen Gruppen zu bestehen, wie sich schon an der APD als entscheidendes Kriterium der Unterteilung in „atrial like“ (APD 50-270ms ( $124 \pm 60$  ms)) und „ventricle like“ (APD 90-290 ms ( $148 \pm 56$  ms)) (MALTSEV et al. 1993) zeigt. Weiterhin unterscheiden sich diese AP-Morphologien sich stark von denen adulter muriner Kardiomyozyten der diesen Bezeichnungen entsprechenden Lokalisation (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Ebenso weisen ESDC eine deutlich andere Form der Zelle und Organisation der Sarkomere auf, als adulte Kardiomyozyten (HESCHELER et al. 1997, MUMMERY et al. 2002).

Auch konnte die von der Gruppe um Hescheler beschriebene Herausbildung *terminal* differenzierter Kardiomyozyten in umfangreichen Arbeiten (FIJNVANDRAAT et al. 2003a, FIJNVANDRAAT et al. 2003b) der Gruppe um Fijnvandraat und Moorman (elektrophysiologische, immunhistochemische und Genexpressions-Studien von ESDC der HM1 mES-Zelllinie bis zum 30. Tag nach Plattierung und Vergleich der Ergebnisse mit denen aus embryonalen Mäuseherzen) *nicht* festgestellt werden; Zellen mit einem dem adulten Myokard entsprechenden Phänotyp ließen sich kaum finden. Entsprechend wird von dieser Gruppe eine Klassifizierung der AP nach ihrer Ähnlichkeit zu adulten Phänotypen durch Fijnvandraat et al. abgelehnt. Anhand statistischer Cluster-Analyse teilen sie die von ihnen gemessenen APs in drei Gruppen ein, wobei die Übergänge der Gruppen ineinander auch hier wieder fließend sind (siehe Abb. 1-7):

- Zellen mit hoher  $V_{max}$  (=schnellem Aufstrich) und kurzer APD50 (=schneller Repolarisation bzw. kurze AP-Dauer) (Gruppe 1)
- Zellen mit geringer  $V_{max}$  und kurzer APD50 (Gruppe 2)
- Zellen mit geringer  $V_{max}$  und langer APD50 (Gruppe 3).



**Abb. 1-7:** Links:  $V_{max}$  zu  $APD_{50}$  der ESDC, Einteilung in die im Text beschriebenen Gruppen (1: hohe  $V_{max}$ , geringe APD; 2: geringe  $V_{max}$ , hohe APD; 3: geringe  $V_{max}$ , lange APD), zu beachten ist das Fehlen klarer Grenzen zwischen den Gruppen; zum Vergleich Mittelwerte aus embryonalen Kardiomyozyten (E12.5, OFT: Ausflusstrakt). Rechts: Repräsentative APs von 3d+7 (links, am ehesten Gruppe 3 (oben) und Gruppe 2 (unten)) zuzuordnen und 3d+24 ESDC (am ehesten Gruppe 1 (oben) und Gruppe 2 (unten)) (aus: FINJNVANDRAAT et al. 2003b, S. 406 und S. 407)

Sie stellten dabei fest, dass auch diese diese Klassifizierung letztendlich vor allem die beobachtete Entwicklung der Zunahme der  $V_{max}$  und Verkürzung der APD im Verlauf der Differenzierung illustriert. Passend zum Anstieg der  $V_{max}$  während der Entwicklung wurde eine signifikante Zunahme des depolarisierenden Natriumstroms  $I_{Na}$  festgestellt, ähnlich wie dies auch die Gruppe um Hescheler zeigen konnte (MALTSEV et al. 1994). Zusammen mit ihren immunhistochemischen Daten und Genexpressionsstudien kommen Fijnvandraat et al. zu dem Schluß, dass von den differenzierten ESDC fast keine einen terminal differenzierten Phänotyp entwickelt hätten, sondern ihr Phänotyp vielmehr mit dem junger embryonaler (etwa E9) Kardiomyozyten vergleichbar sei. Im Mittel der elektrophysiologischen Werte gleiche er dabei am ehesten embryonalen (E12,5) Zellen des Ausflusstraktes.

Es konnten mittlerweile unterschiedliche Muster von Ionenströmen festgestellt werden, die zur Ausbildung unterschiedlicher AP-Charakteristika in ESDC führen. So war erwartungsgemäß der Tetrodotoxin-sensitive  $Na^+$ -Strom  $I_{Na}$  in schneller depolarisierenden Zellen besonders ausgeprägt,  $I_f$  in Zellen mit hoher Schrittmacheraktivität deutlich stärker (ABI-GERGES et al.

2000, MALTSEV et al. 1994). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Plateau-Phase der AP in den ESDC – ebenso wie in adulten oder neonatalen Kardiomyozyten – wesentlich durch den L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal geprägt ist (MALTSEV et al. 1994).

Bedauerlicherweise sind – abgesehen von den von Fijnvandraat veröffentlichten Daten – jenseits der Charakterisierung der beschriebenen Subtypen nur sehr begrenzt statistische Daten über den zeitlichen Verlauf der einzelnen elektrophysiologischen Kenngrößen verfügbar. Insbesondere zur R1-ES-Zelllinie, welche den in der vorliegenden Arbeit genutzten Klonen zugrunde liegt, steht keine den o.g. Arbeiten vergleichbare Referenz zur Verfügung.

## **1.5 Extrazellulärmatrix, Kollagene und Integrine**

### **1.5.1 Extrazellulärmatrix**

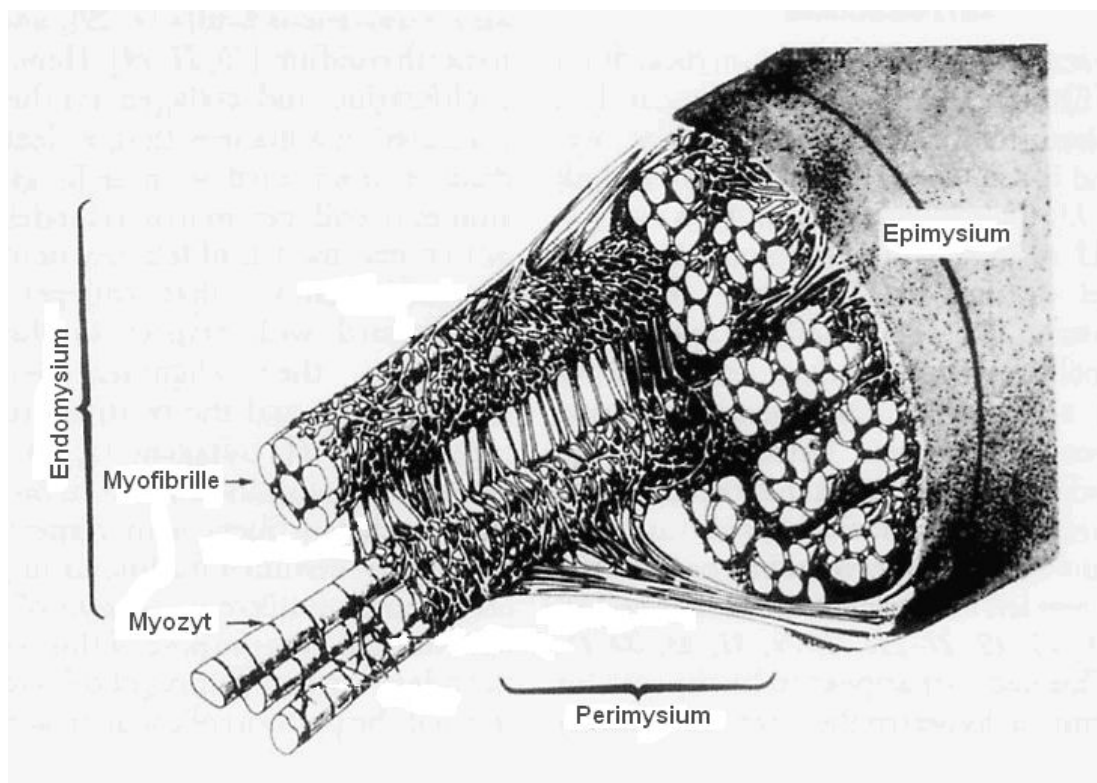
Die ECM besteht aus der Gesamtheit der Makromoleküle, die den Interzellularraum füllen, in den sie von den Zellen des jeweiligen Gewebes sezerniert werden. Sie kommt in fast allen Arten von Gewebe vor und bestimmt je nach Gewebetyp unterschiedlich stark dessen Eigenschaften. Sie entsteht als Fließgleichgewicht zwischen Synthese ihrer Bestandteile auf der einen und dem Abbau dieser Bestandteile auf der anderen Seite. Gleichzeitig regulieren z.B. Bestandteile der ECM via Zellrezeptoren die Genexpression, fungiert die ECM als Zytokin-Reservoir und dient der Signaltransduktion in Geweben. Die ECM hat dabei Einfluss auch auf Morphogenese, Zellfunktion, Proliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migrationsprozesse (BOSMAN und STAMENKOVIC 2003, CORDA et al. 2000, DANEN und SONNENBERG 2003). So besteht ein Mechanismus gegenseitiger Wechselwirkung, in dem die Zellen ihr Milieu gestalten, aber wiederum auch von ihm beeinflusst werden.

Nicht nur bei physiologischen Vorgängen, sondern auch bei pathophysiologischen, wie z.B. bei Herzinsuffizienz und -hypertrophie, spielt die ECM eine wichtige Rolle – so am offensichtlichsten beim fibrotischen Umbau von Organen, bei dem es zu einer unphysiologischen

Zusammensetzung und Vermehrung der ECM, insbesondere der Kollagene, kommt (BOSMAN und STAMENKOVIC 2003, HEENEMAN et al. 2003).

### 1.5.2 Kollagene

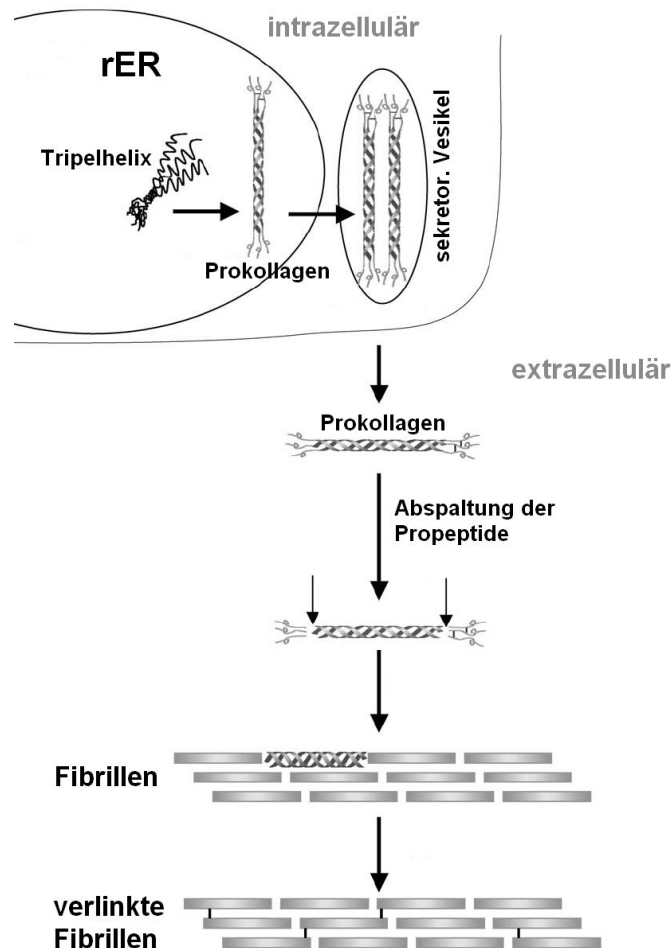
Die ECM des Herzens besteht vor allem aus Kollagenen, zu geringeren Teilen aus Fibronectin, Laminin, Elastin und Proteoglykanen. Die Kollagenmatrix bildet hierbei die Strukturen des Epimysiums (welches einzelne Muskelfasern umgibt), Perimysiums (welches Muskelfasern zu Faszikeln zusammenfaßt) und Endomysiums (welches den ganzen Muskel umgibt), wie es in Abb. 1-8 illustriert ist. (WEBER et al. 1994)



**Abb 1-8:** Epimysium, Perimysium und Endomysium (modifiziert aus: WEBER et al. 1987, S. 42)

Kollagene sind Homo- oder Heterotrimere aus jeweils 3 Glycin- und Prolinreichen Polypeptid-Ketten ( $\alpha$ -Ketten), welche sich in Form einer Tripelhelix zusammenlagern. Aus diesen Tripelhelices wiederum bilden die Kollagene der Typen I, II, III, V und XI Kollagen-Fibrillen. Von den 27 derzeit bekannten Kollagenen konnten 5 Typen im Herzen identifiziert werden: Typ I, III, IV, V und VI (CORDA et al. 2000). Den größten Anteil hierbei haben Kollagen Typ

I und III, welche zu den Strukturproteinen der ECM zählen (LÖFFLER 1999). Im druckbelasteten Herzen (z.B. bei Aortenstenose oder arterieller Hypertonie) kommt es durch Zunahme von Kollagen Typ I und III zu Fibrose (CHAPMAN et al. 1990, VILLARREAL und DILLMANN 1992).



**Abb. 1-9:** Kollagensynthese (modifiziert nach VIGUET-CARRIN et al. 2006, S. 322)

Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der ECM im Herzen, es macht dort etwa 85% des Gesamtkollagens aus (DHALLA et al. 1997, HEENEMAN et al. 2003). Bereits bei Herausbildung des Mesenchyms stellt das Kollagen Typ I im Embryo einen Hauptbestandteil der ECM in der späteren Herzanlage dar (NAKAJIMA et al. 1997). Im embryonalen Herzen wird Kollagen Typ I von epithelialen Zellen produziert, im fetalen, neonatalen und adulten Herzen jedoch ausschließlich von Fibroblasten (EGHBALI et al. 1988, EGHBALI et al. 1989). Kollagen Typ I besteht aus Tripelhelices aus jeweils zwei  $\alpha_1(I)$  und einer  $\alpha_2(I)$  Kette ( $[\alpha_1(I)]_2[\alpha_2(I)]$ -Struktur). Diese werden zunächst im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) synthetisiert und

anschließend im ER (v.a. durch Hydroxylierung) modifiziert. Durch Bildung von Disulfidbrücken kommt es dann zur Bildung der Tripelhelix des Prokollagens (molekulare Masse 120 kD), welches in den Extrazellulärraum sezerniert wird, wo es – nach Abspaltung der Propeptide – Kollagen-Fibrillen ausbildet, welche anschließend verlinkt werden (Abb. 1-9). (VAN DER REST & GARRONE, 1991, VIGUET-CARRIN et al. 2006, KING 2005, OMIM 2007) Bekanntestes Beispiel für eine Kollagen Typ-I-assoziierte Krankheit ist die Osteogenesis imperfecta (PROCKOP et al. 1979), in welcher die mechanische Stabilität der gebildeten Knochen beeinträchtigt ist. Es wurde zudem gezeigt, dass Kollagen Typ I auch wichtige Funktionen während der Organogenese hat (LOHLER et al. 1984). Eine defekte  $\alpha_2(I)$ -Kollagen-Synthese durch homozygote Mutation des kodierenden Gens führt in Mäusen zu einem der humanen Osteogenesis imperfecta vergleichbaren Bild. Die kardiale Entwicklung der Tiere ist dabei aber nicht beeinträchtigt (CHIPMAN et al. 1993).

$\alpha_1(I)$ -Kollagen wird kodiert durch das COL1A1-Gen, welches sich im Menschen am Lokus 17q21.31-q22 befindet (d.h. auf Chromosom 17 liegt) (OMIM 2007), in der Maus jedoch auf Chromosom 11 lokalisiert ist (MUNKE et al. 1986). Durch Integration des „Molony murine leukemia“-Retrovirus in die Keimlinie von Mäusen (Mov-13 Mäuse) konnte die Bildung von mRNA für das  $\alpha_1(I)$ -Kollagen in homozygoten Nachfahren komplett blockiert werden (SCHNIEKE et al. 1983, HARBERS et al. 1984). Diese homozygote Mutation führte dadurch zum völligen Verlust der Produktion von Kollagen Typ I (DZIADEK et al. 1987) und war nach Arrest der Entwicklung des Embryos zwischen dem 11. und 12. Tag nach Gestation pränatal letal durch Ruptur großer Gefäße zwischen dem 12. und 14. Tag (LOHLER et al. 1984, IRUELA-ARISPE et al. 1996), wie in Abb. 1-10 zu sehen ist.



**Abb. 1-10:** Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens ist embryonal letal: Massive Hämorrhagien durch Gefäßruptur (Pfeile) in einem homozygot defizienten (-/-) Mov-13 Embryo zum Zeitpunkt E13.5. Im Vergleich dazu ein Embryo mit heterozygot (-/+) erhaltener  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-Funktion. (Aus: IRUELA-ARISPE et al. 1996)

Eine Untersuchung des Einflusses der Kollagen Typ-I-Funktion auf Prozesse der kardialen Differenzierung *in vivo* ist somit nicht möglich. Die *in-vitro*-Differenzierung embryonaler Stammzellen erlaubt jedoch in Umgehung der embryonalen Letalität dennoch die Untersuchung der kardiomyozytären Differenzierung. Die bislang einzige Untersuchung dieser Fragestellung stammt von Qing Ding (DING 2000), welche mithilfe dieser Technik die kardiale Differenzierung einer ES-Zelllinie mit homozygotem KO des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens (R11 -/-, „KO“) mit der des Wildtyps (R11 +/+, „WT“) *in vitro* verglich. Dabei stellte sie in der morphologischen Auswertung Hinweise auf eine initial beschleunigte/verstärkte kardiomyozytäre Differenzierung im KO fest sowie gleichzeitig verminderte spontane Kontraktionsfrequenzen der Cluster von ESC im KO zu den Zeitpunkten 5d+3 und 5d+4. Diese Unterschiede glichen sich bis zum Zeitpunkt 5d+8 aus. Eine kompensatorische Hochregulation von  $\alpha_2(I)$ -mRNA bestand nicht. Aus den Ergebnissen der Arbeit wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass der Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens ausschließlich die sehr frühe Phase der Differenzierung beeinflusst, im weiteren Verlauf aber rasch kompensiert werde. (DING 2000) In einer anderen Arbeit wurde in homozygoten Embryonen Kollagen  $\alpha_1(I)$ -defizienter Mov-13-Mäuse (s.o.) gezeigt, dass es

dort bei Verlust des Kollagens Typ I gleichfalls zu keiner kompensatorischen Vermehrung des Kollagens Typ III kommt (IRUELA-ARISPE et al. 1996).

Kollagen Typ III ist – wie erwähnt – das zweithäufigste Kollagen im Herzen. Es ist ein Homotrimer aus 3  $\alpha_1(\text{III})$ -Ketten (VAN DER REST & GARRONE, 1991), welches retikuläre Fasern bildet und an der räumlichen Organisation der Kollagen Typ-I-Netzwerke mitwirkt (ARTEAGA-SOLIS et al. 2000, LIU et al. 1997). Kollagen  $\alpha_1(\text{III})$ -defiziente Mäuse haben eine deutlich verminderte Lebenserwartung: Sie bilden gehäuft Aneurysmata aus, Haupt-Todesursache bei ihnen ist die Ruptur großer Gefäße. Auch extravaskulär zeigen diese Tiere Symptome ähnlich dem Ehlers-Danlos-Syndrom Typ IV (LIU et al. 1997).

### **1.5.3 Integrine**

Integrine sind die wichtigsten Oberflächenrezeptoren, über welche Zellen mit der ECM in Kontakt treten und welche die Effekte der ECM auf und in die Zelle vermitteln (HYNES 2002, HESCHELER und FLEISCHMANN 2002). Sie dienen zum einen als Adhäsionsmolekül, wobei ihre zytoplasmatische Seite an Actin-Myofilamenten verankert ist. Zum anderen dienen sie, die Zellmembran penetrierend, der Signal-Transduktion. Sie interagieren mit Ionenkanälen, Hormonrezeptoren und Wachstumsfaktoren, haben Auswirkungen auf Gen-Transkription, Differenzierung, Proliferation und Überleben der Zelle sowie auf Struktur und funktionelle Aktivität des Zytoskeletts (YAMADA und MIYAMOTO 1995, BOSMAN und STAMENKOVIC 2003). Integrine gelten auch als vermutlicher Vermittler elektrophysiologischer Reaktionen auf mechanische Stimuli in Kardiomyozyten (VALENCIK et al. 2006).

Aufgebaut sind Integrine als obligate Heterodimere aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, von denen 18( $\alpha$ ) bzw. 8( $\beta$ ) Subtypen bekannt sind (HYNES 2002). Die nahe der Z-Scheibe lokalisierte  $\beta_1$ -Untereinheit erkennt Proteine der ECM, so v.a. auch Kollagene (TERRACIO et al. 1991, HYNES 2002). Sie kann mit mindestens 12 verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten binden und stellt damit die größte Unterfamilie der Integrine dar (GUAN et al. 2001)

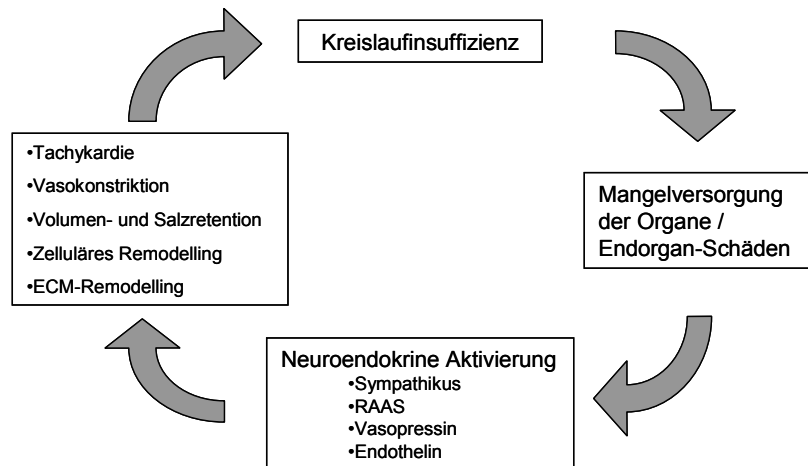
Der Knockout des  $\beta_1$ -Integrins führt zum Tod des (murinen) Embryos am 5,5ten Tag (FÄSSLER et al. 1996b, FÄSSLER und MEYER 1995, CZYZ und



WOBUS 2001). In der Differenzierung von ESDC aus  $\beta_1$ -Integrin-Knockout ESC zeigte sich eine schwer gestörte Kardiomyogenese. Insbesondere waren die APs der Zellen abnormal und zeigten eine ausbleibende Spezialisierung der ESDC, welche sich ebenso im Ausbleiben des Abfalls in der morphologischen Auswertung zeigte. Während die Expression des ersten herzspezifischen Transkripts in ESDC, des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals, im  $\beta_1$ -Integrin-KO früher als im WT begann, war die Expression von erst weiteren im Prozess der Ausreifung der Zellen auftretender Gene (ANF, MLC-2v,  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC) im KO gegenüber dem WT verspätet. Auch Sarkomere und Myofilamente waren im  $\beta_1$ -Integrin-KO vermindert und desorganisiert gebildet. (FÄSSLER et al. 1996a, GUAN et al. 2001). Dies zeigt die Wichtigkeit der Integrin-vermittelten Interaktion der Zellen mit der ECM für eine normale Kardiomyogenese.

## **1.6 Herzinsuffizienz**

Kardiomyozyten besitzen im Gegensatz zur Skelettmuskulatur keine Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Gewebeverlust im Herzen ist somit irreversibel und wird durch eine bindegewebige Narbe ersetzt. Stammzellen werden als wichtige mögliche Quelle zum Ersatz abgestorbenen oder zur Stärkung insuffizienten Herzgewebes angesehen (PERRY 2000). Herzinsuffizienz ist definiert als Unvermögen des Herzens, ein dem Bedarf des Gesamtorganismus angemessenes Herzzeitvolumen zu fördern, bzw. dies nur unter unphysiologisch erhöhten Füllungsdrücken zu leisten. Das klinische Syndrom Herzinsuffizienz ist geprägt von verminderter körperlicher Belastbarkeit und – teils massiver – Volumenretention und resultiert in einer verminderten Lebenserwartung. Pathophysiologisch hat sich mittlerweile primär das Modell der neuroendokrinen Aktivierung und des Remodelings gegenüber dem früher stark hämodynamisch geprägten Modell durchgesetzt (FRANCIS 2001, HERMANN und HASENFUSS 2004):



**Abb. 1-11:** Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz

Die in physiologischen Grenzen sinnvollen und nützlichen Kompensationsmechanismen werden dabei in einem Maße aktiviert, das letztlich zu einem nachteiligen Effekt auf die Herzfunktion führt. So entsteht ein Circulus vitiosus (Abb. 1-11). Zwar konnte die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz in den letzten 15 Jahren gerade durch Intervention in diesen Circulus vitiosus deutlich verbessert werden (z.B. durch ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker oder Aldosteron-Antagonisten). Liegt jedoch keine kausal therapierbare Grunderkrankung (beispielsweise ein operables Klappenvitium oder eine Koronarstenose ohne Myokardverlust) vor, so bleibt letztlich als einzige kurative Therapie in aller Regel noch immer nur die Herz-Transplantation.

Auch auf der Ebene einzelner Zellen kommt es bei Herzinsuffizienz zu pathophysiologischen Veränderungen. So unter anderem zu Veränderungen der Ionenströme und der AP-Morphologie (u.a. Verlängerung der APD, teilweise Sinusbradykardie) (NATTEL et al. 2007), Remodeling der elektromechanischen Kopplung (NEEF und MAIER 2007, HASENFUSS und PIESKE 2002), zu einer Abnahme der Myofilamente (LOWES et al. 1997) und Zunahme der Mikrotubuli (TAGAWA et al. 1998). Ebenso ist bei Herzinsuffizienz eine Re-Aktivierung embryonaler Expressionsmuster (FRANCIS 2001) und Wiederauftreten vor allem embryonaler Ionenströme (TAKEBAYASHI et al. 2006) zu beobachten.

Neben Hypertrophie der Kardiomyozyten sind auch deutliche Umbauvorgänge der ECM Bestandteil des kardialen Remodelings. So kommt es bei arterieller Hypertonie und chronischer Herzinsuffizienz zu verstärkter

Akkumulation insbesondere von Kollagen Typ I. Gleichzeitig ist die Vernetzung der Kollagene gestört. (WEBER UND BRILLA 1991, JANE-LISE et al. 2000, BRILLA et al. 1995, WEBER et al. 1994, MINER und MILLER 2006)

## **1.7 Mögliche therapeutische Anwendung von Stamm- und Vorläuferzellen**

Besonders in der Therapie der durch Verlust von Arbeitsmyokard durch Infarkt bedingten Herzinsuffizienz wäre ein Ersatz des untergegangenen Gewebes die bevorzugte therapeutische Option. Stammzellen bzw. die aus ihnen differenzierten Zellen sind hierfür eine mögliche zukünftige Quelle zur Gewinnung von transplantierbaren Kardiomyozyten oder ganzen Geweben. Die Transplantation kompletter Gewebe wirft jedoch eine ganze Reihe von Problemen auf, wie den Anschluss des Transplantats ans Kapillarnetz oder die Notwendigkeit der geordneten Weiterleitung der elektrischen Erregung innerhalb des Herzmuskels. Diese sind bislang ungelöst, so dass insbesondere die Implantation *einzelner Zellen* in das vorhandene Gewebe zunächst therapeutisch diskutiert wird. Diese könnten sich in das vorhandene Gewebe integrieren und dort Blutversorgung und elektrische Kontakte entwickeln. Eine weitere mögliche therapeutische Anwendung von Stammzellen in der Kardiologie bestünde in der gezielten Differenzierung rhythmogener Zellen aus ihnen, beispielsweise zum Ersatz eines abladerten dysfunktionalen Sinusknotens oder nach kompletter AV-Ablation bei chronischem Vorhofflimmern. So gelang es im Schwein, nach kompletter His-Ablation multiple Cluster humaner ESCs zu implantieren, welche als Ersatzschrittmacher wirkten und dabei sogar positiv chronotropes Ansprechen auf adrenerge Stimulation demonstrierten (KEHAT et al. 2004). (Kontroll-Injektionen undifferenzierter Stammzellen brachten hingegen keinen Effekt.)

Hoffnungen statt embryonaler auch mesenchymale oder hämatopoetische Stammzellen zum Gewebeersatz nutzen zu können (ORLIC et al. 2001, STRAUER et al. 2002, JANSSENS et al. 2006), scheinen sich hingegen nicht zu bestätigen und eine Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen

zu Kardiomyozyten im Infarktareal *nicht* stattzufinden (MURRY et al. 2004, BALSAM et al. 2004, NYGREN et al. 2004, JAQUET et al. 2005). Berichtete Therapieerfolge mit diesen Zellen beruhen wohl vielmehr eher auf parakrinen Effekten (FAZEL et al. 2006, TANG et al. 2005, DAI et al. 2005). Andererseits konnten bereits adulte Myozyten-Präparationen (Kardiomyozyten und Myoblasten aus Skelettmuskel) erfolgreich in Herzen transplantiert werden (KOH et al. 1993, JIA et al. 1997, MENASCHE et al. 2003). Jedoch zeigte sich dabei, dass die injizierten Myoblasten ein äußerst bedrohliches arrhythmogenes Substrat darstellen können (MENASCHE 2004). Zwar wurde auch für einzelne ESDC in vitro ein inertes arrhythmogenes Potential gezeigt (ZHANG et al. 2002), andererseits konnte gezeigt werden, dass nach akutem Myokardinfarkts in Ratten die Therapie mit murinen ESC Überleben und Herzfunktionsparameter auch langfristig (Studiendauer: 32 Wochen) verbessern kann. Hierbei konnte auch eine Differenzierung der applizierten Zellen (oder ihrer Abkömmlinge) zu Kardiomyozyten gezeigt werden (MIN et al. 2003). Die direkte therapeutische Transplantation noch undifferenzierter embryonaler Stammzellen verbietet sich jedoch, da diese in vivo Teratome bilden (KOLOSSOV et al. 2006, vgl. 1.3.1 (S. 8)). Deswegen kommen diese Zellen wohl vor allem als Quelle der aus ihnen zu gewinnenden bereits ausdifferenzierten Kardiomyozyten infrage. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die therapeutische Nutzung der bereits differenzierten Zellen wäre dafür ein Selektionsverfahren, mit dem sich eine sichere hochgradige Aufreinigung ausschließlich der ESDC erreichen ließe, da auch nach selektiver Transplantation ganzer ESDC-Cluster noch eine Teratom-Bildung festgestellt wurde (KOLOSSOV et al. 2006).

## **1.8 Fragestellung**

Zwischen ECM und Zellen bestehen komplexe Wechselwirkungen. So beeinflusst die ECM via Zellrezeptoren die Genexpression, fungiert als Zytokin-Reservoir und dient der Signaltransduktion in Geweben. Die ECM hat dabei Einfluss auch auf Morphogenese, Zellfunktion, Proliferation,

Differenzierung, Adhäsion und Migrationsprozesse. Auch die kardiomyozytäre Differenzierung wird durch die ECM beeinflusst.

Hauptbestandteil der ECM im Herzen ist Kollagen Typ I. Der Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens ist *in vivo* embryonal letal. Durch Differenzierung von Kardiomyozyten aus  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-defizienten ESC wird aber *in vitro* die Untersuchung seines Einflusses auf die Kardiomyogenese möglich.

Aus der genannten Vorarbeit ist bekannt, dass der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO eine initial erhöhte kardiomyozytäre Differenzierungsrate zeigt, wobei die spontanen Kontraktionsfrequenzen der Cluster von ESDC im KO zunächst verringert sind. Dabei wurde angenommen, dass der Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens nur die früheste Phase der Differenzierung beeinflusst und im Verlauf rasch kompensiert werde. Diese Annahme wurde als Arbeitshypothese für die vorliegende Untersuchung übernommen.

Es ist anzunehmen, dass die in der ganz frühen Differenzierung beobachteten Unterschiede der Spontanfrequenz der ESDC-Cluster zwischen KO und WT auf einen Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens auf die APs der Zellen zurückgehen. In der vorliegenden Arbeit soll deswegen der Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO auf AP von ESDC in der frühen Phase der Differenzierung bis zum Zeitpunkt 5d+15 untersucht werden.

Daraus ergeben sich folgende konkrete Aufgabenstellungen:

1. Etablierung der zu verwendenden Zelllinien vor Ort, d.h. Optimierung der Kulturbedingungen der undifferenzierten Zellen und der Differenzierungsversuche, um eine möglichst optimale kardiomyozytäre Differenzierung der Zellen zu erlauben.
2. Etablierung eines Verfahrens zur Patch-Clamp-Registrierung der AP aus ESDC, bei welchem die ECM intakt bleibt. Die etablierten Verfahren beinhalten bisher noch einen enzymatischen Verdau der ECM – einschließlich des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens.
3. Registrierung von AP aus Differenzierungsversuchen von WT und  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO ESDC zu den Zeitpunkten 5d+4 (Isolation am Tag der ersten spontanen Kontraktionen), 5d+8 und 5d+15.

Die zu beantwortenden Fragestellungen lauten dabei:

- Entspricht die bislang noch nicht untersuchte elektrophysiologische Differenzierung der verwendeten WT-Zelllinie den in der Literatur beschriebenen typischen Differenzierungsprozessen von ESDC?
- Lässt sich die berichtete initial beschleunigte Differenzierung im KO in der morphologischen Auswertung reproduzieren?
- Sind auf zellulärer Ebene die im  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO auf der Ebene ganzer Cluster von ESDC beobachteten Unterschiede in der Spontanfrequenz der Kontraktionen zum Zeitpunkt 5d+3/4 ebenfalls sichtbar?
- Sind diese unterschiedlichen Kontraktionsfrequenzen der Cluster von ESDC durch Unterschiede in der spontanen diastolischen Depolarisation (Phase 4) der Zellen bedingt?
- Unterscheiden sich die eigentlichen APs (Phase 0-3) im KO von denen des WT hinsichtlich des Verlaufs der eigentlichen APs und der Ruhemembranpotentiale?
- Lassen sich eventuelle Unterschiede zwischen KO und WT dabei auf das isolierte Vorhandensein bestimmter Subgruppen von Zellen zurückführen – oder handelt es sich vielmehr um einen generellen Effekt auf alle ESDC im KO?
- Ergeben sich hieraus Hinweise auf ein potentiell arrhythmogenes Risiko hinsichtlich des therapeutischen Einsatzes von ESC/ESDC in einer durch Remodeling veränderten ECM des Herzens bzw. einer Infarktnarbe?
- Bestehen Einflüsse des Kollagens auf AP, welche bei Herzinsuffizienz (in Anbetracht der Aktivierung embryonaler Programme und Ströme in den Kardiomyozyten hierbei) relevant sein könnten?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

Alle Arbeiten zur Zellkultur wurden unter S1-Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 95% relative Luftfeuchtigkeit und Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

#### Verwendete Zelllinien

Verwendet wurden Clone der Zelllinie R1 (NAGY et al. 1993)

RII-/- : Clone RII/803

RII+/+ : Clone RII/F4

(siehe DING 2000), freundliche Überlassung durch Prof. Dr. R. Fässler, Max-Planck-Institut für Biochemie / Martinsried.

Undifferenzierte ESC und Differenzierungsversuche wurden in Nunclon-beschichteten 60-mm-Zellkulturschalen (60-mm-Dish / Nunc GmbH, Langenselbold) kultiviert, welche zudem zuvor über Nacht bei 4°C mit 0,1% Gelatine beschichtet wurden, um eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. FL wurde auf Nunclon-beschichteten 100-mm-Zellkulturschalen (100-mm-Dish / Nunc GmbH, Langenselbold) ohne zusätzliche Gelatine-Beschichtung kultiviert.

#### **2.1.1 Routinevorgänge in der Zellkultur**

##### **2.1.1.1 Einfrieren von Zellen („Kryokonservierung“)**

Zum Einfrieren der Zellen werden Einfrierbehälter (Cryo 1°C Freezing Container (Cat.No. 5100-0001) / Nalgene bzw. Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) zur langsamen Herabkühlung der Einfrier-Röhrchen (Cryogenic Vial (Cat. No 5012), Naglene ) verwendet. Der Einfrierbehälter wird bereits vor Benutzung auf 4°C heruntergekühlt.

Nach Absaugen des Mediums werden kultivierte FL-Zellen durch Trypsinierung für 1 min, ES-Zellen durch zweimaliges Waschen mit Trypsin/EDTA gelöst, anschließend mittels einer Glaspipette mit 2 ml PBS vorsichtig gelöst und bei 2500 U/min 5 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes werden sie in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in die Einfrier-Röhrchen überführt und im Einfrierbehälter bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Später können sie zur längerfristigen Aufbewahrung in Flüssigstickstoff gelagert werden. FL wird ausschließlich in der 1. Passage eingefroren, während ESC auch in deutlich höheren Passagen noch nutzbar sind (s.u.).

### **2.1.1.2 Auftauen von Zellen**

Pro aufzutauendem Einfrier-Röhrchen wird ein 15 ml-Röhrchen (Red Cap / Sarstedt, Nümbrecht) mit 10 ml entsprechenden Mediums bei  $4^{\circ}\text{C}$  bereitgestellt. Die gefrorenen Zellen werden 3 min im  $37^{\circ}\text{C}$  Wasserbad aufgetaut, mit einer Glaspipette in das 15 ml-Röhrchen überführt und 5 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert und auf eine mit Medium bereitgestellte geeignete Zellkulturschale überführt. ESC sind in der Regel ab 2-3 Passagen nach dem Auftauen für Versuchsansätze nutzbar. FL wird nach Auftauen einmalig passagiert, bevor er zur ESC-Kultur genutzt wird.

### **2.1.1.3 Hitzeinaktivierung des fetalen Kälberserums**

FCS ist ein ganz wesentlicher Bestandteil der Kulturmedien, dessen Beschaffenheit auch die Effizienz und Richtung der Differenzierung der ESC beeinflusst (WOBUS und GUAN 1998, SACHINIDIS et al. 2003). Einzelne Chargen des selben Herstellers können sich dabei deutlich in ihrer Eignung unterscheiden. Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich FCS einer bestimmten Charge (siehe 2.8) verwendet, welche zuvor bereits erfolgreich in ESC-Versuchen eingesetzt worden war. Da FCS das für die ESC schädliche Komplement enthält, muss dieses vor Verwendung des Serums durch Erhitzen inaktiviert werden. Hierzu wird FCS aufgetaut und anschließend bei  $56^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad für 30 min erhitzt. Inaktiviertes FCS wird bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.



### **2.1.2 Feeder-Layer (FL)**

Als Feeder Layer (FL) wurden mittels Mitomycin C mitotisch inaktivierte embryonale Fibroblasten aus Mäuse-Embryonen der Zuchtlinie CD1 / NMRI verwendet. Die Tiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Dort wurde auch die Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation vorgenommen (Tierversuchsanzeige zur „Tötung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke“ nach § 4 TierSchG, Bezirksregierung Braunschweig, Az. T 11.02: „Embryonale Fibroblasten als Feeder Layer“).

#### **2.1.2.1 Gewinnung der murinen Fibroblasten für den Feeder-Layer**

Zur Gewinnung der FL-Zellen werden 15-17 Tage alte Embryonen aus unmittelbar zuvor getöteten, in 70% Ethanol gewaschenen Muttertieren präpariert. Die gesamte Präparation erfolgt steril. Das Muttertier wird an allen Extremitäten fixiert. Durch einen langen Medianschnitt wird zunächst die Bauchhaut, dann mit einem zweiten Besteck Muskelfaszie und Peritoneum durchtrennt. Nun ist die Bauchhöhle eröffnet, wonach die Uterushörner offenliegen. Mit einem dritten Präparationsbesteck wird der Uterus eröffnet. Die Embryonen werden entnommen, in PBS gespült, Plazenta und Fruchtblase abpräpariert und die Embryonen in eine PBS-gefüllte Schale überführt. Hier wird mit einem vierten Besteck sorgfältig der Kopf abgetrennt sowie die rudimentären Organanlagen von Herz und Leber entfernt, um möglichst reine Fibroblasten-Kulturen zu gewinnen. (Besondere Sorgfalt ist bei Entfernung der Leber wichtig, da sie embryonal blutbildendes Organ ist, um eine spätere Überwucherung der Kultur mit Zellen der hämatopoetischen Reihe zu vermeiden.) Das gewonnene Gewebe wird grob zerkleinert und in 5 ml 0,2%-Trypsinlösung mit einem Magnetrührer 25-40 min bei Raumtemperatur dissoziiert. Das gelöste Gewebe wird durch ein Sieb filtriert, 10 ml FL-Medium zugegeben und 5 min bei 2000 U/min (~800 G) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes werden die Fibroblasten in FL-Medium resuspendiert und je nach Menge auf 6-12 100-mm-Zellkulturschalen verteilt (Ziel ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro Schale). Anschließend werden die Zellen 24h inkubiert. Durch Mediumwechsel werden noch

vorhandene Erythrozyten, Zelldebris und nicht angeheftete Zellen entfernt. Aktuell nicht benötigter FL kann nun fraktioniert eingefroren werden. Benötigte Zellen werden nach 1-2 Tagen Inkubation im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 3 umgesetzt (1. Passage, s.u.). Die Zugabe von Penicillin/Streptomycin ist wegen der sauberen Präparation nicht notwendig.

### **2.1.2.2 Kultivierung / Umsetzen von Feeder-Layer**

Kultivierter FL zeigt ein schnelles Wachstum und muss täglich, spätestens nach 48 h, passagiert werden (sogen. „Subkultivierung“, d.h. Umsetzen der Zellen auf eine oder mehrere neue Kulturschalen, dabei „Verdünnung“ der Zellpopulation). Je nach Wachstum der Zellen (optische Kontrolle der Form und Dichte unter dem Mikroskop) werden diese dabei im Verhältnis 1 : 2 bis 1 : 4 umgesetzt. Nach Absaugen des alten Mediums werden die Zellen für 45-60 s mit 5 ml 0,2%-Trypsinlösung trypsinisiert, mittels einer Glaspipette mit FL-Medium abgespült und auf 100-mm-Zellkulturschalen verteilt (10 ml FL-Medium vorgelegt). FL wird nur bis zur IV. Passage genutzt.

### **2.1.2.3 Mitotische Inaktivierung des Feeder-Layers**

Bevor er zur Kultivierung von ESC genutzt werden kann, muss der FL mittels Mitomycin-C (MMC) irreversibel und vollständig mitotisch inaktiviert werden, um eine Überwucherung der Kulturen und eine Kontamination der Versuche durch proliferierende Fibroblasten zu vermeiden. Diese Inaktivierung muss täglich frisch erfolgen. Dazu wird das Medium durch 6 ml mit 300 µl MMC-Lösung versetztem FL-Medium ersetzt und die Zellen 2-3h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml PBS erfolgt dann dem für eine geeignete Bewuchsdichte (vgl. Abb. 2-1 (S. 36)) benötigten Verdünnungsverhältnis (1:3 bis 1:6) entsprechend das Umsetzen auf 3 bis 6 Gelatine-beschichtete 60-mm-Zellkulturschalen. Nach Inkubation über Nacht kann der inaktivierte FL kann nun zur ESC-Kultivierung verwendet werden.

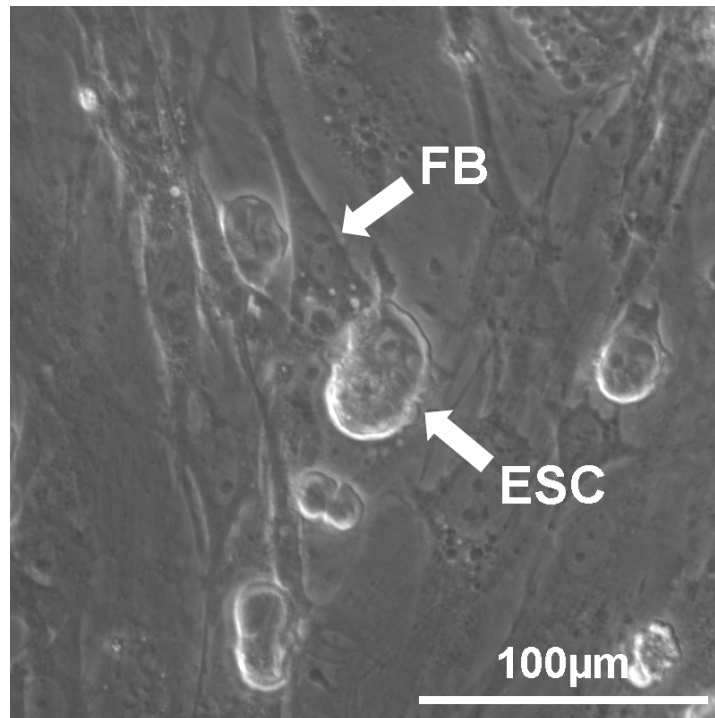


Abb. 2-1: Typische ESC auf FL (FB: Fibroblast)

### **2.1.3 Kultivierung undifferenzierter ESC**

Auch wenn Stammzellen unbegrenzt teilungsfähig sind, ESC sich also unbegrenzt in undifferenziertem Zustand in Kultur halten lassen sollten, sinkt die Qualität der Zellen mit hoher Passagezahl, weswegen diese häufig auf 20-30 Passagen beschränkt wird. (KRAL 2006, ZANDSTRA et al. 2000).

#### **2.1.3.1 Kulturbedingungen der ESC, Beurteilung der Kultur**

Nur unter geeigneten Kulturbedingungen behalten die ESC dauerhaft ihren undifferenzierten Zustand bei. Ihre Kultur erfolgt hierzu in LIF-supplementiertem Medium auf frischem, konfluent gewachsenem, mitotisch inaktiviertem FL der maximal 4. Passage auf Gelatine-beschichteten 60-mm-Zellkulturschalen. Sie müssen dabei alle 24-48h passagiert werden. Die Beurteilung der Zellen erfolgt dabei unter dem Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Mikroskop anhand ihres Aussehens (klein, rund-oval erhaben mit einem Halo sein und nur eine geringe Textur zeigen, vgl. Abb. 2-1), ihrer Populationsdichte und der Wachstumsgeschwindigkeit im Vergleich zu vorangegangenen Passagen. Anhand dessen wird auch täglich neu über das „Verdünnungs“-Verhältnis beim Umsetzen der Zellen entschieden (in der Regel 1 : 2 bis 1 : 5). Hierbei ist durch Umsetzen auf mehrere FL auch eine

Expansion der ESC-Kultur möglich. Sollte der Anteil an FL im Verhältnis zu den ESC zu groß sein, so kann während des Passagierens ein Pre-Plating (s.u.) erfolgen, um den FL-Anteil abzureichern.

### **2.1.3.2 Passagieren der ESC („Umsetzen“)**

Das Umsetzen erfolgt auf einen oder mehrere inaktivierte FL. Deren Medium wird sorgfältig komplett abgesaugt und durch ESC-Medium ersetzt. Das alte Medium der ESC wird abgesaugt. Die Zellen werden mit 3 ml Trypsin/EDTA einmal möglichst rasch gewaschen, anschließend mit erneut 3 ml Trypsin/EDTA für 45 s trypsinisiert. Die Trypsin-Lösung wird vorsichtig entfernt, sämtliche Zellen mit einer Glaspipette durch sorgfältiges Spülen mit 2 ml ESC-Medium abgelöst und resuspendiert. Der beabsichtigten Verdünnung beim Passagieren entsprechend wird nun ein Anteil dieser ESC-Suspension auf den bereitstehenden FL gegeben und gründlich verteilt.

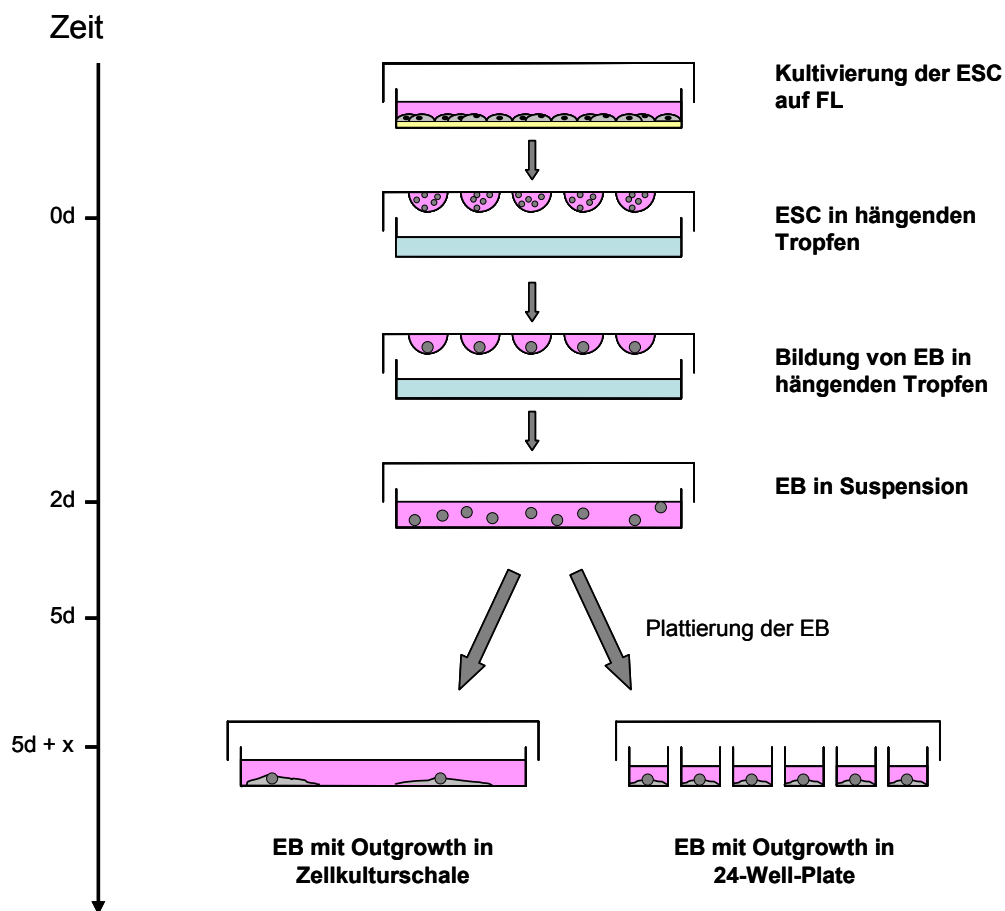
### **2.1.3.3 Pre-Plating**

Im Pre-Plating kann der Anteil des bei jeder Passage mit den ESC umgesetzten FL abgereichert werden. Dies ist dann sinnvoll, wenn im Verhältnis zum FL wenig ES-Zellen vorhanden sind, also etwa bei Umsetz-Verhältnissen von 1 : 1 oder 1 : 2. Hierzu werden die Zellen wie beim normalen Passagieren von der Kulturschale gelöst. Jedoch werden sie nun nicht direkt auf FL plattiert, sondern in einem Zwischenschritt auf eine normale 60-mm-Zellkulturschale (d.h. nicht Gelatine-beschichtet, ohne FL) mit Medium gegeben. Hier verbleiben sie bis zu 30 min. Während dieser Zeit heften sich viele Fibroblasten bereits an, während die ESC erst gering adhären. Nun werden die ESC durch sehr vorsichtiges Spülen mit der Glaspipette wieder mobilisiert und können nun auf neuen FL plattiert werden.

### **2.1.4 Differenzierungsversuche**

Für die Differenzierungsversuche werden die ESC in LIF-*freiem* Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Bildung der EBs wird die Methode der *Hanging Drops* („hängende Tropfen“) angewandt, wobei die in Tropfen der Zellsuspension enthaltenen Zellen unter dem Deckel einer Kulturschale hängend, durch Gravitation aggregieren, proliferieren und so den EB bilden

(WOBUS et al. 1991). Nach 2 Tagen werden die EBs aus den Tropfen gesammelt, weitere 3 Tage schwimmend kultiviert und anschließend (d.h. am 5. Tag, 5d) plattiert (siehe Abb. 2-2). In der Folge bildet sich um die EBs herum der *Outgrowth*, ein Auswuchs von Zellen, in welchem sich schließlich (etwa 3 Tage nach Plattierung, 5d+3) neben anderen Zelltypen Cluster spontan kontrahierender Kardiomyozyten bilden, zunächst nur vereinzelt, später in zunehmender Zahl und Größe.



**Abb. 2-2:** Zeitlicher Ablauf der Differenzierungsexperimente

Zum Ansetzen der Differenzierungsversuche werden ausschließlich morphologisch einwandfreie (s.o.) undifferenzierte ESC bis zur 45. Passage genutzt. Dabei wird darauf geachtet, dass der Anteil an (obgleich inaktivierten) FL-Fibroblasten in den zum Ansatz verwendeten ESC-Kulturen nicht zu hoch ist.

### 2.1.4.1 Hanging Drops

Jeder Tropfen (á 20 µl) soll die definierten Zellzahl von 300 ESC (vgl. 3.2 (S. 58)) enthalten. Hierzu müssen die Hanging Drops aus einer Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von 15.000 ESC pro 1 ml Ansatz-Lösung angesetzt werden. Pro Versuch werden etwa 480 Hanging Drops angesetzt. Die Tropfen werden auf die Unterseiten der Deckel von 6 mit jeweils 10 ml PBS gefüllten 100-mm-Zellkulturschalen aufgebracht. Hierfür werden die ESC wie beim Umsetzen der Zellen nach Trypsinierung mit Trypsin/EDTA mit Differenzierungs-Medium aus der Kulturschale gelöst und in ein Glasfläschchen überführt. Zur Bestimmung der Zellkonzentration werden Proben hieraus in 4 Thoma-Zählkammern ausgezählt und der Mittelwert daraus gebildet. Unterscheidungsmerkmale der ESC von FL-Fibroblasten sind beim Auszählen v.a. ihre runde Form, ihre etwas kleiner Größe und ihr Halo. Die ES-Zellkonzentration kann nun mit der Formel

$$ESC/ml = \frac{\text{Mittelwert ESC pro Kammer}}{64} * 10^6$$

berechnet werden. Die hieraus pro 5 ml Ansatz-Lösung zuzugebende Menge berechnet sich somit vereinfacht nach

$$\text{Zugabemenge} = \frac{4800}{\text{Mittelwert ESC pro Kammer}} \quad \mu\text{l Zellsuspension pro 5 ml Ansatz.}$$

Für die Ansatz-Lösung wird jeweils diese berechnete Menge Zellsuspension in zwei Glasfläschchen mit je 5 ml Differenzierungs-Medium gegeben. Mit einer Pipette werden nun jeweils 80 einzelne Tropfen der Ansatz-Lösung auf die Unterseite der Deckel einer Zellkulturschale aufgebracht, wobei regelmäßig resuspendiert wird. Die Deckel werden mit nach unten hängenden Tropfen auf die PBS-gefüllten Schalen gesetzt. Nun erfolgt die Inkubation für 2 Tage.

### 2.1.4.2 Hanging Drops in Suspension

Zum Aufnehmen der in den Hanging Drops gebildeten EBs werden die Hanging Drops mittels einer Glaspipette vorsichtig mit

Differenzierungs-Medium von ihren Deckeln abgespült und die EBs pro 100-mm-Deckel in jeweils eine *nicht-beschichtete* 60-mm-Zellkulturschale (Sarstedt, Nümbrecht) mit je 5 ml Differenzierungs-Medium überführt. Dabei müssen die Deckel wiederholt mit dem Medium gewaschen werden, um alle EBs zu sammeln. Die Inkubation erfolgt nun für weitere 3 Tage schwimmend in Suspension.

#### **2.1.4.3 Plattierung der EBs, weitere Kultivierung**

Nach 5 Tagen (5d, 2 Tage Hanging Drops + 3 Tage EBs in Suspension) werden die EBs zur weiteren Differenzierung auf Gelatine-beschichtete 60-mm-Zellkulturschalen sowie – zur morphologischen Auswertung (s.u.) – auf Gelatine-beschichtete „24-Well-Plates“ (Nunc GmbH, Langenselbold) plattiert und in Differenzierungs-Medium weiter inkubiert. Pro Differenzierungsversuch werden dabei mit Hilfe einer Pipette zwei 24-Well-Plates mit jeweils einem EB pro Well mittig zentriert bestückt. Die restlichen EBs werden zu je etwa 30 EBs auf die 60-mm-Zellkulturschalen verteilt. Nun erfolgt die weitere Inkubation, dabei kompletter Mediumwechsel alle 2 Tage. (Je 5 ml Differenzierungs-Medium pro Zellkulturschale bzw. 1 ml pro Well der 24-Well-Plates.)

## **2.2 Morphologische Auswertung**

In der morphologischen Auswertung (MALTSEV et al. 1994, BOHELER et al. 2002) wird derjenige Anteil der EBs bestimmt, in deren Outgrowth sich mindestens ein Cluster spontan kontrahierender Kardiomyozyten findet. Hierbei wird das reine Vorhandensein eines solchen Clusters gewertet, nicht jedoch dessen Größe oder die Häufigkeit solcher Cluster pro EB. Die morphologische Auswertung liefert somit einen nur semiquantitativen Parameter der stattgefundenen kardiomyozytären Differenzierung.

Die morphologische Auswertung erfolgt anhand der in die 24-Well-Plates plattierten EBs jeweils 2, 3, 4, 8 und 15 Tage nach Plattierung (5d+2, 5d+3, 5d+4, 5d+7, und 5d+14) der EBs. Der komplette Outgrowth jedes EBs wird unter dem DIC-Mikroskop systematisch durchgemustert und das Vorhandensein mindestens eines Clusters spontan kontrahierender

Kardiomyozyten als positiv gewertet. Sehr selten vorkommende nicht adhärierte EBs, d.h. frei schwimmende EBs ohne Outgrowth, werden aus der Wertung genommen. Diese Auswertung wird stichprobenartig (jeweils 1 von 2 24-Well-Plates) durch eine weitere Person kontrolliert.

### **2.3 Spezielle Isolationstechnik**

Die allgemein gebräuchliche Technik zur Gewinnung von Kardiomyozyten zur Patch-Clamp-Untersuchung besteht aus einem enzymatischen Verdau der die Zellen umgebenden ECM (mittels Kollagenasen, teilweise zusätzlich auch Trypsin). Zur Untersuchung von ESDC werden dabei Cluster spontan kontrahierender Zellen zunächst grob mechanisch aus der Kultur entfernt und anschließend enzymatisch verdaut. (Vgl. MALTSEV et al. 1994) dieser Methode sind zum einen der erheblicher Verlust der ohnehin relativ wenigen ESDC während des Prozederes, zum anderen, da der Verdau in  $\text{Ca}^{2+}$ -armer Lösung durchgeführt wird, eine zu mögliche Selektion derjenigen Zellen mit bereits robuster ausgeprägter  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase während der anschließenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Re-Introduktion. Dies wird jedoch in Kauf genommen, damit die vereinzelt Zellen eine ECM-freie Oberfläche als wesentliche Voraussetzung für ein Gigaseal haben (NEHER und SAKMANN 1976, HAMILL et al. 1981, SIGWORTH 1986, NUMBERGER und DRAGUHN 1996, MOLLEMAN 2003) und somit die Patch-Clamp-Untersuchung der Zelle ermöglicht wird.

Aufgrund der speziellen Fragestellung der vorliegenden Arbeit, nämlich der Untersuchung des  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagen-Einflusses, kommt ein enzymatischer Verdau der Zellen der hier untersuchten ESDC jedoch *nicht* infrage:

- Gegenstand der Vorliegenden Arbeit ist der Einfluss des  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagens auf die APs von ESDC. Nach enzymatischem Verdau der ECM ist eine Re-Synthese des Kollagens nach der Isolation durch die isolierten Kardiomyozyten nicht möglich, da Kollagen Typ I im embryonalen Herzen ausschließlich durch epitheliale Zellen (im fetalen, neonatalen und adulten Herzen ausschließlich durch



Fibroblasten) synthetisiert wird, nicht jedoch von den Kardiomyozyten selber (EGHBALI et al. 1988, EGHBALI et al. 1989). Nach Verdau der ECM könnte also just das in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende  $\alpha_1(I)$ -Kollagen nicht wiederhergestellt werden.

- Nach enzymatischer Isolation kommt es zunächst zu einer Dedifferenzierung der isolierten Zellen (EHLER und PERRIARD 2000), welche sich in der Folge erst über längere Zeit re-differenzieren. Da in der vorliegenden Arbeit aber gerade sehr frühe Prozesse der Kardiogenese untersucht werden sollen, sollte eine solche Verzögerung vor der Untersuchung nicht erfolgen.
- In embryonalen Kardiomyozyten kommt es infolge enzymatischen Verdau zu Verlust der Tetrodotoxin-Sensitivität ( $\text{Na}^+$ -Strom, siehe 1.2). Diese baut sich erst im Zuge der Protein-Resynthese der Zellen langsam wieder auf (SACHS et al. 1973).

Da die ESDC in der Kultur meist zwischen einer Deckschicht epithelartiger und einer basalen Schicht mesenchymaler Zellen liegen (HESCHELER et al. 1997, BOHELER et al. 2002) sind sie der Patch-Clamp-Untersuchung direkt in Kultur nicht zugänglich. Entsprechend mussten für die vorliegende Arbeit somit alternative Isolations- und Patch-Clamp-Techniken entwickelt werden, die eine Untersuchung der Zellen auch ohne vorhergehenden Verdau der ECM erlauben und im Folgenden dargestellt werden:

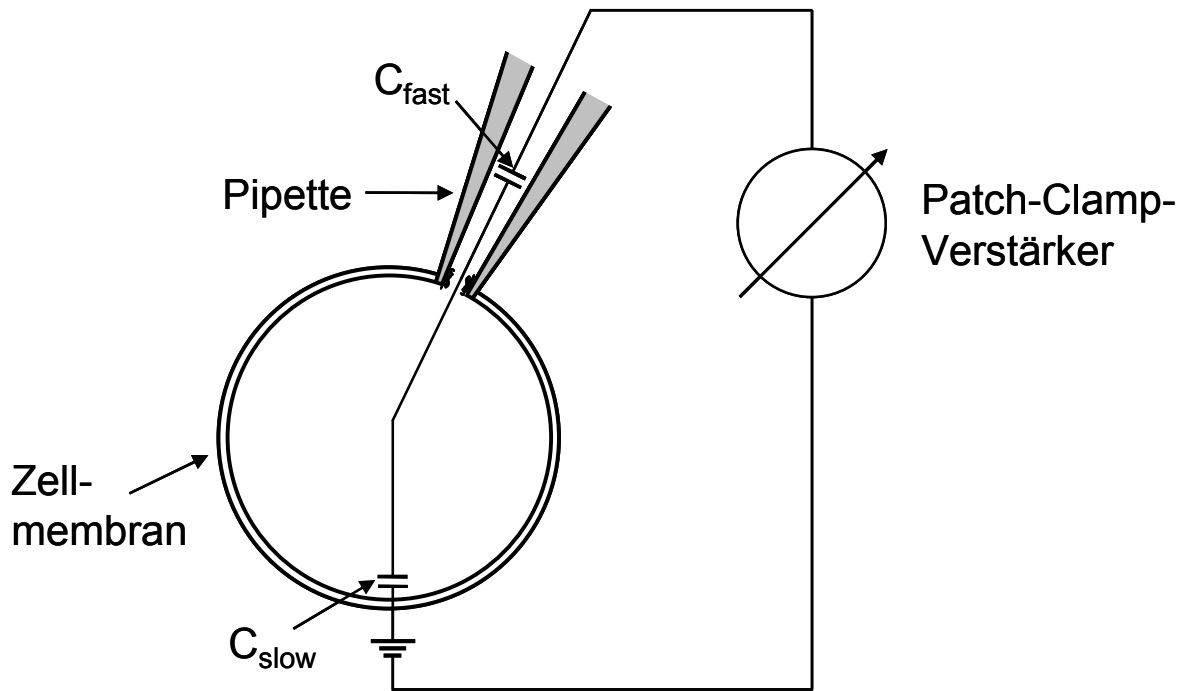
Um eine Kontamination zu vermeiden, erfolgt die Isolation der ESDC unter der Sterilbank. Ein mit 70% Ethanol gereinigtes Inversmikroskop (Axiovert 25 / Carl Zeiss AG, Oberkochen) wird dazu in die Sterilbank gebracht. Im Outgrowth der in 60-mm-Kulturschalen plattierten EBs werden Cluster spontan kontrahierender ESDC aufgesucht. Mithilfe eine Mikroskalpells werden die Ränder der sie bedeckenden Schicht epithelartiger Zellen durchtrennt, wonach sich diese vorsichtig abstreifen lässt. Mit dem Mikroskalpell wird das Cluster nun vorsichtig in Ausschnitte (im weiteren Text: „Aggregate“) von jeweils etwa 5-10 Zellen aufgeteilt, diese lassen sich durch vorsichtiges Saugen mit der Isolations-Pipette (s.u.) von der basalen Schicht lösen und aufnehmen. Aufgrund der recht geringen Adhärenz der

Kardiomyozyten untereinander ist eine Destruktion von ESDC durch diese Arbeitsschritte praktisch nicht zu beobachten. Es werden ausnahmslos alle Cluster einer Kulturschale isoliert. Die Aggregate werden mit der Isolationspipette (s.u.) in Gelatine-beschichtete 30-mm-Zellkulturschalen überführt und über Nacht bei 37°C in Differenzierungsmedium inkubiert. Anschließend besteht eine ausreichende Adhärenz der Aggregate am Boden der Schale, um die Patch-Clamp-Untersuchung unter Superfusion zu ermöglichen.

Zur Herstellung der Isolations-Pipetten wurden Pasteur-Pipetten aus Glas (Carl Roth GmbH / Karlsruhe) über dem Bunsenbrenner zu einer feinen Spitze ausgezogen und anschließend autoklaviert. Mittels eines autoklavierten Schlauchsystems mit zwischengeschaltetem sterilem Filterstück können die gelösten ESDC-Aggregate hiermit vorsichtig aufgenommen und steril überführt werden.

## **2.4 Patch-Clamp-Technik**

Die Patch-Clamp-Technik ist eine elektrophysiologische Methode, welche die Messung elektrischer Phänomene der Zelle, wie des Membranpotentials oder von Ionenströmen, erlaubt (NEHER und SAKMANN 1976). Eine sehr feine, Elektrolyt-gefüllte Mikropipette aus Glas wird eng auf die Zellmembran aufgesetzt, wodurch dieses Stück („Patch“) Membran elektrisch von der Umgebungslösung isoliert wird. Durch physikalische oder chemische Durchbrechung der Zellmembran unter der Pipette kann eine leitende Verbindung zum Zellinneren hergestellt werden. Mittels jeweils einer Elektrode in der Pipette und einer in der Umgebungslösung ist nun die Messungen von Strömen bzw. Spannungen über der gesamten Zellmembran möglich („Whole Cell-“ oder „Ganzzell-Modus“, siehe Abb. 2-3). Hierfür ist eine möglichst gute Abdichtung zwischen Pipettenspitze und Zellmembran (d.h. ein hoher Widerstand im Gigaohm-Bereich zur Umgebungslösung, ein sogenanntes *Gigaseal*) notwendig (NEHER 1991), dafür wiederum eine „Säuberung“ der Zellmembran von ECM-Bestandteilen.



**Abb. 2-3:** Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung der Patch-Clamp-Technik mit schnellen ( $C_{fast}$ ) und langsamen ( $C_{slow}$ ) kapazitiven Artefakten

### **2.4.1 Current Clamp**

Es gibt zwei verschiedene Messverfahren beim Patch Clamping: Spannungsklemme (*Voltage Clamp*) und Stromklemme (*Current Clamp*).

Beim Voltage Clamp wird das Membranpotential der untersuchten Zelle geklemmt, d.h. auf bestimmte Werte festgelegt, und die dabei fließenden Ströme gemessen. Im Current Clamp hingegen ist die gezielte Injektion von Strömen und die Messung des über der Membran anfallenden Potentials möglich. In erregbaren aber nicht spontan aktiven Zellen wird zur Registrierung von APs ein Strom in die Zelle injiziert, durch welchen diese bis zum Schwellenwert depolarisiert werden. In spontan elektrisch aktiven Zellen, wie den ESDC, ist dies nicht notwendig. Vielmehr erlaubt die passive Messung und der Verzicht auf eine Strominjektion erst die Registrierung der diastolischen Spontandepolarisation und der spontanen AP-Zykluslänge.

### **2.4.2 Kompensation von Störgrößen**

Eine korrekte Kompensation der kapazitiven Artefakte ist im Current-Clamp-Modus wichtig, da sich diese sonst Amplitude und Kinetik des AP-Verlaufs

verfälschen können (NUMBERGER und DRAGUHN 1996). Wesentlich sind hierbei  $C_{fast}$  und  $C_{slow}$ , die schnelle und langsame Komponente des kapazitiven Artefakts (Abb. 2-3). Erstere entsteht vorwiegend durch die Kapazität des Elektrolyts in der Pipette, letztere nach Ruptur der Zellmembran durch deren Beladung. Für die Messungen werden sie über den Patch-Clamp-Verstärker automatisiert bestimmt und ausgeglichen. Weiterhin müssen Offset-Potentiale abgeglichen werden, insbesondere das *Liquid Junction Potential*, die als Übergangsspannung zwischen Pipettenlösung und Badlösungen abfallende Spannung. Auch dieses kann durch die Kontroll-Software automatisiert geschehen.

### **2.4.3 Aufbau des Messstandes**

Der Messstand besteht aus einem schwingungsgedämpften Tisch mit darauf montiertem Faraday'schen Käfig zur Abschirmung elektromagnetischer Störungen, in welchem sich ein Inversmikroskop (Axiovert 200 / Carl Zeiss AG, Oberkochen), ein darauf an einen Mikromanipulator (Micromanipulator 5170 / Eppendorf AG, Hamburg) montierter Vorverstärker (EPC-9 / HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht) samt Pipettenhalter sowie die Superfusionsanlage und Superfusionsheizung (TC-342B Automatic Temperature Controller / Warner Instrument Corp., Hamden, USA) befinden. Mit dem Pipettenhalter verbunden ist ein dünnes, luftdichtes Schlauchsystem, über welches Druck bzw. Sog auf das Innere der Pipette angelegt werden kann. Ebenfalls mit dem Vorverstärker verbunden ist die Badelektrode aus massivem Silberchlorid (HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht). Der Pipettenhalter ist im Winkel verstellbar. Der Mikromanipulator erlaubt dessen Bewegungen in 3 Achsen über piezoelektrische Elemente, welche über eine Kontrolleinheit angesteuert werden. Die Superfusionsheizung lässt sich mittels eines einfachen mechanischen Mikromanipulators im Blickfeld des Mikroskops positionieren. Die Superfusion erfolgt durch Gravitation mit einem Fluss von etwa 80 ml/h, die kontinuierliche Absaugung des Mediums erfolgt über eine regelbare Walzenpumpe (Modell MV-CA / Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld). Die Kontrolle der Bad-Temperatur erfolgt mit einem elektronischen Thermometer

(DigiSense / Cole-Parmer Company, Vernon Hills, USA). Die Temperatur der Badlösung wird konstant bei etwa 32°C gehalten.

Außerhalb des Faraday-Käfigs steht der Patch-Clamp-Hauptverstärker, aus welchem die Signale über einen Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) an den zur Aufzeichnung der Messungen dienenden Computer weitergeleitet werden. Zur Aufzeichnung der Daten und Kontrolle des Verstärkers dient die Software „Pulse“ (Version 8 / HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht). Aufzeichnungen werden mit einer Abtastrate („Sampling Frequenz“) von 3000 Hz digitalisiert.

#### **2.4.4 Patch-Pipette**

Die Patch-Pipetten werden aus dünnwandigen Borosilicat-Kapillaren (1,2 mm Außendurchmesser) mit eingeschmolzenem Filament gezogen (Hugo Sachs Elektronik / March-Hugstetten, Artikel Nr. 30-0052). Es zeigte sich, dass relativ hochohmigen (4,5-5 MΩ) Patch-Pipetten mit schlank zulaufender Geometrie („geringer Taper“) am besten zur Untersuchung der ESDC geeignet sind. Zum Ziehen der Pipetten wurde der „DMZ Universal Puller“ (Zeitz Instrumente, München) verwendet. Anschließend erfolgte kurze Hitzepolitur der Pipettenspitzen unter optischer Kontrolle mittels einer Mikroforge (MF-90, Narishige Co. / Japan). Die Befüllung mit Pipettenlösung erfolgt unmittelbar vor Benutzung mithilfe einer Einfüllhilfe (Microfil / World Precision Instruments Inc. / Sarasota, USA) über einen Filter (0,2 µm Porengröße, Filtropur / Sarstedt AG, Nümbrecht).

Der für die Pipetten-Elektrode verwendete Silberdraht wird durch Eintauchen in eine Chlor-Bleichlauge über Nacht chloriert. Auch zwischen Benutzungen bleiben die Elektroden in dieser Lösung aufbewahrt. Nach spätestens einer Woche werden sie durch gründliches Abschleifen gereinigt (oder komplett ersetzt) und erneut chloriert, um Oxidation vorzubeugen.

#### **2.4.5 Pipettenlösung**

Um die Konstanz der Zusammensetzung der Pipettenlösung während verschiedener Messtage zu gewährleisten, wurde während der gesamten Versuchsreihe mit einem einzelnen Ansatz der Pipettenlösung gearbeitet, welcher in Aliquots á 2 ml (Eppendorf-Cup) bei -20°C eingefroren wurde.

Diese wurden erst unmittelbar vor Verwendung aufgetaut und dann auf Eis gelagert, da die Lösung das bei Raumtemperatur instabile Adenosintriphosphat (ATP) enthält.

#### **2.4.6 Badlösung**

Die Badlösung wird jeden Tag neu aus Stammlösung angesetzt. Sie wird dazu jeweils gepaart für die Untersuchung von WT- und KO-Zellen des selben Differenzierungsalters aus der selben Stammlösung angesetzt.

#### **2.4.7 Prinzipielles Vorgehen beim Patch Clamp**

Auf die einzelnen Schritte des angewendeten speziellen Vorgehens bei der Patch-Clamp-Untersuchung wird später im Detail eingegangen. Der grundlegende Ablauf sei hier aber schon einmal skizziert: Die Pipette wird mit Pipettenlösung befüllt und in den Pipettenhalter eingespannt. Es wird ein leichter Überdruck auf sie angelegt, anschließend wird sie in die Badlösung eingetaucht und an die zu untersuchende Zelle angenährt. Wie in der Literatur empfohlen (NUMBERGER und DRAGUHN 1996), erfolgt die Korrektur der Offset-Potentiale dann, wenn die Pipette bereits der Zelle angenährt, aber noch niederohmig mit der Badlösung verbunden, d.h. noch in einigem Abstand zur Zellmembran ist – kurz vor Bildung des Seals. Nach Etablierung des Seals wird  $C_{\text{fast}}$  kompensiert. Die Kommandospannung wird nun auf -60 mV gesetzt und die Membran durch Sog an der Pipette rupturiert. Jetzt wird  $C_{\text{slow}}$  abgeglichen. Nun wird der Verstärker in den Current Clamp-Modus geschaltet. Dabei wird für die AP-Messungen der Membranstrom nicht geklemmt, sondern passiv das Membranpotential registriert. Nach Abwarten der Äquibrierung von Pipettenlösung und Zytosol der Zelle (4 min) erfolgt nun die Aufzeichnung der spontanen APs.

Wichtige Qualitätskriterien für einen „guten Patch“ der in die Auswertung mit eingeht sind, dass der Widerstand des initiale Seals mindestens 3 G $\Omega$  betragen muss und der Zugangswiderstand zur Zelle nach Ruptur der Zellmembran nicht höher als 25 M $\Omega$  sein darf und während der Messung im ursprünglichen Bereich bleiben muss.

### **2.4.8 Modifiziertes Vorgehen beim Patch Clamp**

Es wurde aus o.g. Notwendigkeit ein zum enzymatischen Verdau alternatives Vorgehen zur weitgehenden „Reinigung“ der Zellmembran von ECM-Bestandteilen streng lokal im späteren Aufsetz-Bereich der Pipettenspitze entwickelt, was die Patch-Clamp-Untersuchung in Anwesenheit des die Zelle umgebenden Kollagens ermöglicht. Hierzu wurden zur Untersuchung anderer Gewebe bereits etablierte Techniken adaptiert:

Zur Patch-Clamp-Untersuchung von Neuronen direkt in intakten Schnitten aus Hirn-Gewebe existieren zwei alternative Techniken zum enzymatischen Verdau: Bei der „*Reinigungstechnik*“ (EDWARDS et al. 1989, NUMBERGER und DRAGUHN 1996) wird die Zelle durch wiederholtes Abspülen und Absaugen (durch Anlegen von Über- bzw. Unterdruck auf die Pipette) mithilfe einer sehr weiträumigen Reinigungs-Pipette von anhaftendem (im Hirn recht weichen) ECM-Material befreit, bis die Zellmembran schließlich ausreichend „sauber“ für ein erfolgreiches Sealen mit der normalen Patch-Pipette ist. In der „*Mischtechnik*“ (STUART et al. 1993, NUMBERGER und DRAGUHN 1996) wird stattdessen ein erhöhter Überdruck auf die Patchpipette angelegt. Hierdurch wird das an der Zelle anhaftende Material durch die austretende Pipettenlösung weggespült.

Für die vorliegende Arbeit wurden diese Techniken adaptiert bzw. ggf. kombiniert, wodurch eine *streng lokal* (im Bereich der später aufsetzenden Patch-Pipette) zur Bildung eines Gigaseals ausreichende Entfernung der ECM von der Zellmembran möglich ist: Das primäre Vorgehen ähnelt der Mischtechnik. Es wird zunächst die normale oben beschriebene Patch-Pipette verwendet. Als Zielpunkt zur späteren Positionierung der Pipette auf der Zelle wird ein Abschnitt der Zelle gewählt, welcher während der spontanen Kontraktionen möglichst keiner Bewegung ausgesetzt ist. Es wird zunächst ein deutlich *erhöhter* Druck auf die Pipette angelegt, so dass es zu einem kräftigen Austritt der Pipetten-Lösung kommt. Die Pipette wird der Zelle angenähert, bis eine deutliche Reinigung der Membran in von den als dunkel-flüchtig imponierenden ECM-Auflagerungen durch den Flüssigkeitsausstrom. Durch leichte seitliche Bewegungen der Pipettenspitze wird das so gereinigte Areal noch etwas vergrößert. Anschließend wird der erhöhte Druck auf der Pipette auf ein *normal niedriges* positives Druckniveau

reduziert und die Offset-Potentiale werden abgeglichen. Die Pipette wird nun der Zelle langsam weiter angenähert, bis der Teststrom sich auf etwa die Hälfte verringert hat, was durch Zunahme des Widerstandes zur Badelektrode bei Annäherung an die Zellmembran bedingt ist. Nun wird der Druck von der Pipette abgelassen. Falls jetzt keine spontane Seal-Bildung erfolgt, wird ein leichter Sog auf die Pipette gegeben und so ein Sealing versucht. Die Etablierung eines Seals zeigt sich in einem plötzlichen Anstieg des Widerstands auf mehrere Gigaohm (bzw. nicht mehr stabil messbare Werte). Aufgrund der Kontraktionen der Zellaggregate wird dabei darauf geachtet, dass das Seal über den gesamten Kontraktionszyklus hinweg gleichmäßig dicht ist.

Falls mittels der Mischtechnik keine ausreichende Säuberung der Zellmembran erzielt werden kann, wird zunächst mithilfe einer dafür gezogenen deutlich größerlumigen Reinigungspipette ( $\sim 0,6 \text{ M}\Omega$ ) entsprechend der Reinigungstechnik die Zielstelle durch vorsichtiges Absaugen der ECM-Strukturen grob gereinigt. Anschließend wird an dieser Stelle ein neuer Versuch mittels Mischtechnik unternommen.

## **2.5 Auswertung der Patch-Clamp-Registrierungen**

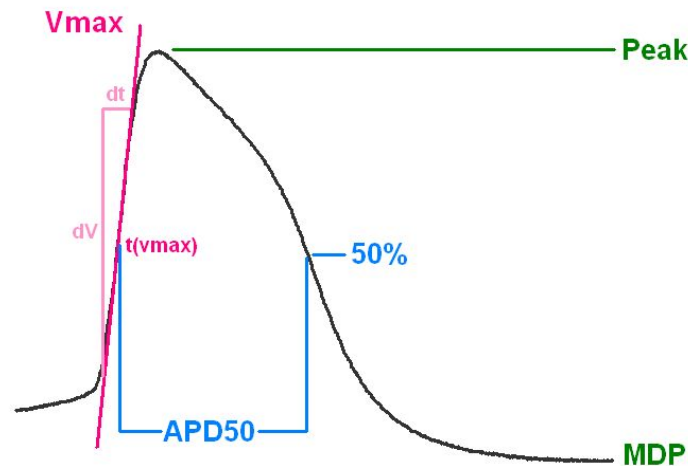
### **2.5.1 Auswertung der APs**

Die Rohdaten der registrierten AP werden aus der „Pulse“-Software exportiert, mittels „ABF-Utility“ (Synaptosoft Inc., Fort Lee, USA) konvertiert und in die „Clampfit“ Software (Clampfit 8 / Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) importiert. Hieraus erfolgt der Export eines APs (d.h. einer kompletten Sequenz von Beginn der Phase 4 bis zum Beginn der nächste Phase 4) in ein hierfür in MS-Excel (Microsoft Corp. / Redmond, USA) geschriebenes Auswertungs-Spreadsheet.

### **2.5.2 AP-Kenngrößen**

Die zur Beschreibung von APs verwendeten Kenngrößen sollen die Charakteristika bzw. Phasen eines APs abbilden. Der Bezug der wichtigsten dieser Kenngrößen zum AP ist in Abb. 2-4 und Abb. 2-5 dargestellt.





**Abb. 2-4:** Bestimmung von AP-Kenngrößen (Phase 4 zur besseren Übersicht nur teilweise dargestellt)

**MDP:** Die **maximale diastolische Polarisation**; ESDC als spontan aktive Zellen haben kein stabiles Ruhemembranpotential, weswegen ihre MDP als vergleichbarer Wert herangezogen wird; gängig ist bei ESDC dennoch hierfür die Bezeichnung „resting membrane potential“ (Ruhemembranpotential). Die MDP wird im Spreadsheet als maximal erreichte negative Polarisation der Zelle bestimmt. [MDP] = mV

**Peak:** Der positive Maximalwert des Membranpotentials im AP. [Peak] = mV

**Amplitude:** Ergibt sich als Differenz zwischen Peak und MDP. [Amplitude] = mV

**$V_{\max}$ :** Die *Depolarisationsgeschwindigkeit* während Phase 0 (Aufstrich) des APs ergibt sich als Membranpotentialänderung pro Zeit ( $dV/dt$ ). Die maximal während des APs erreichte Depolarisationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) ist also die Tangente der Aufstrichkurve an der Stelle ihrer maximalen Steigung.  $dV/dt$  ergibt sich als Quotient der Differenz der Membranpotentiale zweier aufeinanderfolgender Samples (Aufzeichnungszeitpunkte) durch deren zeitlichen Abstand, also

$$\frac{dV}{dt} = \frac{V(t_{n+1}) - V(t_n)}{t_{n+1} - t_n} \quad \left[ \frac{dV}{dt} \right] = \frac{mV}{ms}$$

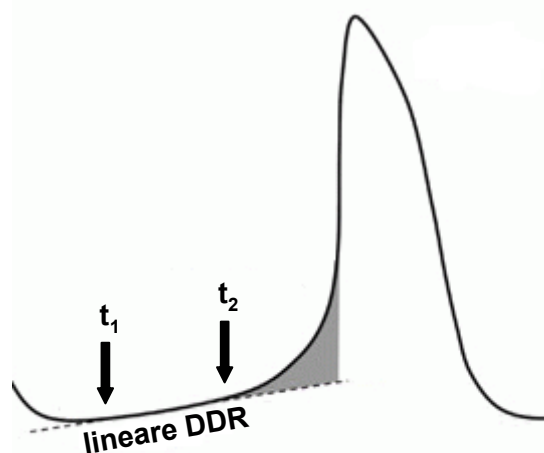
Dieses wird im Spreadsheet für jeden einzelnen Aufzeichnungszeitpunkt berechnet.  $V_{\max}$  ist das positive Maximum der so für das AP bestimmten Werte (also  $\text{Max}(dV/dt)$ ).

**APD50/80/90:** Die **Aktionspotential-Dauer** ist die Zeit *vom Beginn* des APs bis einer gewissen (50/80/90%igen) Repolarisation. Bei Untersuchung *stimulierter* APs in nicht spontan aktiven Zellen ist der Beginn des APs klar durch den Stimulus definiert. Bei den hier untersuchten *spontan aktiven* ESDC ist dies nicht möglich. Hier wurde der Zeitpunkt der schnellsten Depolarisation ( $t_{vmax}$ ), welcher wie bereits erwähnt nur wenige Millisekunden nach dem Beginn der Aktivierung der  $Na_V$ -Kanäle (also dem Überschreiten der Schwelle) liegt, als Beginn des APs definiert. Somit errechnet sich die APD bis zum Zeitpunkt einer gewissen Repolarisation ( $t_{Repol}$ ) hier nach

$$APD = t_{Repol} - t_{vmax} \text{ bzw. } APD = RT + (t_{peak} - t_{vmax})$$

**APD50-90:** Da die APD50 die beginnende (frühe Phase der) Repolarisation beschreibt, während die von AP-Beginn APD90 bis in die abschließend (späte) Phase der Repolarisation hinein gemessen wird, wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich die APD50-90, also die Zeit von 50% bis 90% Repolarisation, zur isolierten Messung der Dauer der abschließenden Repolarisationsphase herangezogen.

**DDR:** Die **diastolische Depolarisationsrate** gibt die Geschwindigkeit der diastolischen Depolarisation der Zelle in Phase 4 des APs an. Sie wird manuell bestimmt. Hierzu wird im AP ein repräsentativer Bereich der Phase 4 ausgewählt, welcher eine lineare Depolarisation zeigt (MALTSEV und LAKATTA 2008). Dieses wird in Abb. 2-5 veranschaulicht:



**Abb. 2-5:** Bestimmung der diastolischen Depolarisationsrate (DDR) (modifiziert aus MALTSEV und LAKATTA 2008, S. 275)

Die DDR ergibt sich dann als die Veränderung des Membranpotentials (V) zwischen Beginn ( $t_1$ ) und Ende ( $t_2$ ) dieses Intervalls dividiert durch dessen Dauer:

$$DDR = \frac{V(t_1) - V(t_2)}{t_2 - t_1} \quad [DDR] = \frac{mV}{s}$$

**RT50/80/90:** Um eine eventuelle Verzerrung durch unterschiedlich schnelle Depolarisationen der Zellen (unterschiedliche Dauer der Phase 0 des APs, bedingt durch unterschiedlich hohe  $V_{max}$ ) auszuschließen, wird neben der APD auch die *RT* bestimmt. Sie beschreibt die Zeit zwischen Erreichen des Peak-Wertes und einer gewissen Repolarisation. Für sie gilt entsprechend

$$RT = t_{Repol} - t_{Peak}$$

**Zykluslänge:** Sie beschreibt die zwischen zwei AP liegende Zeit, also die Dauer eines kompletten Zyklus aus MDP, spontaner Depolarisation, eigentlichem AP und erneuter Repolarisation zur MDP (Fijnvandraat et al. 2003b). Ihr Kehrwert entspricht damit der spontanen AP-Frequenz.

## 2.6 Statistik

Statistische Testung erfolgte mittels ungepaartem zweiseitigem T-Test bzw. Fisher Exact Test. Signifikanz wurde gegen einen Fehler von 5% erreicht ( $p < 0,05$ ). Der T-Test wurde in MS-Excel durchgeführt, Fisher Exact in GraphPad Prism 4 (GraphPad Software / La Jolla, USA) getestet.

## 2.7 Verwendete Lösungen

### 2.7.1 Patch-Clamp-Lösungen

#### Pipettenlösung (100 ml)

Substanz	Mol. Gew. [g/mol]	Firma	Konz. [mM]	g/ 100 ml
KCl	74,6	Merck	20	0,149
K-Aspartat	171,2	Sigma	110	1,883
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	203,3	Merck	6	0,122
Na <sub>2</sub> ATP	551,1	Sigma	5	0,276
HEPES	238,3	Sigma	10	0,238

Aqua bidest ad 100 ml.

pH-Wert mit KOH auf 7,2 einstellen.

Lösung á 2 ml aliquotieren und einfrieren.

Aufgetaute Lösung immer auf Eis lagern!

(Tab. 2-1)

#### 10fach konzentrierte Stammlösung der Badlösung (glucosefrei)

Substanz	Mol. Gew. [g/mol]	Firma	Konz. [mM]	g/l
NaCl	58,4	Merck	1350	78,89
KCl	74,6	Merck	54	4,03
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	138,0	Merck	3,3	0,46
HEPES	238,3	Sigma	100	23,83
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	203,3	Merck	10	2,03

Aqua bidest ad 1000 ml.

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen.

Stammlösung im Kühlschrank aufbewahren.

(Tab. 2-2)

## Badlösung

Für 500 ml Badlösung (1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )

Substanz	Menge
Stammlösung 10fach	50 ml
Glucose (wasserfrei)	0,9 g
$\text{CaCl}_2$ 1 M (Sigma)	0,9 ml
Aqua bidest	ad 500 ml

Aqua bidest ad 500 ml.

pH 7,4 bei 35°C

(Tab. 2-3)

## 2.7.2 Zellkultur-Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, werden alle Lösungen steril angesetzt, bei 4°C gelagert und bei Raumtemperatur verwendet. FCS wird dauerhaft bei -20°C gelagert, aufgetaut nach Hitzeinaktivierung bei 4°C.

### Trypsin 0,2%

Trypsin	2,2 g
PBS	100 ml

Mit Magnetrührer bei 250 upm rühren, bis vollständig gelöst. Anschließend steril abfiltrieren.

(Tab. 2-4)

### Trypsin/EDTA

Gleiche Volumina von Trypsin 0,2% und EDTA 0,02%.

### Mitomycin C (MMC) Stammlösung

Mitomycin C	2 mg
PBS	10 ml

Mit Magnetrührer 5 min bei 250 upm rühren. Anschließend steril abfiltrieren, zu je 630 µl aliquotieren und bei -20°C lagern.

(Tab. 2-5)

**$\beta$ -Mercapto-Ethanol ( $\beta$ -ME) Stammlösung**

$\beta$ -Mercapto-Ethanol	7 $\mu$ l
PBS	10 ml

Steril abfiltrieren. Wöchentlich neu ansetzen.

(Tab. 2-6)

**MTG Stammlösung**

MTG:  $\alpha$ -Monothioglycerol 3-mercapto-1,2-propandiol

MTG	13 $\mu$ l
IMDM	10 ml

Steril abfiltrieren. Wöchentlich neu ansetzen.

(Tab. 2-7)

**Gelatine 0,1%**

Gelatine 1%	10 ml
PBS	90 ml

(Tab. 2-8)

**Gelatine 1%**

1% bovine Gelatine in Aqua bidest gelöst, autoklaviert.

**FL-Medium**

DMEM	425 ml
FCS	75 ml

KEIN Zusatz von Antibiose.

(Tab. 2-9)

**ESC-Medium**

DMEM	415 ml
NEAA	5 ml
B-ME Stammlösung	5 ml
FCS	75 ml
LIF	50 $\mu$ l

LIF-Konzentration damit  $10^6$  Einheiten/l

(Tab. 2-10)

**Differenzierungs-Medium**

IMDM	395 ml
NEAA	5 ml
FCS	100 ml
MTG Stammlösung	1500 µl

(Tab. 2-11)

**Einfrier-Medium**

DMEM	18 ml
DMSO	2 ml
FCS	5 ml

(Tab. 2-12)

**2.8 Substanzen**

CaCl<sub>2</sub> Lösung 1 M: (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH / Seelze)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, "High Glucose Variante" (4,5 g/l D-Glucose) (Biochrom AG / Berlin)

DMSO: Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

EDTA-Lösung 0,02%: Ethylendiamintetraacetat in PBS (SERVA Electrophoresis GmbH / Heidelberg)

FCS: Fetal Calf Serum / Fetales Kälberserum (Gibco über Invitrogen GmbH / Karlsruhe, Chargen-Nummer 40Q6220K)

Gelatine: bovine Gelatine (Fluka über Sigma-Aldrich)

IMDM: Iscove's modified DMEM (Biochrom)

LIF: Leukämie inhibierender Faktor (Chemicon über Millipore Corp. / Billerica, USA)

MMC: Mitomycin C (SERVA)

MTG: α-Monothioglycerol 3-mercapto-1,2-propandiol (Sigma-Aldrich)

NEAA: Nichtessentielle Aminosäuren / Non Essential Amino Acids (Gibco über Invitrogen)

PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei, Biochrom)

Trypsin 1:250 Trockensubstanz: (Gibco über Invitrogen)

$\beta$ -Mercapto-Ethanol (SERVA)



### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Zur Art der Darstellung der Daten**

In der vorliegenden Arbeit wurden aus embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten zu verschiedenen Differenzierungszeitpunkten untersucht. Dabei findet einerseits im zeitlichen Verlauf ein weiteres Wachstum des Outgrowth der EBs statt, in welchem sich später neu gebildete Kardiomyozyten finden, so dass zum selben Untersuchungszeitpunkt isolierte ESDC ein unterschiedliches Alter haben können. Andererseits zeigen ESDC zudem vor allem auch sehr unterschiedliche AP-Formen. Somit stellen die Messungen nicht eine Stichprobe aus einer *einheitlichen* Population dar, sondern liefern vielmehr ein Abbild einer sehr *heterogenen* Population.

Diesem wurde auf zwei Arten versucht, Rechnung zu tragen: Zum einen in den Messungen dadurch, dass eine hohe Zahl an Registrierungen angestrebt wurde (ca. 50 AP pro Zelllinie pro Untersuchungszeitpunkt). Zum anderen in der Auswertung: Da für solch heterogene Populationen der Mittelwert nur bedingt aussagekräftig ist, wurde eine weitere Form der Darstellung und der qualitativen Auswertung gewählt. In dieser werden für einen gemessenen Parameter die gemessenen Werte *der Größe nach geordnet* auf der Ordinate abgebildet. Auf der Abszisse ist die „Position“ dieses Messwertes in der Reihenfolge der Gesamtzahl der gemessenen APs aufgetragen. Bei 50% liegt damit der Median, bei 100% der maximale gemessene Wert usw. Aus dieser Art der Darstellung lässt sich unmittelbar ansehen, welche Werte häufig vorkommen bzw. welche Werte nur vereinzelt vorkommen, weswegen im Text auch der Begriff *Häufigkeitsdiagramm* für solche Abbildungen benutzt wird. Entsprechend lässt sich im Vergleich der Abbildungen der verschiedenen Untersuchungszeitpunkte oder der verschiedenen Zelllinien unmittelbar ansehen, inwiefern Unterschiede in der Häufigkeit von Zellen mit bestimmten Messwertgrößen bestehen und wodurch sich Unterschiede ergeben. So könnte eine Erhöhung des Mittelwerts eines Parameters in einer Zelllinie beispielsweise genauso gut

durch grundsätzlich höhere Messwerte bedingt sein, wie durch lediglich eine Subgruppe von Zellen mit stark erhöhten Werten bei ansonsten weitgehend identischen Messwerten in dieser Zelllinie.

In den Abbildungen bezeichnet ein Sternchen (\*) einen zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt im KO signifikant gegenüber dem WT unterschiedlichen Wert, eine Raute (#) bezeichnet eine signifikante Veränderung gegenüber dem vorangehenden Beobachtungszeitpunkt *innerhalb des selben* Genotyps, ein Paragraphen-Zeichen (§) nach 5d+15 gegenüber 5d+4 signifikant unterschiedliche Werte.

### **3.2 Optimierung der Differenzierungsversuchs-Ansätze**

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen wurde Vorversuche unternommen, in welchen die Bedingungen der Differenzierungsversuche hinsichtlich einer möglichst guten kardiomyozytären Differenzierung optimiert wurden. Angesichts der bereits angeführten Einflussgrößen auf die ESC-Kultur und die Differenzierung lassen sich diese nicht ohne weiteres von einem Labor auf das andere übertragen.

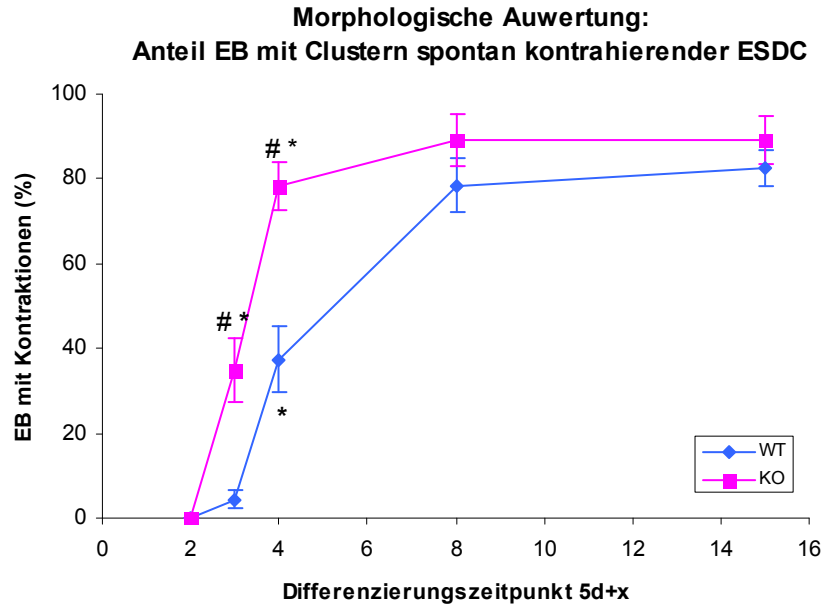
Um dabei eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu den bereits von Ding mit den selben Zelllinien vorgenommenen Versuchen zu gewährleisten wurden Medien der bereits von Ding (DING 2000) erfolgreich mit diesen Zellen verwendeten Zusammensetzung (mit Ausnahme des in dieser Charge nicht mehr verfügbaren FCS) verwendet. Es verblieb somit die pro hängendem Tropfen angesetzte ES-Zellzahl als wesentliche zu optimierende Einflussgröße auf die Differenzierungsversuche. Je nach verwendeter Zelllinie und Umgebungsbedingungen sind deutlich unterschiedliche Zellzahlen pro Hanging Drop zur kardiomyozytären Differenzierung optimal; so finden sich in der Literatur eingesetzte Zellzahlen von 200-800 Zellen pro Tropfen.

Als Kriterium für eine normal funktionierende Differenzierung wurde in Anlehnung an den „Embryonic Stem Cell Test“ (SPIELMANN UND SCHOLZ 2002) die morphologische Auswertung der Versuche nach 5d+2, 5d+3, 5d+4 und 5d+7 verwendet. Hierzu wurden sowohl für WT, als auch für KO jeweils

3 Probeversuche aus der selben ESC-Kultur mit Ansätzen von 200, 300, 400, 600 und 800 Zellen pro Tropfen durchgeführt und zu den angegebenen Zeitpunkten morphologisch ausgewertet. Es zeigte sich, dass unter den hiesigen Bedingungen für den WT die Zellzahlen von 300 und 400 Zellen pro Tropfen die besten Ergebnisse lieferten (regelmäßig erste Kontraktionen nach 5d+3 mit leicht stärkerer kardiomyozytärer Differenzierung bei 300 Zellen pro Tropfen). Gleichzeitig zeigten sich bei 300 Zellen pro Tropfen die in der morphologischen Auswertung bereits bekannten Unterschiede zwischen WT und KO (höherer Anteil spontaner Kontraktionen des KO in der morphologischen Auswertung (DING 2000) deutlicher, als bei 400 Zellen pro Tropfen. (Siehe 6.4.) Vor diesem Hintergrund wurde für die durchzuführenden Versuche die Zahl von 300 ESC pro Tropfen gewählt.

### **3.3 Morphologische Auswertung**

In der vorliegenden Untersuchung wurden frühe Prozesse der kardiomyozytären Differenzierung bis 5d + 15 untersucht. Hierzu wurde die morphologische Auswertung als semiquantitatives Maß für die Herausbildung von ESDC in n=6 Differenzierungsversuchen im WT und n=4 Differenzierungsversuchen im KO durchgeführt. Dies entspricht bei jeweils 40-48 EB pro Versuch damit insgesamt 257 EB im WT und 178 EB im KO. Dabei zeigt der WT, wie in Abb. 3-1 zu sehen ist, im Untersuchungsintervall einen normalen Verlauf dieses Differenzierungs-Parameters: Erste spontane Kontraktionen sind nach 5d+3 zu sehen, wobei zu diesem Zeitpunkt lediglich  $4,47 \pm 1,98\%$  der untersuchten WT-EBs Cluster kontrahierender ESDC enthielten. Innerhalb eines Tages, nach 5d+4, war dieser Anteil stark gestiegen auf nunmehr  $37,46 \pm 7,90\%$  ( $p=0,002$  im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt). Bis 5d+8 kam es zu einer weiteren erheblichen Zunahme auf nunmehr  $78,46 \pm 6,27\%$  ( $p=0,002$  zum vorherigen Zeitpunkt). Dies legt nahe, dass auch bis zu diesem Zeitpunkt noch in deutlichem Umfang eine Neubildung von ESDC stattgefunden hat. Im weiteren Verlauf ist nur noch eine geringe, im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt nicht mehr signifikante ( $p=0,618$ ) Zunahme auf  $82,38 \pm 4,31\%$  nach 5d+15 zu beobachten.



**Abb. 3-1:** Morphologische Auswertung

#: signifikant vs. WT, \*: signifikant vs. vorhergehender Zeitpunkt

Im Gegensatz dazu zeigt der KO in der morphologischen Auswertung eine beschleunigte kardiomyozytäre Differenzierung im Sinne einer beschleunigten Bildung von spontan kontrahierenden ESDC-Clustern, wobei bereits nach 5d+3 mit  $34,77 \pm 7,56\%$  ein Wert erreicht ist, der signifikant höher ( $p < 0,01$ ) als der im WT ist und welchen der WT erst nach 5d+4 erreicht. Deutlicher noch werden die Unterschiede am nächsten Untersuchungszeitpunkt, nach 5d+4: Bis zu diesem nimmt der Anteil von EBs mit spontan kontrahierenden Zellen im KO noch einmal signifikant ( $p < 0,01$ ) zu und erreicht damit nach 5d+4 mit  $78,35 \pm 5,51\%$  bereits einen erneut im Vergleich zum WT signifikant ( $p < 0,01$ ) höheren Wert, welcher im WT erst nach 5d+8 erreicht wird. Im weiteren Verlauf kommt es im KO zu einer weiteren Zunahme des Wertes der morphologischen Auswertung auf  $89,25 \pm 6,21\%$  nach 5d+8. Diese Zunahme ist im KO aber bereits nicht mehr signifikant ( $p = 0,909$ ) – im Gegensatz zum WT, welcher in diesem Zeitraum noch eine signifikante Zunahme zeigt. Auch im weiteren Verlauf, bis 5d+15, kommt es zu keiner weiteren Zunahme mehr ( $p = 0,989$ ).

### **3.4 Aktionspotentiale**

#### **3.4.1 Umfang der Stichprobe**

In beiden Zelllinien (WT und KO) wurden zu den 3 unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten 5d+4, 5d+8 und 5d+15 folgende Anzahlen von AP registriert:

	WT	KO
5d+4	64	51
5d+8	50	52
5d+15	47	56

Tab. 3-1

Da sämtliche der im Folgenden dargestellten Parameter aus dieser Stichprobe von AP bestimmt wurden, wird darauf verzichtet, die Anzahl der ausgewerteten AP dort jeweils erneut zu nennen.

#### **3.4.2 AP-Morphologien**

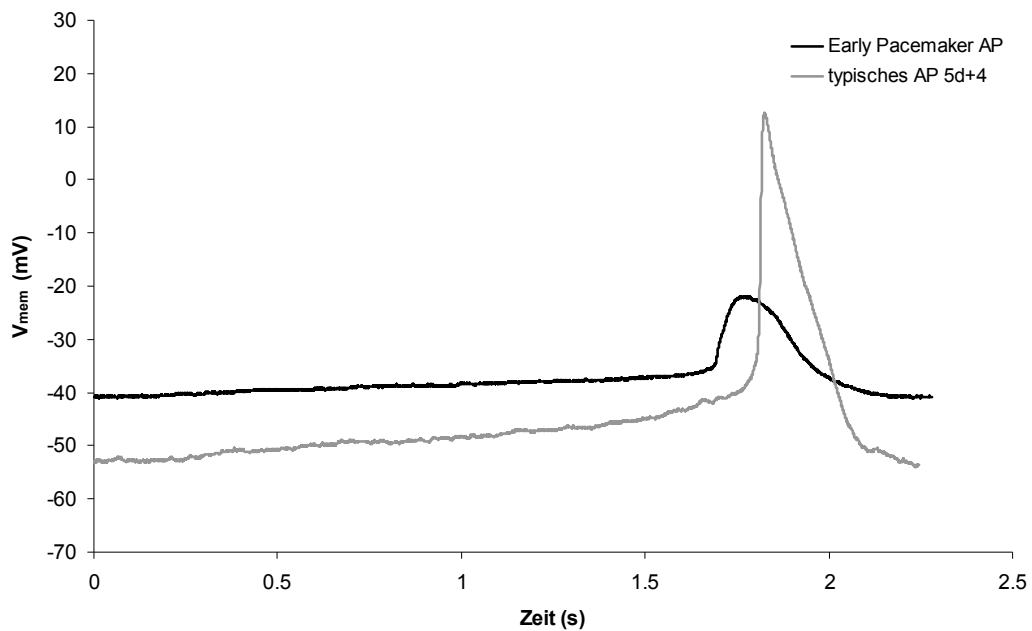
Für ESDC wurden in der Literatur verschiedene prototypische AP-Morphologien charakterisiert. Die Problematik einer solchen Einteilung wurde bereits diskutiert (in 1.4.2).

Zwar zeigt sich auch in der vorliegenden Arbeit die in der Literatur beschriebene starke Heterogenität von AP-Morphologien, welche eine eindeutige Zuordnung eines APs zu diesen prototypischen Morphologien nur für einige APs zulässt (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Dennoch ließen sich in WT und KO AP identifizieren, welche allen beschriebenen Morphologien entsprechen.

##### **3.4.2.1 Early-Pacemaker-APs**

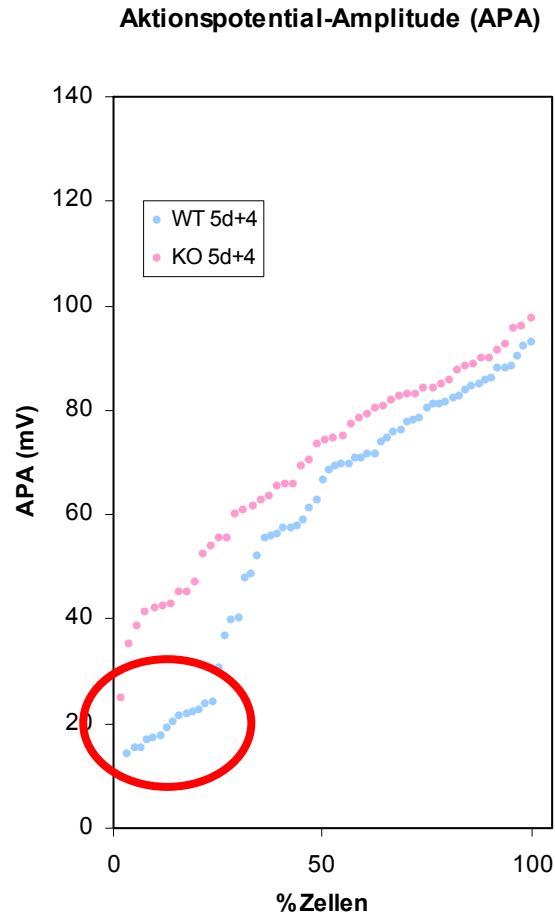
Praktisch ausschließlich im WT zu frühen Differenzierungszeitpunkten lässt sich eine Subgruppe von ESDC identifizieren, welche sich durch eine Kombination aus geringer AP-Amplitude bei geringer Ruhe-Membranpolarisation, langsamem Aufstrich und langsamer anschließender Repolarisation auszeichnet (Abb. 3-2) und damit der in der Literatur als

„Early Pacemaker“ beschriebene AP-Morphologie (siehe 1.4.2, S. 16) entspricht. Solche APs wurden als typisch für ganz besonders frühe Differenzierungsstadien von ESDC beschrieben.



**Abb. 3-2:** Typisches Early-Pacemaker-AP im Vergleich zu einem Nicht-Early-Pacemaker-AP des Differenzierungszeitpunkts 5d+4 (beide WT)

Am deutlichsten von den APs der restlichen Zellen dieser Differenzierungszeitpunkte abgrenzen lassen sich die Early-Pacemaker-APs durch ihre besonders niedrige AP-Amplitude von unter 25 mV (vgl. Abb. 3-3 (S. 63)).

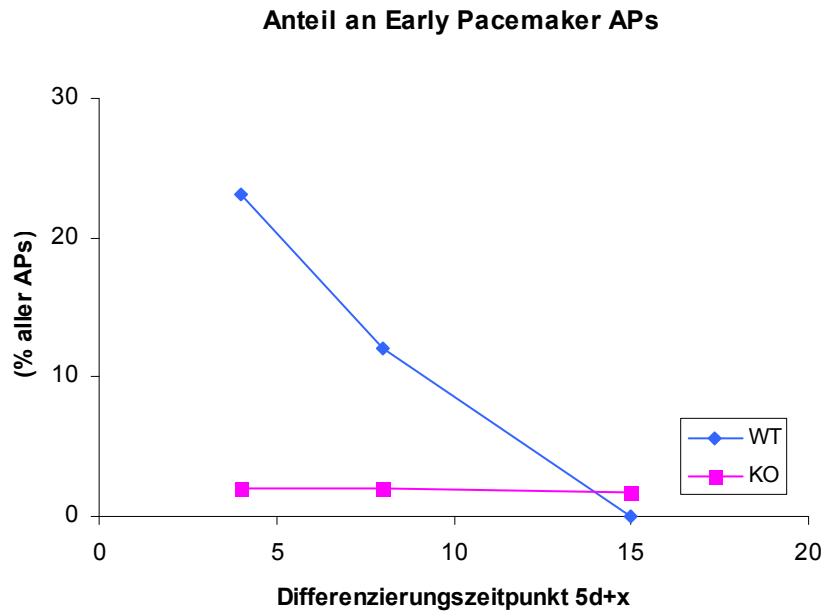


**Abb. 3-3:** AP-Amplituden nach 5d+4  
rote Markierung: Early-Pacemaker-AP

Aber auch hinsichtlich anderer AP-Charakteristika finden sich signifikante Unterschiede zu den restlichen WT-AP des jeweiligen Differenzierungszeitpunkts (im folgenden für den Zeitpunkt 5d+4 angegeben): Neben der im Vergleich zu den restlichen WT-Zellen dieses Differenzierungszeitpunktes signifikant geringen AP-Amplitude (im Mittel lediglich  $18,73 \pm 1,04$  mV vs.  $70,41 \pm 15,62$  mV,  $p < 0,001$ ) zeigen diese Zellen eine vergleichsweise geringere MDP (im Mittel  $-40,73 \pm 2,36$  mV vs.  $-57,55 \pm 1,15$  mV,  $p < 0,001$ ). Weiterhin zeigen sie einen besonders langsamen Aufstrich des APs ( $V_{\max}$   $0,795 \pm 0,063$  mV/ms vs.  $7,699 \pm 0,920$  mV/ms;  $p < 0,001$ ), ebenso ist die Repolarisation der Early-Pacemaker-Zellen deutlich langsamer (APD50:  $253,3 \pm 30,8$  ms vs.  $124,8 \pm 7,7$  ms,  $p < 0,001$ ). Sie entsprechen damit typischen Early-Pacemaker-AP nach o.g. Kriterien. Während sie weiterhin zwar eine deutlich niedrigere DDR zeigen ( $3,221 \pm 0,419$  mV/s vs.  $8,001 \pm 0,782$  mV/s;  $p < 0,01$ ), geht dies aber nicht mit einer Verminderung der spontanen AP-Frequenz einher

(Zykluslänge 2057,42 ms vs. 1978,96 ms;  $p=0,706$ ). Ein typisches solches Early-Pacemaker-AP ist im Vergleich zu einem Nicht-Early-Pacemaker-AP des WT nach 5d+4 in Abb. 3-2 dargestellt.

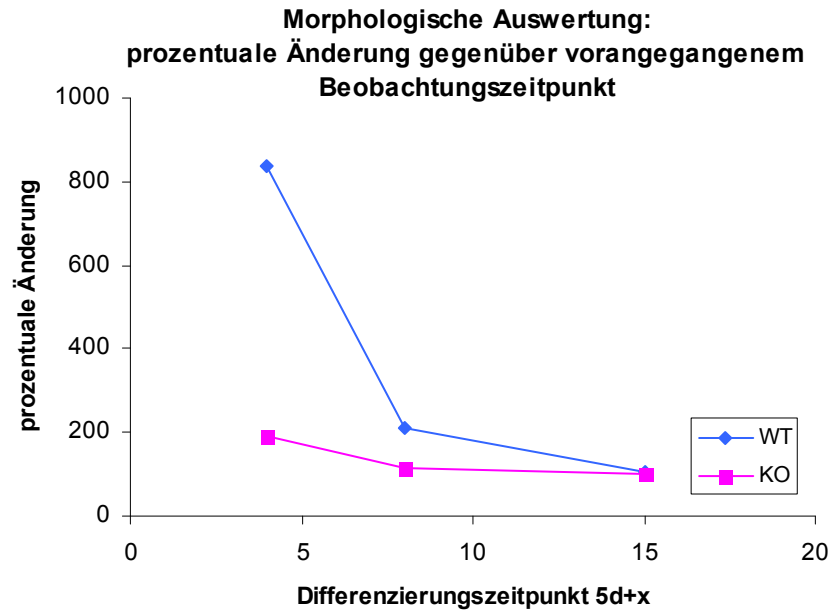
Nach 5d+4 zeigen im WT 15 von 65 Zellen (also 23%) eine Early-Pacemaker-AP-Morphologie, während es im KO lediglich 1 von 51 Zellen (2%) ist ( $p<0,001$ , siehe Abb. 3-3 und Abb. 3-4).



**Abb. 3-4:** Anteil der Early-Pacemaker-APs an allen registrierten APs

Nach 5d+8 hat der Anteil der Early Pacemaker an den registrierten APs deutlich abgenommen. Im WT sind es nun noch 6 von 50 Zellen (d.h. 12%), während es im KO unverändert lediglich 1 von 51 Zellen (2%,  $p=0,060$ ) ist. Nach 5d+15 ist im WT nunmehr kein AP der der Early-Pacemaker-Morphologie mehr zu finden im KO weiterhin lediglich eines (1,8% der Zellen). Generell ist festzustellen, dass im KO nur ein Bruchteil der im WT gefundenen, zu sehen ist. Dies korreliert damit, dass bereits nach 5d+3 der KO in der morphologischen Auswertung einen vergleichsweise hohen Wert zeigt, der bis 5d+4 dann im Vergleich zum WT nur noch relativ gering zunimmt (siehe Abb. 3-5). Es kommt also im KO bereits nach 5d+4 vermutlich zu keiner Neubildung von ESDC in hohem Umfang mehr. Im WT dagegen ist dieser Wert zum Zeitpunkt 5d+4 noch deutlich im Zunehmen begriffen, was dafür spricht, dass zu diesem Zeitpunkt noch in deutlichem Umfang ESDC neu gebildet werden.





**Abb. 3-5:** Zunahme der Häufigkeit von ESDC-Clustern im Vergleich zum jeweils vorangegangenen Untersuchungszeitpunkt

Wie noch ausführlicher dargestellt werden wird (siehe 3.4.6), ist dabei dieses immer seltener werdende Auftreten von Early-Pacemaker-APs im WT im Zuge der Differenzierung bzw. der nicht mehr neu erfolgenden Neubildung von ESDC-Clustern aufgrund der geringen AP-Amplitude der Early-Pacemaker-APs für die Zunahme der mittleren AP-Amplitude im Verlauf der Differenzierung im WT sowie für die nach 5d+4 im KO bereits höhere mittlere AP-Amplitude verantwortlich. Einziger weiterer Unterschied zwischen KO und WT zu diesem Zeitpunkt war die im KO verlängerte AP-Zykluslänge. Diese wiederum lässt sich jedoch nicht auf die Early-Pacemaker-Zellen zurückführen, da die mittlere Zykluslänge der Early Pacemaker und Nicht-Early-Pacemaker sich kaum unterscheidet (siehe 3.4.3).

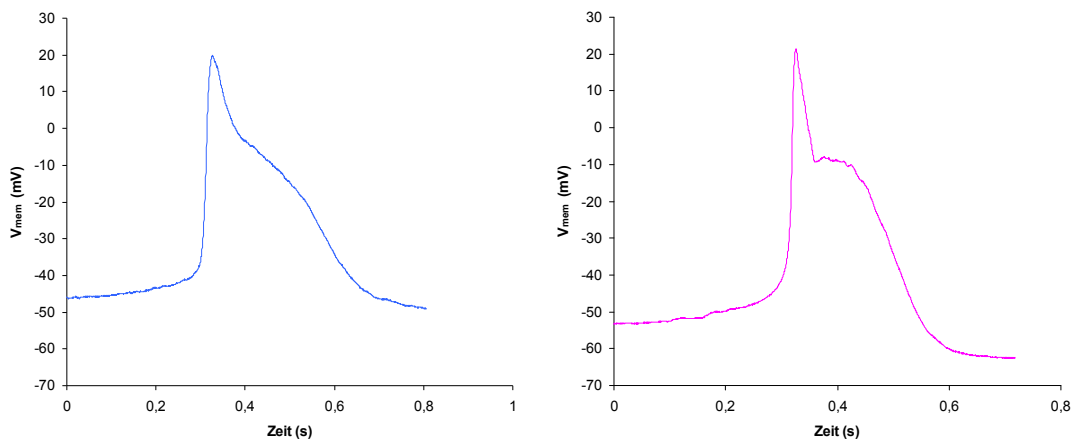
### 3.4.2.2 Vorhof- und Ventrikel-ähnliche sowie weitere AP-Morphologien

Außer den Early-Pacemaker-APs lassen sich keine weiteren AP-Morphologien anhand einzelner Charakteristika klar abgrenzen, weswegen angesichts der bereits diskutierten Problematik solcher AP-Klassifizierungen auf die quantitative Auswertung weitere AP-Morphologien verzichtet wird.

Es finden sich aber in beiden Zelllinien einzelne APs mit für die verschiedenen AP-Prototypen typischer Morphologie. Entsprechend des Ziels der Arbeit, der Untersuchung der frühen Phase der Differenzierung, finden sich dabei nur relativ wenige den terminal differenzierten Morphologien entsprechende Zellen zu erwarten.

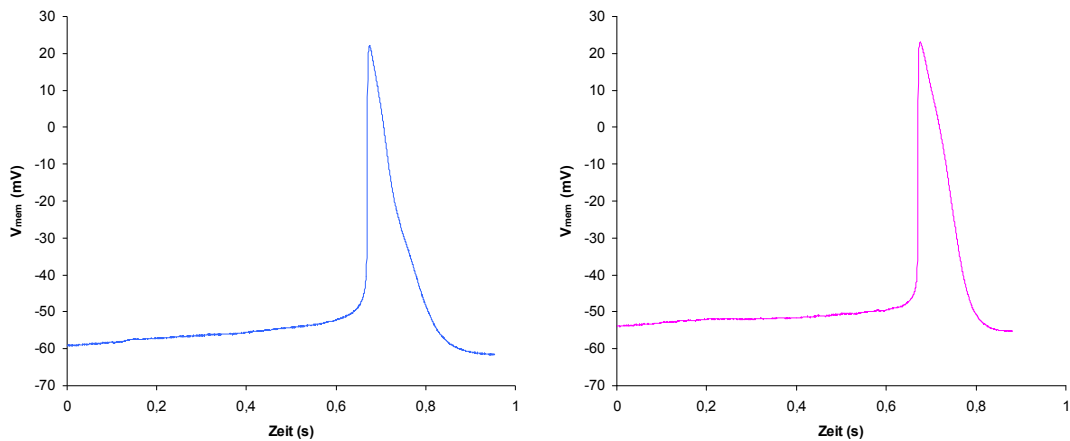
Vorhof-Myozyten-ähnliche und Ventrikel-ähnliche AP werden in der Literatur v.a. durch ihre höhere  $V_{\max}$  von Schrittmacher-AP abgegrenzt. Untereinander wiederum werden sie v.a. anhand ihrer APD unterschieden.

Auch in den in der vorliegenden Arbeit registrierten AP finden sich bereits APs mit ventrikulärer Charakteristik, sowohl im WT, als auch im KO – bevorzugt, aber nicht nur, nach 5d+15 (siehe Abb. 3-6). Insbesondere Ventrikel-ähnliche APs finden sich auch zu früheren Differenzierungszeitpunkten. Das Vorhandensein einer typischen Plateauphase wie im adulten Myokard ist in der Literatur keine Voraussetzung zur Klassifizierung als Ventrikel-ähnlich, eine solche typische Plateauphase findet sich dennoch sowohl in einigen APs des WT, als auch des KO, während andere als Ventrikel-ähnlich zu klassifizierende APs sie nicht zeigen.



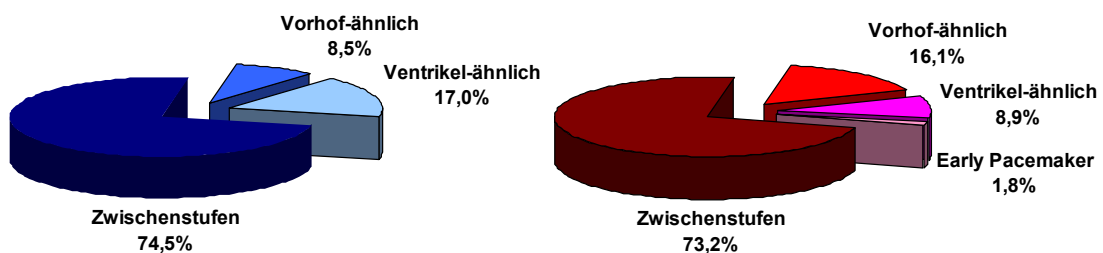
**Abb 3-6:** Ventrikel-ähnliche APs aus WT- (links) und KO -ESDC nach 5d+15 (Phase 4 der APs zur besseren Darstellung nicht komplett abgebildet)

Vorhof-ähnliche APs unterscheiden sich von den Ventrikel-ähnlichen durch ihre schnelle Repolarisation (kurze APD) und eine „dreieckige“ Form. Auch Zellen mit einer typischen solchen Morphologie lassen sich in kleinen Zahlen in WT und KO finden, typische Vorhof-ähnliche APs sind in Abb. 3-7 gezeigt.



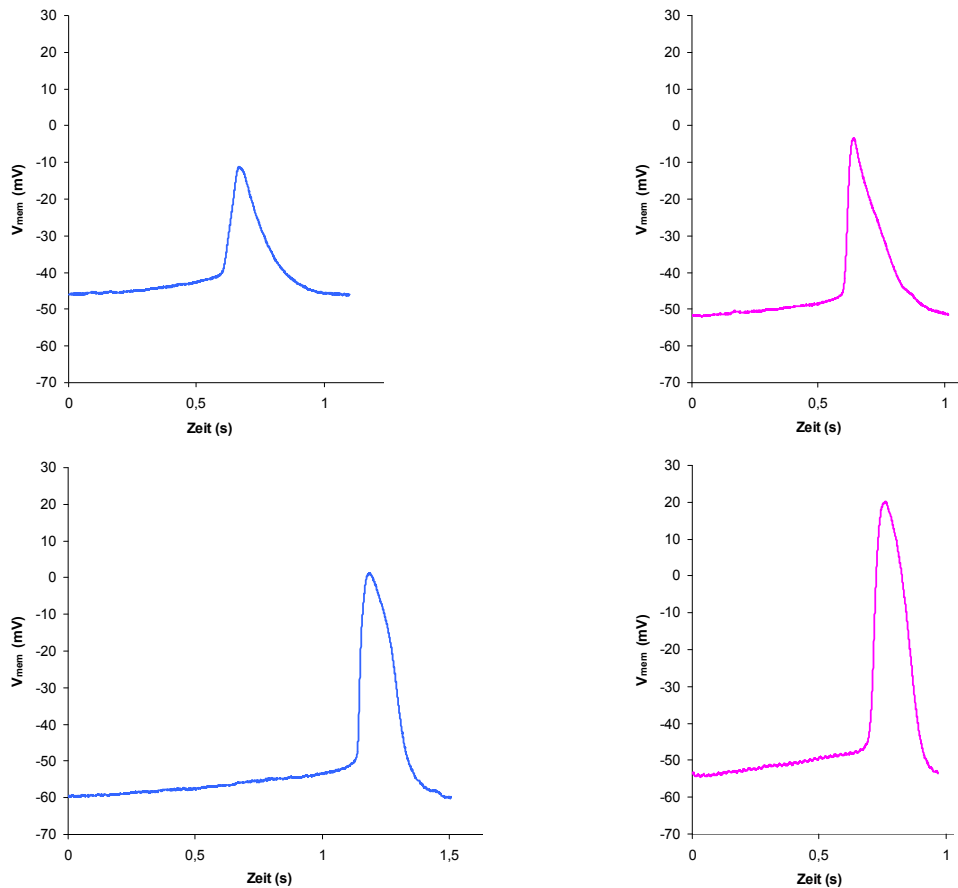
**Abb 3-7:** Vorhof-ähnliche APs aus WT- (links) und KO-ESDC nach 5d+15 (Phase 4 der APs zur besseren Darstellung nicht komplett abgebildet)

Im Rahmen der erwähnten Einschränkungen einer solchen Klassifizierung würden zum Zeitpunkt 5d+15 17% der WT-Zellen als Ventrikel-ähnlich und 8,5% als Vorhof-ähnlich klassifiziert, im KO 8,9% als Ventrikel-ähnlich und 16,1% als Vorhof-ähnlich. Dass relativ wenige der als typisch für die *terminale* Ausdifferenzierung beschriebenen APs (atrial-like und ventricle-like) festgestellt wurden (Abb. 3.8), bestätigt, dass das gewünschte Zeitfenster der Untersuchung, die *frühe* Phase der kardiomyozytären Differenzierung, getroffen wurde.



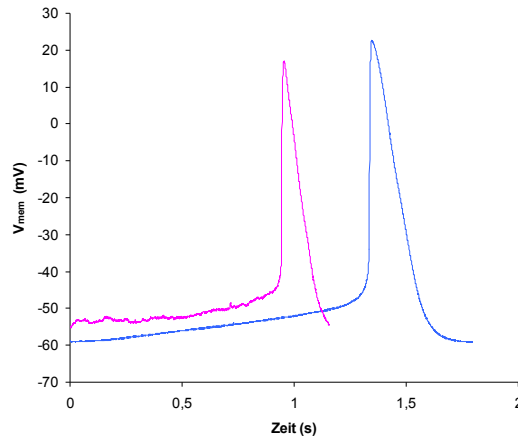
**Abb. 3.8:** Häufigkeit der AP-Morphologien in WT (blau) und KO (rosa)

Wie bereits in der Literatur diskutiert (vgl. 1.4.2 (S. 16)), lässt sich die Mehrzahl der registrierten APs aber nicht einer der genannten Morphologien zuordnen, sondern entspricht vielmehr vielfältigen Zwischenstufen zwischen diesen, wie sie an einigen Beispielen von 5d+15-APs in Abb. 3-9 dargestellt sind.



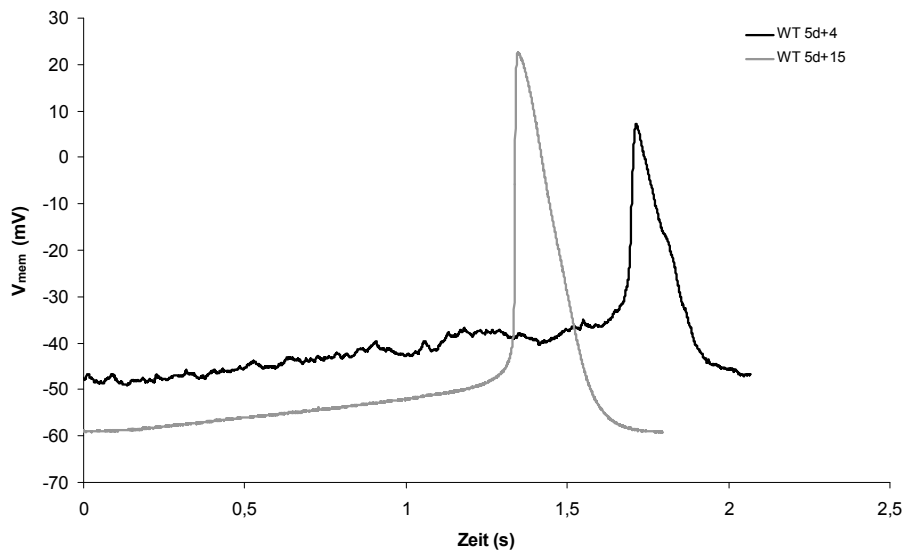
**Abb. 3-9:** Beispiele nicht eindeutig klassifizierbarer APs aus WT (blau) und KO (rosa) nach 5d+15; nicht repräsentativ

Angesichts dieser Heterogenität der registrierten AP-Verläufe ist es damit nicht möglich, „repräsentative“ APs zu zeigen; die im Folgenden dargestellte quantitative Auswertung der AP-Charakteristika schließt entsprechend *alle* registrierten APs ein, auch die der hier beschriebenen Morphologien. Zur Veranschaulichung der hierbei nach 5d+15 in den Mittelwerten der AP-Charakteristika zwischen beiden Zelllinien bestehenden Unterschiede (siehe 3.4.3-3.4.8) zeigt Abb. 3-10 dennoch APs beider Zelllinien, deren Charakteristika in etwa diesen Mittelwerten entsprechen.



**Abb. 3-10:** Etwa den Mittelwerten nach 5d+15 entsprechende APs aus WT (blau) und KO (rosa)

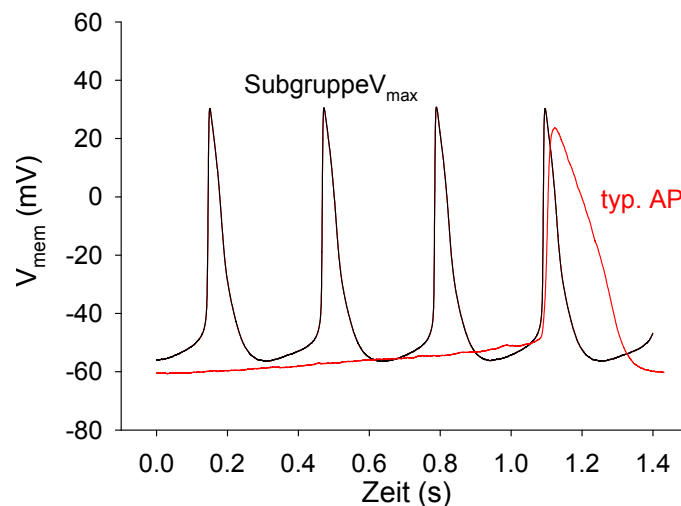
Auch die im Folgenden noch dargestellten, mit Ausnahme der AP-Amplitude in beiden Zelllinien prinzipiell gleichsinnig verlaufenden, Veränderungen der AP-Charakteristika im Verlauf der Differenzierung zwischen 5d+4 und 5d+15 sind in Abb. 3-11 anhand von in etwa den Mittelwerten entsprechenden WT-APs aus 5d+4 und 5d+15 illustriert.



**Abb. 3-11:** Etwa den Mittelwerten entsprechende AP im WT nach 5d+4 und 5d+15

### 3.4.2.3 Subgruppe mit besonders rascher Depolarisation (Subgruppe $V_{\max}$ )

Im KO lässt sich allerdings eine Subgruppe von APs mit einer im WT nicht vorkommenden Morphologie identifizieren. Am deutlichsten lassen sich diese hinsichtlich ihrer extrem schnellen Depolarisation mit einer  $V_{\max}$  von über 60 mV/ms gegenüber den restlichen APs abgrenzen. (Siehe 3.4.7.) Innerhalb des KO nimmt der Anteil an dieser Gruppe im Verlauf der Differenzierung zu: Nur 1 der 8 Zellen aus dieser Subgruppe entstammt dem Differenzierungszeitpunkt 5d+8 (1,9% aller KO-APs dieses Zeitpunkts), während die restlichen 7 AP nach 5d+15 registriert wurden (12,5% aller KO-APs dieses Zeitpunkts). Im WT war zu keinem Zeitpunkt ein solches AP feststellbar. Ein typisches Beispiel eines solchen APs ist in Abb. 3-12 im Vergleich zu einem typischen WT-AP des Zeitpunkts 5d+15 abgebildet.



**Abb. 3-12:** Beispiel eines APs der Subgruppe  $V_{\max}$  im Vergleich zu einem typischen 5d+15 WT-AP

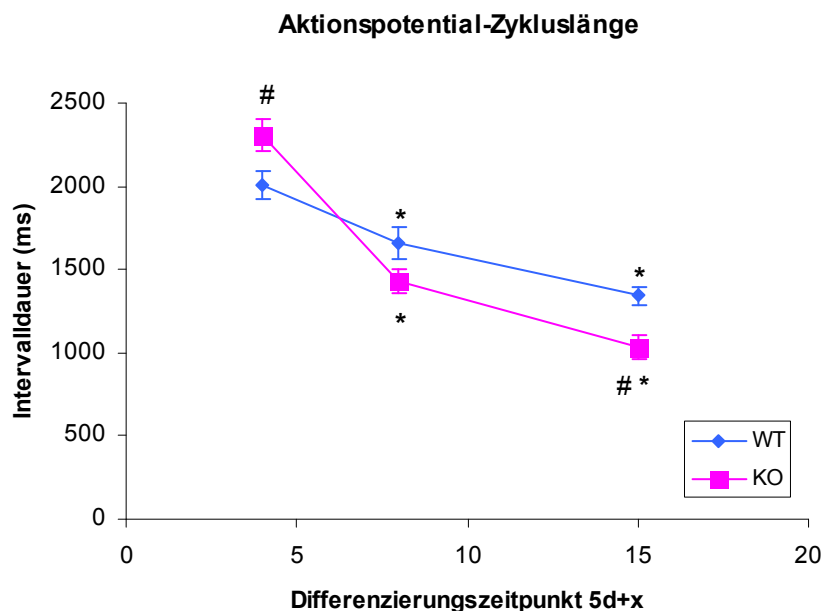
Im Vergleich zu den restlichen KO-APs des Zeitpunkts 5d+15 zeigen die APs dieser Subgruppe eine mit  $80,545 \pm 4,727$  mV/ms signifikant schnellere Depolarisation (vs.  $8,091 \pm 0,950$  mV/ms,  $p < 0,001$ ). Auch ihre Repolarisation ist beschleunigt (APD80:  $97,807 \pm 8,516$  ms vs.  $145,453 \pm 7,488$  ms,  $p = 0,022$ ). Weiterhin zeigen sie eine deutlich höhere AP-Amplitude ( $96,228 \pm 2,081$  mV vs.  $72,284$  mV,  $p < 0,001$ ) - wobei sich das Ruhemembranpotential knapp nicht signifikant unterscheidet ( $-61,438 \pm 1,166$  mV vs.  $-56,045 \pm 1,008$  mV,  $p = 0,053$ ). Die AP-Zykluslänge ist mit  $764,393 \pm 170,799$  ms vs.

1071,759±75,730 ms in dieser Subgruppe etwas, nicht jedoch signifikant ( $p=0,151$ ) verkürzt bei ebenfalls etwas, aber wieder nicht signifikant, erhöhter DDR (23,548±7,000 mV/s vs. 15,074±1,598 mV/s,  $p=0,092$ ).

Dabei lassen diese Zellen sich jedoch nur hinsichtlich der  $V_{\max}$  deutlich von der restlichen Zellpopulation abgrenzen, während für andere Parameter teilweise Überlappung mit auch ansonsten festgestellten Messwerten besteht. Sie stellen dabei, wie in 3.4.3 noch ausführlicher dargestellt werden wird, quasi lediglich die Extremform der im KO insbesondere zum Zeitpunkt 5d+15 beschleunigten Depolarisation dar und sind jedoch nicht für die *generell* im KO nach 5d+8 und 5d+15 festzustellende höhere  $V_{\max}$  verantwortlich.

### 3.4.3 AP-Zykluslänge

Im WT nimmt die AP-Zykluslänge im Verlauf der Differenzierung von 2007±87 ms nach 5d+5 relativ gleichmäßig über 1660±96 ms nach 5d+8 auf schließlich 1342±53 ms nach 5d+15 ab, wobei diese Veränderungen zwischen den einzelnen Zeitpunkten jeweils signifikant sind (5d+4 vs. 5d+8:  $p=0,009$ ; 5d+8 vs. 5d+15:  $p=0,005$ ). Dies ist in Abb. 3-13 dargestellt.

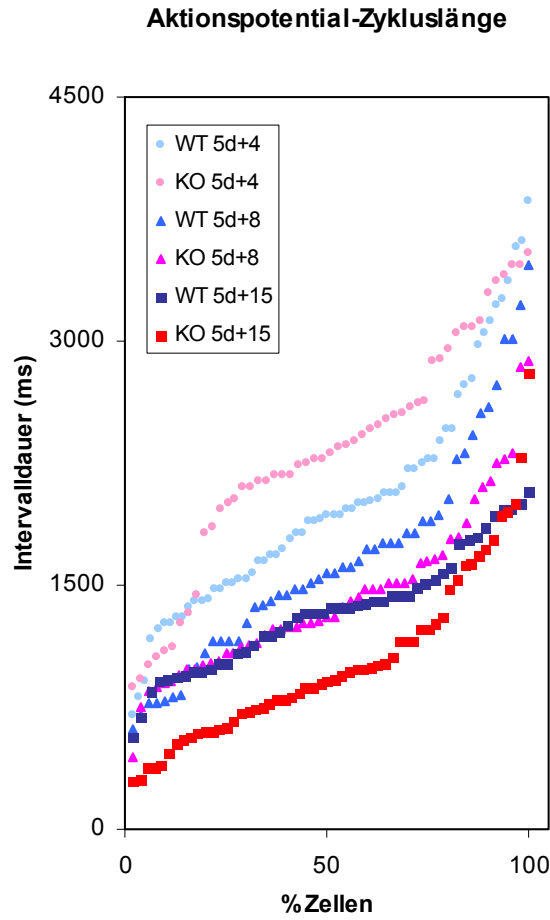


**Abb. 3-13:** AP-Zykluslänge im Verlauf der Differenzierung

Der KO zeigt im Vergleich hierzu zum Zeitpunkt 5d+4 im Mittel signifikant längere AP-Intervalle (2307±100 ms;  $p=0,025$ ) im Sinne einer niedrigeren

Frequenz der spontanen Kontraktionen. Die Zunahme der Spontanfrequenz, also die Abnahme der AP-Zykluslänge bis zum nächsten Untersuchungszeitpunkt ist im KO aber deutlich stärker als im WT, so dass diese KO-ESDC nach 5d+8 gegenüber dem WT mit  $1431 \pm 70$  ms nicht mehr verlängert ist – sie ist nunmehr sogar (wenn auch nicht signifikant) kürzer. Diese stärker ausgeprägte Abnahme der AP-Zykluslänge (bzw. Zunahme der spontanen AP-Frequenz) findet im KO schwächer ausgeprägt auch bis zum folgenden Untersuchungszeitpunkt statt, so dass die AP-Zykluslänge nach 5d+15 im KO mit  $1033 \pm 70$  ms gegenüber dem WT signifikant verkürzt ist ( $p < 0.001$ ). Diese Unterschiede zwischen KO und WT sind dabei nicht auf die Existenz einer isolierten Subgruppen von Zellen mit besonders langer AP-Zykluslänge im WT oder mit kurzen AP-Zykluslängen im KO zurückzuführen, wie in Abb. 3-14 zu sehen ist. Dies trifft auch für die bereits dargestellten Early-Pacemaker-APs zu, da deren mittlere AP-Zykluslänge sich von der der Nicht-Early-Pacemaker kaum unterscheidet. Entsprechend ändert sich die mittlere AP-Zykluslänge durch Ausschluß der Early-Pacemaker-Zellen kaum und bleibt zwischen KO und WT signifikant unterschiedlich bleibt (Nicht-Early-Pacemaker nach 5d+4: WT  $1991 \pm 105$  ms vs. KO  $2317 \pm 101$  ms,  $p = 0,028$ ).





**Abb. 3-14:** Einzelwerte der AP-Zykluslänge

Vielmehr kommt es im WT im gesamten Verlauf der Differenzierung zu einer generellen Abnahme der Häufigkeit von ESDC mit APs langer Zykluslänge, also einer Abnahme von Zellen mit einer (noch) langsamen Spontanfrequenz, so dass die längste nach 5d+15 noch gemessene AP-Zykluslänge 2075 ms (entsprechend 29 Kontraktionen/min) betrug. Die Häufigkeit von APs mit eher kurzer AP-Zykluslänge nimmt dagegen, wie in Abb. 3-14 deutlich zu sehen ist, im WT zunächst (zwischen 5d+4 und 5d+8) zwar deutlich zu, bleibt danach (zwischen 5d+8 und 5d+15) aber unverändert.

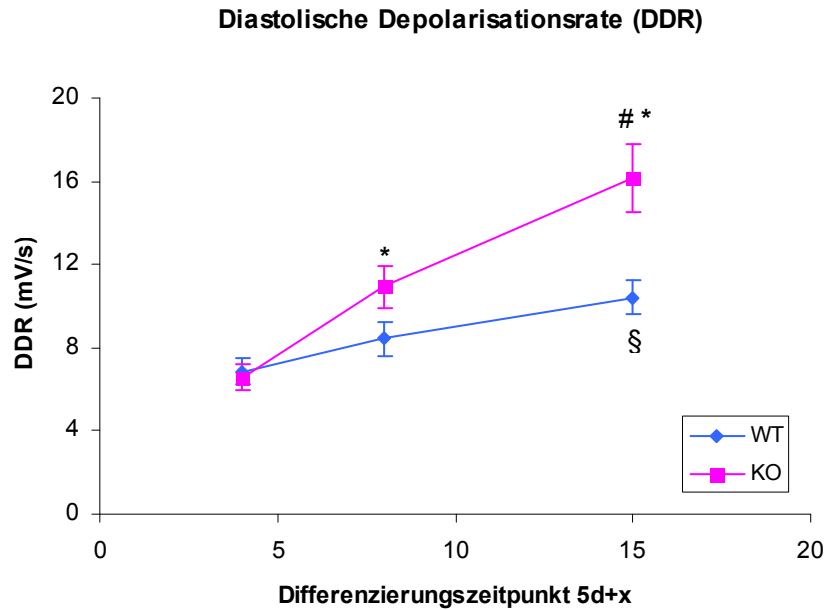
Im KO findet diese Entwicklung deutlich schneller und stärker ausgeprägt statt. Zwar ist in ihm zum Zeitpunkt 5d+4 die Häufigkeit von APs mit langer Zykluslänge gegenüber dem WT deutlich noch erhöht (72,5% vs. 32,8% haben eine Zykluslänge >2075 ms,  $p < 0,001$ ). Zwischen 5d+4 und 5d+8 zeigt sich aber auch im KO eine deutliche Reduzierung der Häufigkeit von APs mit langer Zykluslänge, sogar deutlich stärker ausgeprägt als im WT, wodurch es

zur Angleichung der mittleren Zykluslänge zwischen KO und WT kommt. Hierbei ähnelt die Verteilung im KO nach 5d+8 bereits deutlich der im WT nach 5d+15. Nach 5d+15 zeigt sich im KO nunmehr ein im Vergleich zum WT deutlich anderes Bild: Es haben sich hier nicht nur einige Zellen mit einer deutlich höheren Spontanfrequenz herausgebildet als im WT (bis 204 Kontraktionen/min  $\triangleq$  290 ms Zykluslänge, im WT bis 105/min  $\triangleq$  570 ms Intervall), sondern es gibt im KO auch sehr viel mehr APs mit einer kurzen Zykluslänge, als im WT (64,3% vs. 25,5% haben eine Zykluslänge < 1037,5 ms,  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend kommt es im Verlauf der Differenzierung im WT zu einer Abnahme der AP-Zykluslänge (entsprechend einer Zunahme der spontanen AP-Frequenz). Der KO zeigt dem gegenüber zunächst nach 5d+4 im Mittel eine verlängerte AP-Zykluslänge, da diese im KO im Verlauf der Differenzierung aber deutlich stärker abnimmt als im WT, gleicht hat sie sich diesem nach 5d+8 angeglichen und ist nach 5d+15 im KO verglichen mit dem WT sogar signifikant kürzer.

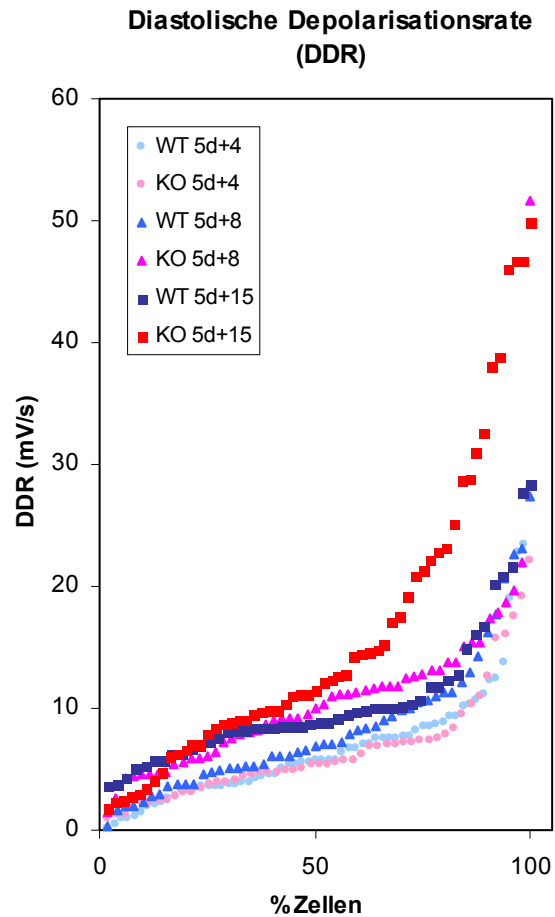
#### **3.4.4 Diastolische Depolarisationsrate (DDR)**

Wie in Abb. 3-15. zu sehen ist, kommt es in beiden Zelllinien zu einer Zunahme der spontanen DDR in Phase 4 der APs im Verlauf der Differenzierung der Zellen. Sie nimmt im WT von im Mittel  $6,873 \pm 0,667$  mV/s nach 5d+4 über  $8,433 \pm 0,830$  mV/s nach 5d+8 auf schließlich  $10,427 \pm 0,807$  mV/s nach 5d+15 zu. Diese Zunahme ist dabei zwar über das gesamte Intervall (also 5d+4 vs. 5d+15) signifikant ( $p = 0,001$ ), nicht jedoch über die einzelnen Zeiträume (5d+4 vs. 5d+8:  $p = 0,141$ ; 5d+8 vs. 5d+15:  $p = 0,089$ ).



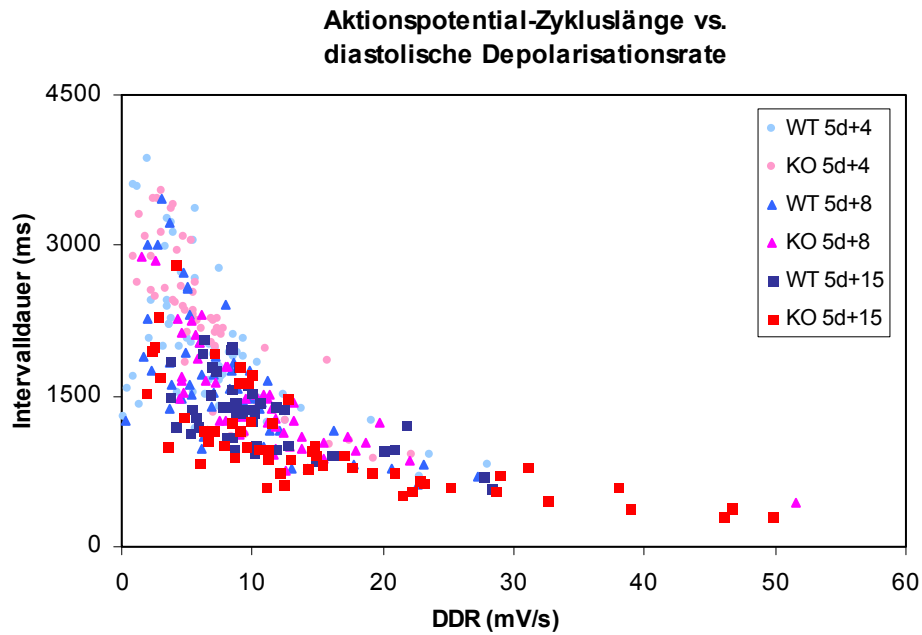
**Abb. 3-15:** DDR im Verlauf der Differenzierung; §: signifikant vs. 5d+4

Nach 5d+4 zeigt der KO nicht nur im Mittel ( $6,580 \pm 0,649$  mV/s) die gleiche DDR wie der WT ( $p=0,757$ ), er zeigt auch, wie in Abb. 3-16 deutlich zu sehen ist, die gleiche Häufigkeitsverteilung der DDR-Werte wie der WT. Nach 5d+8 jedoch unterscheidet sich diese bereits zugunsten einer schnelleren DDR im KO, welche auch im Mittel mit  $10,929 \pm 1,013$  mV/s etwas (wenn auch nicht signifikant:  $p=0,061$ ) höher als im WT ist. Dieser Trend setzt sich fort bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt (5d+15), zu welchem der KO nunmehr eine mit  $16,134 \pm 1,622$  mV/s deutlich und signifikant ( $p=0,004$ ) höhere DDR als der WT zeigt. Im Gegensatz zu den vorhergehenden Beobachtungszeitpunkten zeigen sich dabei im KO jedoch etliche APs mit einer sehr viel höheren DDR, als sie im WT überhaupt maximal erreicht wird, während nach 5d+8 nur ein einziges solches AP im KO festzustellen war. Es scheinen sich damit im KO zwischen 5d+8 und 5d+15 zunehmend Zellen mit unnormal schneller spontaner Depolarisation herauszubilden.



**Abb. 3-16:** Einzelwert der DDR

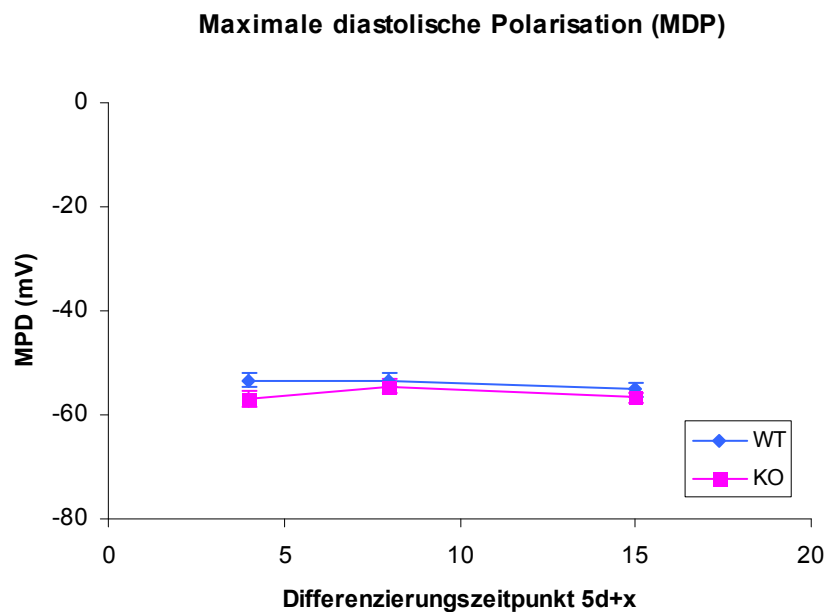
Wie Abb. 3-17 zeigt, besteht dabei zwar tendenziell ein Zusammenhang zwischen DDR und AP-Zykluslänge (Abnahme der Zykluslänge bei Zunahme der DDR). Es besteht jedoch insbesondere im Bereich der niedrigeren DDR und für den frühen Differenzierungszeitpunkt 5d+4 keine eindeutige Korrelation zwischen DDR und Zykluslänge.



**Abb. 3-17:** AP-Zykluslänge zur DDR aufgetragen

### 3.4.5 Ruhemembranpotential

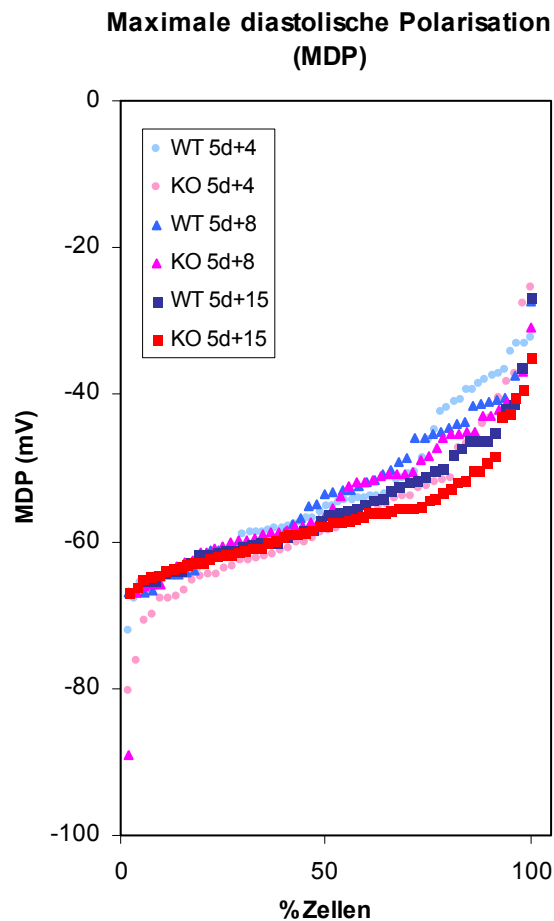
Aus dem WT differenzierte ESDC zeigen im Mittel eine im zeitlichen Verlauf sehr konstante MDP, dies ist in Abb. 3-18 dargestellt. Die MDP zeigt keinerlei signifikante Änderungen im zeitlichen Verlauf der Differenzierung und beträgt  $-53,32 \pm 1,27$  mV nach 5d+4, nach 5d+8 beträgt sie praktisch unverändert  $-53,38 \pm 1,36$  mV und nach 5d+15 schließlich  $-55,14 \pm 1,22$  mV.



**Abb. 3-18:** MDP im Verlauf der Differenzierung

Die im KO nach 5d+4 beobachtete mittlere MDP ist mit  $-56,75 \pm 1,53$  mV minimal, aber nicht signifikant ( $p=0,086$ ) negativer, als im WT. Im weiteren Verlauf der Differenzierung gleicht sich die MDP im KO der des WT weiter an, wobei sie weiterhin knapp negativer bleibt: Sie beträgt  $-54,49 \pm 1,34$  mV nach 5d+8 und  $-56,72 \pm 0,92$  mV nach 5d+15. Auch im KO sind dabei keine signifikanten Veränderungen der MDP zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten festzustellen.

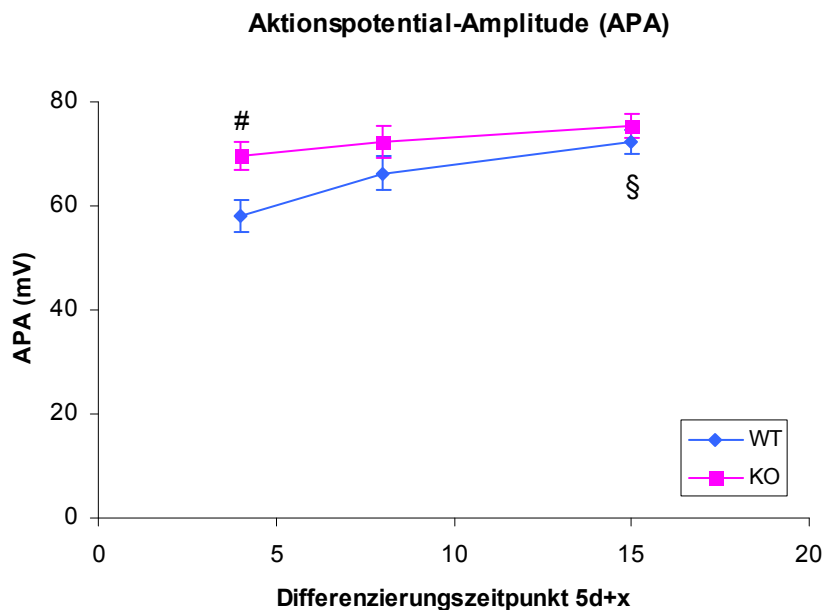
Auch in der Häufigkeitsverteilung der einzelnen MDP zeigen sich keine klaren Unterschiede zwischen KO und WT, am ehesten noch eine etwas größere Häufigkeit von AP mit positiverer MDP im WT (siehe Abb. 3-19), wie sie sich auch in den Mittelwerten andeutet.



**Abb. 3-19:** Einzelwert der MDP

### 3.4.6 Depolarisation: AP-Amplitude

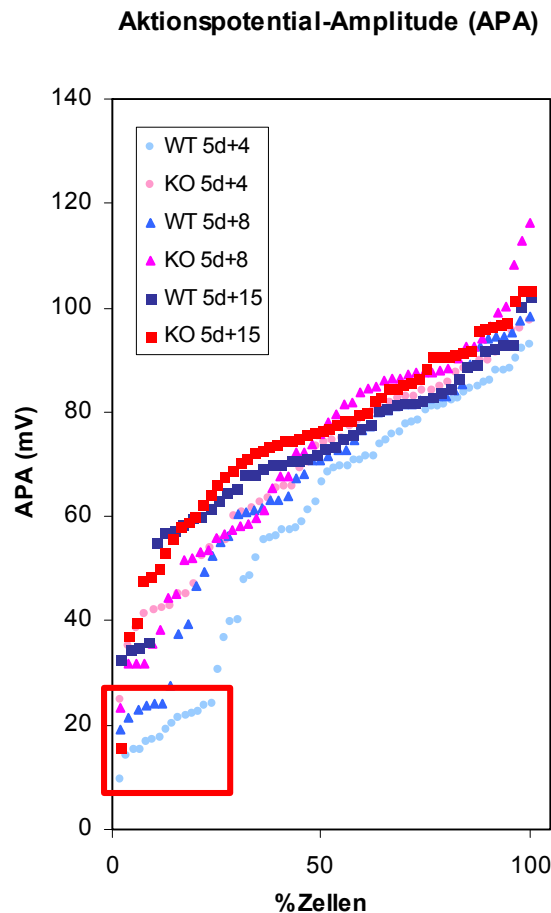
Die mittlere AP-Amplitude nimmt im WT von anfänglich  $58,49 \pm 25,92$  mV zum Zeitpunkt 5d+4 über  $66,30 \pm 22,79$  mV nach 5d+8 auf schließlich  $72,28 \pm 16,83$  mV nach 5d+15 zu (Abb. 3-20). Sie ist dabei zwar über den gesamten Verlauf zwischen Beginn und Ende des Beobachtungszeitraums (d.h. im Vergleich von 5d+4 vs. 5d+15) signifikant ( $p=0,001$ ), nicht jedoch zwischen den einzelnen Beobachtungszeitpunkten (5d+4 vs. 5d+8:  $p=0,078$  und 5d+8 vs. 5d+15:  $p=0,143$ ).



**Abb. 3-20:** AP-Amplitude im Verlauf der Differenzierung

Im Vergleich dazu zeigte der KO bereits in der sehr frühen Phase der Differenzierung (5d+4) eine signifikant ( $p=0,008$ ) höhere mittlere AP-Amplitude ( $68,52 \pm 19,02$  mV) als der WT. Dieser Wert wird im WT erst nach dem Zeitpunkt 5d+8 erreicht. Die AP-Amplitude steigt im KO dann jedoch im zeitlichen Verlauf deutlich langsamer an als im WT, so dass eine Angleichung stattfindet und nach 5d+8 der KO zwar noch im Mittel zirka 6 mV höhere AP-Amplituden zeigt ( $72,21 \pm 22,46$  mV), diese sich jedoch nicht mehr signifikant ( $p=0,190$ ) von denen des WT unterscheiden. Nach 5d+15 haben sich die Unterschiede in den AP-Amplituden sogar noch weiter angeglichen ( $75,49 \pm 17,9$  mV im KO). Selbst über den ganzen Beobachtungszeitraum nimmt die AP-Amplitude im KO damit nur gering zu,

so dass im Gegensatz zum WT der Anstieg von 5d+4 auf 5d+15 nicht signifikant ist ( $p=0,095$ ).



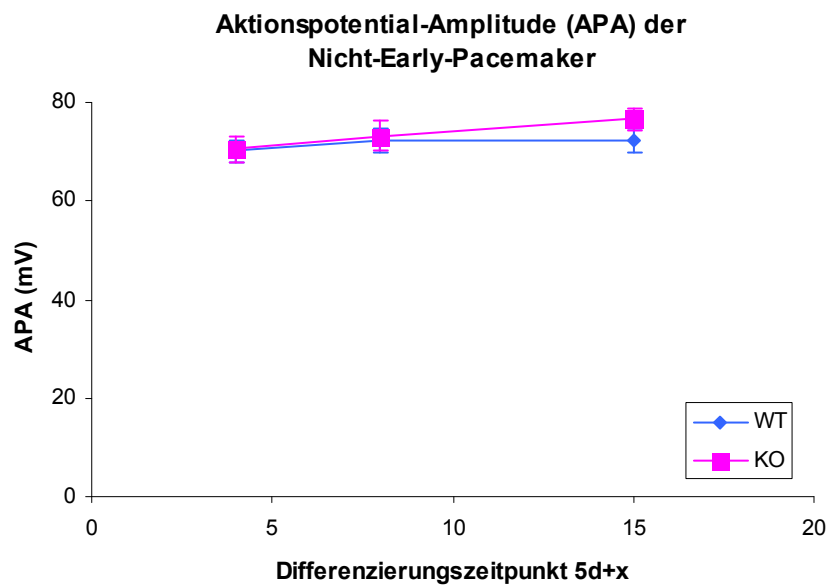
**Abb. 3-21:** Einzelwerte der AP-Amplitude  
rote Markierung: Early-Pacemaker-APs

Auffällig ist, dass sich deutlich eine Subgruppe von APs mit besonders geringer AP-Amplitude ( $<25$  mV) abgrenzen lässt, welche fast ausschließlich im WT zu den Zeitpunkten 5d+4 und, seltener, 5d+8 vorkommen, wie aus Abb. 3-21 zu ersehen ist. Es handelt sich hierbei um APs mit der in 3.4.2.1 bereits dargestellten Early -acemaker-Morphologie.

Bemerkenswerterweise ist offensichtlich die Zunahme der mittleren AP-Amplitude im WT im Verlauf der Differenzierung alleine darauf zurückzuführen, dass diese niederamplitudigen Early-Pacemaker-APs im Verlauf der Differenzierung immer seltener auftreten, wie Abb. 3-23 deutlich illustriert, in welchen die Early-Pacemaker-APs aus der Auswertung ausgeschlossen wurden: Im Verlauf der Differenzierung verändert sich die Amplitude der Nicht-Early-Pacemaker-APs praktisch nicht. Interessanterweise sind entsprechend auch die zwischen KO und WT



vorhandenen Unterschiede in der mittleren AP-Amplitude (bzw. deren Angleichen aneinander) beinahe ausschließlich darauf zurückzuführen, dass im WT diese besonders niederamplitudigen APs zunächst vorkommen (und im Verlauf der Differenzierung verschwinden), im KO jedoch praktisch nicht: Denn nach Ausschluss der Early-Pacemaker-APs aus der Auswertung unterscheiden sich die restlichen (Nicht-Early-Pacemaker-APs) von KO und T hinsichtlich der mittleren AP-Amplitude nicht mehr (WT  $70,41 \pm 15,62$  mV vs. KO  $70,45 \pm 17,67$  mV,  $p=0,915$ , siehe Abb. 3-22).



**Abb. 3-22:** Mittlere Amplitude der Nicht-Early-Pacemaker-APs

Auch hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der AP-Amplituden unterscheiden sich die Nicht-Early-Pacemaker-APs von KO und WT nicht, wie aus Abb. 3-23 ersichtlich wird.

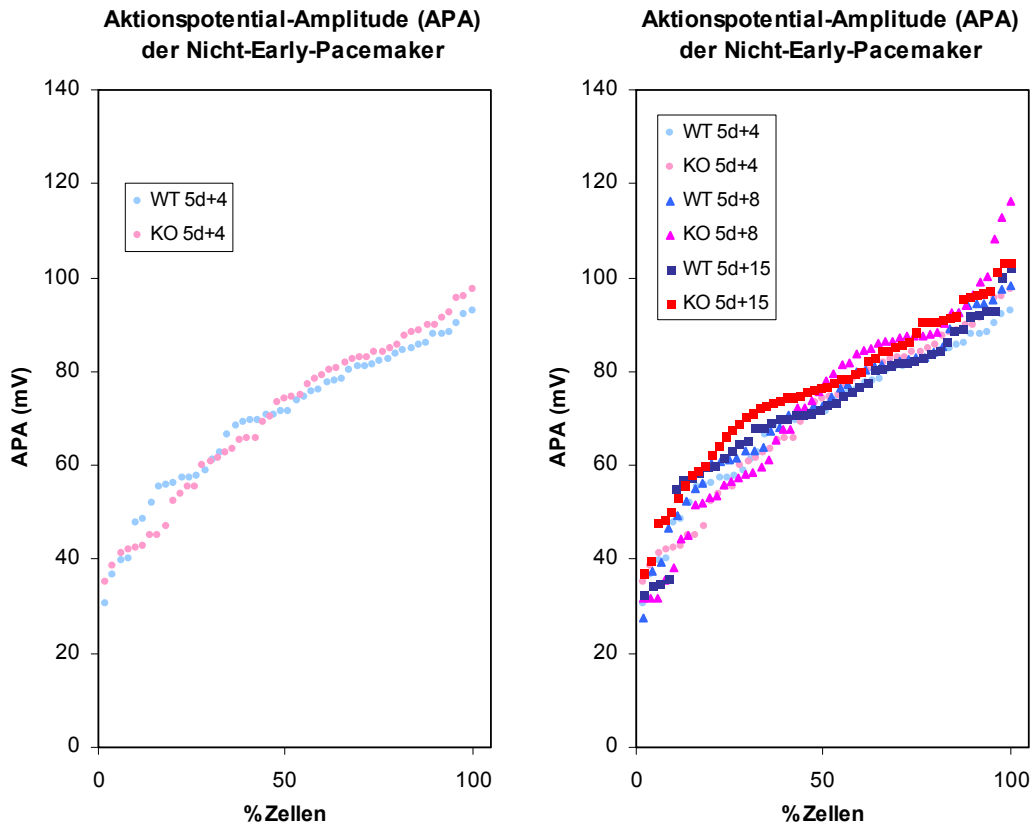


Abb. 3-23: Häufigkeitsverteilungen der AP-Amplituden der Nicht-Early-Pacemaker

### 3.4.7 Depolarisation: $V_{max}$

Sowohl die WT-ESDC nachvollzogen, als auch die des Kollagen  $\alpha_1(I)$ -KO, zeigen eine Zunahme der  $V_{max}$  im Verlauf der Differenzierung wie in Abb. 3-24 zu sehen ist.

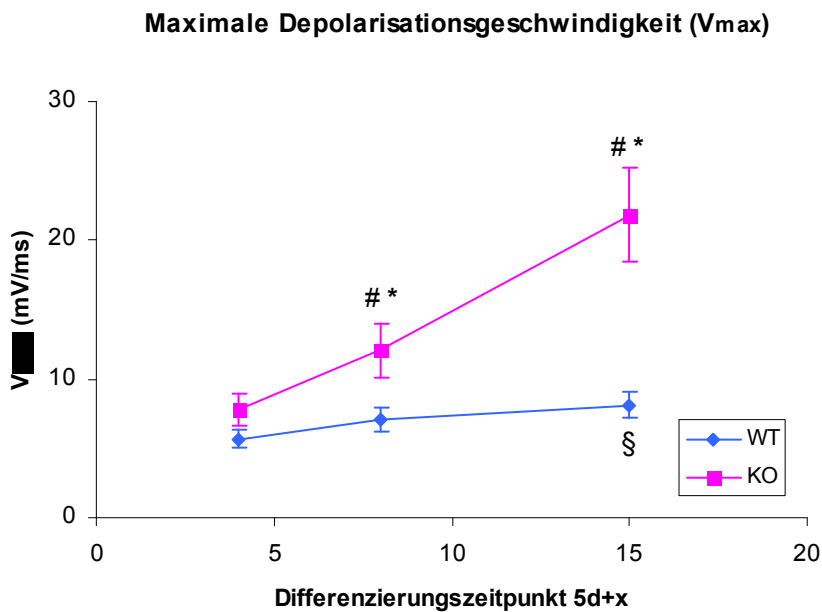
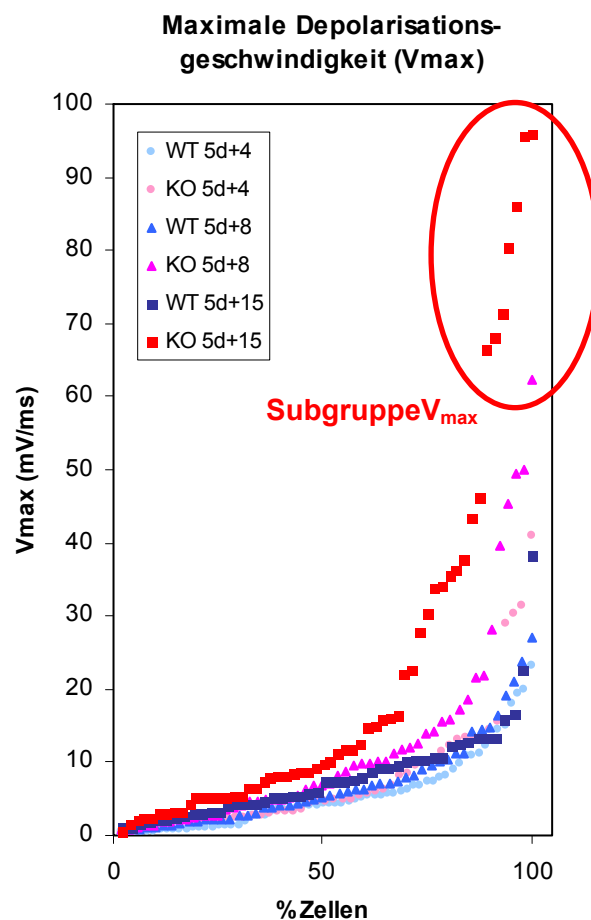


Abb. 3-24:  $V_{max}$  im Verlauf der Differenzierung

Dabei ist die Zunahme der mittleren  $V_{\max}$  im WT nur moderat (von  $5,652 \pm 0,662$  mV/ms nach 5d+4 auf  $7,039 \pm 0,877$  mV/ms nach 5d+8 auf schließlich  $8,091 \pm 0,950$  mV nach 5d+15), aber signifikant über dem gesamten Beobachtungszeitraum ( $p=0,032$  für 5d+4 vs. 5d+15). Der KO hingegen zeigt eine davon abweichende starke Zunahme der  $V_{\max}$  im Verlauf der Differenzierung. Dabei beträgt die  $V_{\max}$  im KO nach 5d+4 bereits im Mittel  $7,777 \pm 1,203$  mV/ms, nimmt dann noch deutlich auf zunächst  $12,056 \pm 1,925$  mV/ms nach 5d+8 ( $p=0,016$  vs. KO 5d+4) und  $21,833 \pm 3,401$  mV/ms nach 5d+15 ( $p < 0,001$  vs. KO 5d+8) zu. Zu diesen beiden Beobachtungszeitpunkten ist die  $V_{\max}$  im KO damit im Vergleich zum WT signifikant ( $p=0,021$  nach 5d+8 und  $p < 0,001$  nach 5d+15) erhöht.

Im WT erreicht die  $V_{\max}$  maximal Werte bis 38 mV/ms erreicht (wobei es sich auch dabei nur um einen einzigen Einzelwert handelt und ansonsten regelmäßiger lediglich Werte bis 27 mV/ms erreicht werden), wie in Abb. 3-25 zu sehen ist.



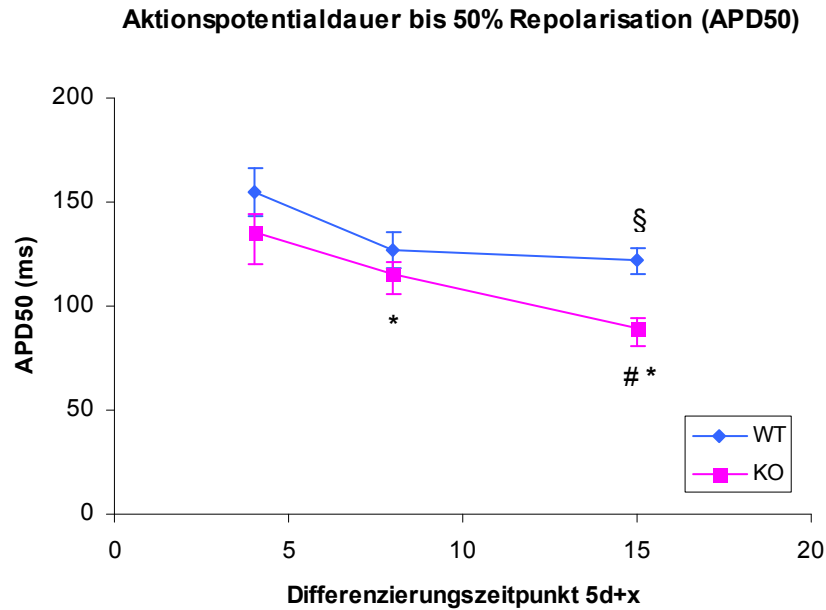
**Abb. 3-25:** Einzelwerte der  $V_{\max}$

Dagegen zeigt der KO nicht nur generelle häufiger APs mit besonders hoher  $V_{\max}$ , sondern es gibt in ihm auch durchgehend AP mit höheren  $V_{\max}$ -Spitzenwerte als im WT – und diese nehmen auch im Verlauf der Differenzierung noch stark zu, schließlich bis hin zu 96 mV/ms. Dabei lässt sich weiterhin, wie in Abb. 3-25 zu sehen ist, eine Subgruppe von APs mit extrem hoher  $V_{\max}$  von über 60 mV/ms abgrenzen. Diese besteht ausschließlich aus KO-Zellen und von diesen fast aus nur solchen des späten Differenzierungszeitpunktes 5d+15 und wurde in 3.4.2.3 bereits ausführlicher dargestellt.

Die im KO höhere mittlere  $V_{\max}$  ist jedoch nicht alleine auf das Vorhandensein dieser Subgruppe  $V_{\max}$ -APs zurückzuführen. Vielmehr verstärken diese lediglich den ohnehin schon bestehenden Unterschied zum WT: Werden alle AP der Subgruppe  $V_{\max}$  aus der Auswertung herausgelassen, so ist die Zunahme der mittleren  $V_{\max}$  im KO zwischen 5d+8 und 5d+15 zwar deutlich abgeschwächt, sie bleibt aber zu diesen beiden Zeitpunkten im KO mit im Mittel  $11,073 \pm 1,688$  mV/ms (5d+8) bzw.  $13,446 \pm 1,739$  mV/ms (5d+15) weiterhin deutlich und signifikant höher, als im WT ( $p=0,038$  bzw.  $p=0,009$ ). Der grundsätzliche Unterschied der im KO schnelleren Depolarisation erstreckt sich also auch auf APs anderer Morphologie. Damit stellt diese Subgruppe von Zellen quasi lediglich die Extremform der im KO insbesondere zum Zeitpunkt 5d+15 generell beschleunigten Depolarisation dar.

### **3.4.8 Repolarisation: APD**

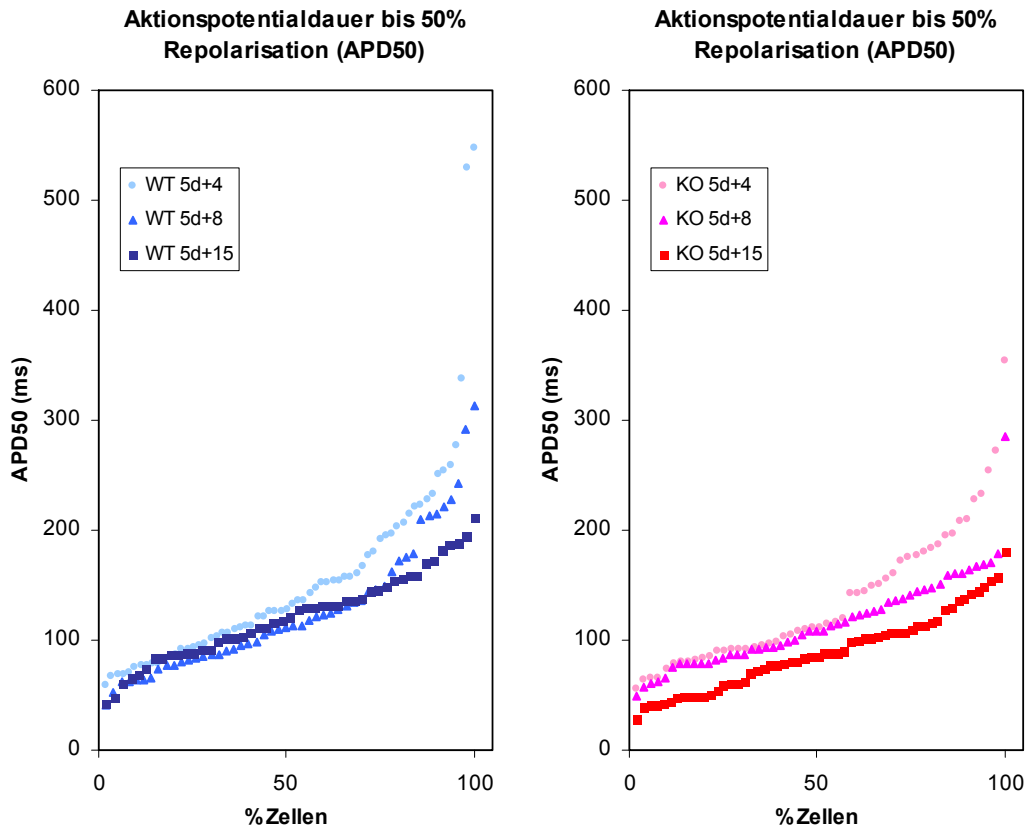
Diese Entwicklung wird von der in der vorliegenden Untersuchung untersuchten WT-Zelllinie nachvollzogen, wie in Abb. 3-26 zu sehen ist. Dabei nimmt die APD50 von  $155,1 \pm 11,5$  ms nach 5d+4 auf  $127,1 \pm 8,7$  ms nach 5d+8 und schließlich  $121,7 \pm 5,8$  ms nach 5d+15 ab. Damit ist die Abnahme der APD50 über dem Beobachtungsintervall signifikant (5d+4 vs. 5d+15  $p=0,022$ ), wobei jeweils für die direkt aufeinander folgenden Messzeitpunkte von 5d+4 auf 5d+8 ( $p=0,067$ ) und von 5d+8 auf 5d+15 ( $p=0,612$ ) noch keine Signifikanz erreicht wird.



**Abb. 3-26:** APD50 im Verlauf der Differenzierung

Auch in den Zellen des KOs wird diese Entwicklung vollzogen. Dabei zeigen diese zu den Zeitpunkten 5d+4 und 5d+8 eine leicht, jedoch nicht signifikant kürzere APD50 als der WT (5d+4:  $135,8 \pm 8,7$  ms,  $p=0,203$  und 5d+8:  $115,4 \pm 5,8$  ms,  $p=0,264$ ). Im Gegensatz zum WT nimmt die APD im KO jedoch auch zwischen 5d+8 und 5d+15 noch deutlich (und signifikant,  $p=0,016$  KO 5d+8 vs. KO 5d+15), ab auf  $89,5 \pm 4,8$  ms und zeigt damit nach 5d+15 signifikant ( $p < 0,001$ ) kürzere APDs, als der WT.

Es zeigt sich, dass die Verkürzung der APD50 im WT vorwiegend durch eine Abnehmende Häufigkeit von APs mit langer APD bedingt ist, während die Häufigkeit von APs kürzerer Dauer im Verlauf der Differenzierung im WT praktisch unverändert bleibt. Dies ist in Abb. 3-27 deutlich zu sehen.



**Abb. 3-27:** Häufigkeitsverteilungen der APD50 in WT und KO

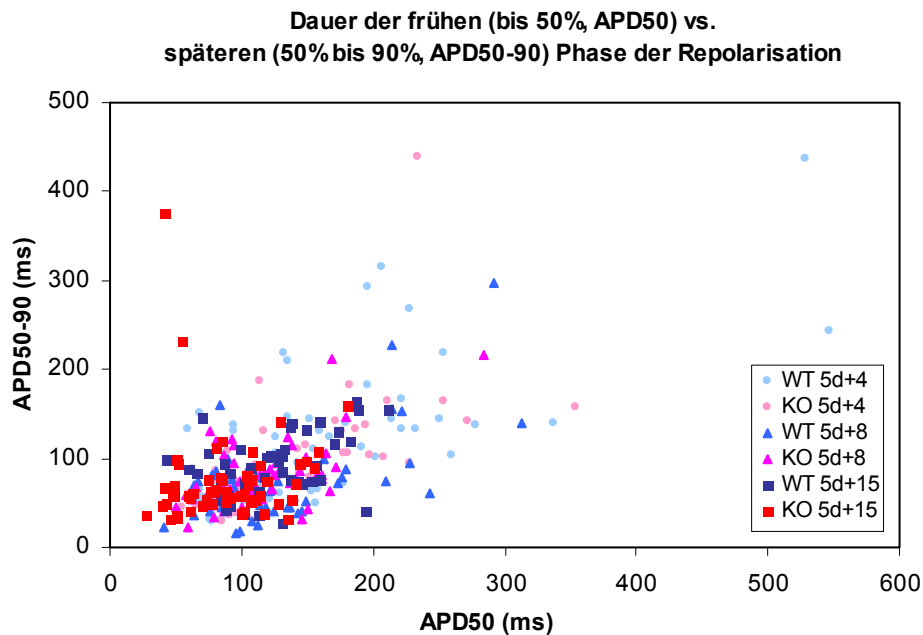
Auch im KO geschieht die Verkürzung der mittleren APD50 zwischen 5d+4 und 5d+8 v.a. durch abnehmende Häufigkeit von APs mit längerer APD50, während im Bereich der kürzeren APDs keine Veränderung in der Häufigkeit festzustellen ist. In dieser Hinsicht gleicht die Entwicklung des KO bis 5d+8 der des WT. Interessanterweise zeigt sich im KO jedoch nach 5d+15 eine generelle (statt wie im WT und wie in der vorherigen Entwicklungsperiode auf längere APDs beschränkte) Verkürzung der APD50. Es erfolgt also zwischen 5d+8 und 5d+15 im KO quasi eine parallele Verschiebung des gesamten Spektrums der APD50 hin zu global kürzeren APDs. Hierdurch kommt es im KO nicht nur zwischen 5d+8 und 5d+15 zu einer sehr viel stärkeren weiteren Verkürzung der mittleren APD50, als im WT. Sondern auch der Mechanismus dieser Verkürzung in diesem Zeitraum unterscheidet sich von dem im WT und dem im KO in der vorhergehenden Differenzierungsperiode (5d+4 bis 5d+8).

### APD80 und APD90

Auch für APD80 und APD90 wurden entsprechende Verläufe und Entwicklungen im Verlauf der Differenzierung festgestellt, wie für die APD50. Auf ihre ausführliche Darstellung wird hier deswegen verzichtet, die entsprechenden Werte finden sich tabellarisch im Anhang.

### Frühe vs. spätere Phase der Repolarisation

Während die APD90 auch von der Dauer der frühen Phase der Repolarisation bis zu 50% abhängt, beschreibt die APD50-90 isoliert den Verlauf der späten Repolarisation. Tatsächlich besteht in beiden Zelllinien zu jedem untersuchten Zeitpunkt nur eine geringe Korrelation zwischen APD50 und APD50-90, wie in Abb. 3-28 dargestellt.



**Abb. 3-28:** Dauer der späteren Phase der Repolarisation (APD50-90) zur Dauer der vorangehenden Phase der Repolarisation (APD50) aufgetragen

Die Geschwindigkeit der späteren Phase der Repolarisation (APD90-50) ist somit in beiden Zelllinien zu jedem Untersuchungszeitpunkt von dem der vorangehenden Phase (APD50) relativ unabhängig.

## 4 Diskussion

ESDC erscheinen als verheißungsvollste Quelle zum Gewebeersatz im Herzen, neuerdings werden sie auch zur Therapie als „biologischer Schrittmacher“ diskutiert. Die gezielte Differenzierung bestimmter Subtypen von Kardiomyozyten, beispielsweise von ventrikulären Zellen für erstere oder Zellen mit ausgeprägten physiologischen Schrittmachereigenschaften für letztere Anwendung, wäre dafür erstrebenswert.

Das Verständnis der Faktoren, welche zur Differenzierung einzelner Subtypen von Kardiomyozyten aus ESC führen, ist eine Voraussetzung zur gezielten Gewinnung solcher (spezialisierter) Zellen zur therapeutischen Anwendung. Die ECM beeinflusst die Differenzierung von embryonalen Stammzellen, wobei Kollagen Typ I der Hauptbestandteil der ECM im embryonalen wie im adulten Herzen ist. Weiterhin ist das Verständnis des Einflusses der ECM auf ESDC, gerade auch angesichts des Remodelings der ECM bei Herzinsuffizienz mit einer Akkumulation von Kollagen Typ I, wesentlich zur Abschätzung des Verhaltens der transplantierten Zellen im Empfängerorgan und der Sicherheit solcher Therapien – insbesondere auch angesichts des bekannten inhärenten arrhythmogenen Potentials von ESDC. Desweiteren wurde bei Herzinsuffizienz eine Aktivierung embryonaler Genexpressionsmuster (FRANCIS 2001) und ein Wiederauftreten typisch embryonaler Ionenströme (TAKEBAYASHI et al. 2006) in Kardiomyozyten festgestellt. In dieser Hinsicht könnte das Verständnis des Einflusses der ECM auf die Funktion von ESDC auch zu einem besseren Verständnis zellulärer Veränderungen in der Herzinsuffizienz beitragen. Arrhythmien sind eine Haupt-Todesursache bei Herzinsuffizienz, weswegen der Einfluss der ECM auf die APs der Kardiomyozyten natürlich von besonderem Interesse ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun erstmalig, dass  $\alpha_1(I)$ -Kollagen die elektrophysiologische Differenzierung von ESDC beeinflusst. Dies ist das erste Mal, dass ein solcher elektrophysiologischer Nachweis gezielt für ein *einzelnes* Substrat der ECM erbracht werden



konnte, nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass die *generelle Komposition* der ECM in Form der künstlichen ECM Matrigel (DING 2000) bzw. der Verlust des wichtigsten zellulären Rezeptors der ECM, des  $\beta$ 1-Integrins (FÄSSLER et al. 1996a), die AP von ESDC beeinflussen.

Für diese Untersuchungen wurde zunächst das Vorgehen für die Differenzierungsversuche optimiert, um möglichst geeigneten Bedingungen zur kardiomyozytären Differenzierung zu erreichen und eine von anderen Faktoren möglichst unbeeinflusste Entwicklung der Zellen zu gewährleisten. Weiterhin wurde eine alternative Technik zur Patch-Clamp-Untersuchung der ESDC entwickelt, welche diese auch ohne enzymatischen Verdau des Kollagens erlaubt.

Im Folgenden soll nun nach einer kurzen Diskussion dieser vorbereitenden Untersuchungen zunächst diskutiert werden, wie weit die in der vorliegenden Arbeit beobachtete (zuvor noch nicht untersuchte) elektrophysiologische Differenzierung des WT mit aus der Literatur bekannten generellen Entwicklungsschritten übereinstimmt, um anschließend die hiervon abweichenden Entwicklungen der APs im KO zu diskutieren. Abschließend sollen diese Veränderungen im KO noch einmal in den Rahmen ihrer möglichen physiologischen und pathophysiologischen Implikationen und ihrer potentiellen therapeutischen Relevanz gestellt werden.

## **4.1 Vorbereitende Untersuchungen**

### **4.1.1 Optimierung der Kulturbedingungen**

Zur Optimierung der Kulturbedingungen wurde vor Beginn der eigentlichen Untersuchung in Anlehnung an den ESCT („Embryonic Stem Cell Test“, SPIELMANN UND SCHOLZ 2002) eine Versuchserie durchgeführt, in welcher sich zeigte, dass eine Anzahl von 300 ESC pro hängendem Tropfen nicht nur zur bestmöglichen kardiomyozytären Differenzierung führte, sondern gleichzeitig auch die Unterschiede in der Differenzierungsrate zwischen KO und WT am deutlichsten hervorbringt.

Unter diesen optimierten Kulturbedingungen sind damit im Gegensatz zu Dings Untersuchung der selben Zelllinien (DING 2000) auch im WT bereits schon nach 5d+3 spontan kontrahierende Zellen sichtbar, so dass die

frühestmögliche Patch-Clamp-Untersuchung einen Tag später, also nach 5d+4 möglich wurde. Auch für den KO waren nach 5d+3 bereits in einem deutlich höheren Anteil von EB spontane Kontraktionen sichtbar, als in Dings Untersuchung der Zelllinien. In der vorliegenden Arbeit wurden somit mindestens ebenbürtige Differenzierungsbedingungen erreicht.

#### **4.1.2 Verfahren zur Patch-Clamp-Untersuchung von ESDC mit intakter ECM**

Das etablierte Prozedere zur Patch-Clamp-Untersuchung von ESDC beinhaltet einen enzymatischen Verdau der ECM. Für die vorliegende Arbeit war dieses Vorgehen nicht möglich, da dadurch die zu untersuchende Einflussgröße auf die APs (das  $\alpha_1(I)$ -Kollagen) entfernt würde. Es musste also eine Technik etabliert werden, welche die Patch-Clamp-Untersuchung der Zellen weitestgehend in ihrer physiologischen Umgebung, d.h. ohne enzymatischen Verdau der ECM, zulässt. Dieses gelang durch Entwicklung einer speziellen Isolationstechnik und Adaptation der zur Patch-Clamp-Untersuchung in intakten Hirnschnitten verwendeten „Reinigungs-“ und „Mischtechnik“.

### **4.2 Der WT zeigt eine normale Differenzierung der ESDC, Mechanismen der Entwicklung**

Arbeitshypothese der vorliegenden Arbeit war, dass der Verlust der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-Funktion ausschließlich sehr frühe Prozesse der kardiomyozytären Differenzierung beeinflusse. Es wurden ESDC im Zeitraum zwischen 5d+4 (frühestmöglicher Zeitpunkt zur AP-Registrierung) und 5d+15 untersucht.

#### **4.2.1 Morphologische Auswertung**

Erste spontan kontrahierende ESDC waren im WT in geringem Umfang nach 5d+3 sichtbar, dieses entspricht der normalen Entwicklung (vgl. 1.4.1 (S. 14) und 1.5.2 (S. 21)). Der Anteil von EBs mit kontrahierenden ESDC nahm bereits bis 5d+4 stark zu und verdoppelte sich bis 5d+8 noch einmal, danach erfolgte bis 5d+15 keine weitere Zunahme (vgl. Abb 3-1 (S. 60)). Der

maximale Anteil von WT-EBs mit kontrahierenden ESDC-Clustern in der morphologischen Auswertung liegt im Mittel mit etwa 82% im Bereich der auch von Ding (DING 2000) für diese Zelllinie berichteten Werte und auch dort hatte eine Plateauphase mit praktisch unveränderten Werten zwischen 5d+8 bis 5d+18 gezeigt. Dieses entspricht auch dem Literatur generell beschriebenen Verlauf (GUAN et al. 1999a, BOHELER et al. 2002, FÄSSLER et al. 1996a).

Im Zuge der Ausreifung von ESDC fällt der Anteil von EBs mit (noch) spontan kontrahierenden ESDC im weiteren Verlauf wieder ab. Dies wird als Zeichen der Reifung der Zellen interpretiert und darauf zurückgeführt, dass terminal spezialisierte Zellen ihre spontane Aktion einstellen (GUAN et al. 1999a, BOHELER et al. 2002, FÄSSLER et al. 1996a). Dieses wurde in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien erst nach 5d+22 beobachtet (DING 2000) und ist damit Hinweis darauf, dass erst zu diesem Zeitpunkt eine terminale Ausdifferenzierung von ESDC in signifikantem Umfang stattfindet. Da in der vorliegenden Arbeit frühe Prozesse der kardiomyozytären Differenzierung untersucht werden sollten, wurde das gewünschte Zeitfenster (noch keine oder nur geringe terminale Differenzierung der Zellen bei gleichzeitigem Einschluss des Zeitpunktes maximaler spontaner Aktivität) somit getroffen.

#### **4.2.2 Early-Pacemaker-APs treten während der Neubildung von ESDC auf**

Inwiefern ein klarer Zusammenhang zwischen Differenzierungszeitpunkt und dem Auftreten bestimmter AP-Morphologien besteht, ist in der Literatur kontrovers; generell lassen sich wohl die meisten AP nicht eindeutig einem der prototypischen Morphologie-Subtypen zuordnen (siehe 1.4.2, S. 16).

Im WT ließ sich deutlich eine Subgruppe von AP abgrenzen (Abb. 3-3), welche der in der Literatur als typisch für ganz früh differenzierte Zellen beschriebenen Early-Pacemaker-AP-Morphologie entsprachen (Abb. 3-2). Diese zeichneten sich durch ein geringes polarisiertes Ruhemembranpotential, geringe AP-Amplitude sowie langsame De- und Repolarisation aus. Aus der Literatur ist für solche APs bekannt, dass sie wesentlich  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig sind – im Gegensatz zum steilen  $\text{Na}^{+}$ -abhängigen

Aufstrich „reifer“ APs. Auch ist in frühen ESDC nicht die spontane Membrandepolarisation der wesentliche Mechanismus der Rhythmogenese, sondern intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen (VIATCHENKO-KARPINSKI et al. 1999), und  $I_f$  ist nicht oder nur schwach ausgeprägt (MALTSEV et al. 1994, ABI-GERGES et al. 2000). Das bedeutet eine weitgehend DDR-unabhängige Rhythmogenese in diesen Zellen. Dieses scheint auch für die der vorliegenden Arbeit charakterisierten Early-Pacemaker-AP zuzutreffen, da deren Spontanfrequenz sich nicht von derjenigen der restlichen Zellen unterschied, obwohl sie eine signifikant langsamere (nur etwa 40% so schnelle) spontane diastolische Depolarisation der Zellmembran zeigen.

Zum Zeitpunkt 5d+4, als sich die ersten Cluster von ESDC gerade erst gebildet hatten, machten die Early-Pacemaker-AP 23% der untersuchten Zellen im WT aus. Auch bis zum Zeitpunkt 5d+8 bildeten sich noch neue Cluster und die ESDC machten noch 12% der APs im WT aus. Zwischen 5d+8 und 5d+15 kam es zu keiner signifikanten weiteren Neubildung von ESDC-Clustern in der morphologischen Auswertung und es waren nach 5d+15 auch keine Early-Pacemaker-APs mehr im WT festzustellen. Das Auftreten von Early-Pacemaker-APs korreliert also offensichtlich mit der Phase der Herausbildung neuer Clustern spontan kontrahierender ESDC. Es ist damit – wie es auch in der Literatur vertreten wird – zu vermuten, dass es sich bei den Zellen mit Early-Pacemaker-AP um sehr junge, gerade neu gebildete ESDC handelt. Zusammen mit dem Verlauf der morphologischen Auswertung lässt sich somit schlussfolgern, dass die Neubildungen von ESDC im WT zwischen 5d+8 und 5d+15 praktisch abgeschlossen ist.

#### **4.2.3 Weitere Typen von AP-Morphologien im WT**

Es konnten APs aller in der Literatur prototypisch beschriebenen AP-Morphologien gefunden werden. Dabei zeigte sich, wie auch von FIJNVANDRAAT et al. 2003b, HE et al. 2003 und DOSS et al. 2007 beschrieben, eine starke Heterogenität der AP-Morphologien, welche eine Zuordnung eines APs zu einer dieser Klassen nicht immer eindeutig zuließ (siehe 3.4.2). Deutlich aufgrund ihrer AP-Parameter abgrenzen ließen sich dabei, wie oben diskutiert, lediglich die Early-Pacemaker-AP. In der dennoch durchgeführten Klassifikation zeigte der WT nach 5d+15 (Abb. 3.8) 17%

Ventrikel-ähnliche APs und 8,5% Vorhof-ähnliche APs. Dass somit zwar bereits einige, aber noch relativ wenige, der als typisch für die *terminale* Ausdifferenzierung beschriebenen APs (Ventrikel-ähnlich und Vorhof-ähnlich) festgestellt wurden, bestätigt, dass das gewünschte Zeitfenster der Untersuchung, die *frühe* Phase der kardiomyozytären Differenzierung, getroffen wurde. Dass erst in geringem Umfang eine terminale Differenzierung stattgefunden hat wird unterstützt von der Tatsache, dass zu diesem Zeitpunkt in der morphologischen Auswertung nicht nur noch kein Abfall stattgefunden hat (in der Untersuchung von Ding geschah dies in deutlicherem Umfang erst nach 5d+26 (DING 2000)), sondern in geringem Umfang noch neue weitere EBs erstmalig ESDC-Cluster zeigten – während es in der terminalen Differenzierung schließlich zu einem Sistieren der Spontanaktivität kommen würde.

Diese Entwicklungen in der qualitativen Auswertung haben natürlich ein Korrelat in der quantitativen Auswertung der AP-Kenngrößen, in die alle APs aufgenommen wurden, wie im Folgenden dargestellt wird

#### **4.2.4 Entwicklung der AP-Kenngrößen im WT im Verlauf der Differenzierung**

Eine Untersuchung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten ES-Zelllinien erfolgte bislang nur in der Arbeit von Ding (DING 2000), weswegen keine elektrophysiologischen Daten zu diesen Zelllinien vorliegen, mit welchen die jetzt ermittelten Daten direkt verglichen werden könnten. Auch ein *quantitativer* Vergleich mit Daten zu anderen Zelllinien ist nur nicht direkt möglich, da diese je nach Zelllinie teilweise stark unterschiedlich sind und auch aus der selben Zelllinie in verschiedenen Arbeiten unterschiedliche Daten gewonnen wurden (vgl. 1.4.2 (S. 16)). Stattdessen kann jedoch ein *qualitativer* Vergleich vorgenommen werden, d.h. ein Vergleich der tendenziellen Entwicklung der unterschiedlichen AP-Kenngrößen im Verlauf der Differenzierung mit den Berichten zu anderen Zelllinien.

##### **4.2.4.1 Depolarisation: AP-Amplitude**

In der Literatur wird eine Zunahme der mittleren AP-Amplitude im Verlauf der Differenzierung berichtet und die durch geringe Amplitude und langsamen

Aufstrich gekennzeichneten Early-Pacemaker-APs wurden v.a. in der ganz frühen Phase der Differenzierung gefunden (WOBUS et al. 1997, FIJNVANDRAAT et al. 2003b, SACHINIDIS et al. 2002).

Auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten WT-Zellen war eine signifikante Zunahme der mittleren AP-Amplitude im Beobachtungszeitraum (d.h. 5d+4 vs. 5d+15) festzustellen. Die deutlichste Zunahme findet dabei von 5d+4 auf 5d+8 statt und korreliert mit einer starken Abnahme der Häufigkeit von Early-Pacemaker-APs im WT, welche zunächst (nach 5d+4) noch beinahe ein Viertel aller ESDC ausmachten. Dabei zeigt die vorliegende Arbeit erstmalig quantitativ, dass die Zunahme der mittleren AP-Amplitude praktisch ausschließlich dadurch bedingt ist, dass der Anteil dieser extrem niederamplitudigen Early-Pacemaker-APs im Verlauf der Differenzierung abnimmt und damit vermutlich durch die relativ seltener werdende Neubildung von ESDC bedingt ist. Denn auch die Häufigkeitsverteilung der Amplituden der restlichen AP entspricht sich im WT dagegen zu allen Untersuchungszeitpunkten praktisch exakt.

Die mittlere MDP liegt dabei zu diesen Zeitpunkten in dem für sie in der Literatur beschriebenen (FIJNVANDRAAT et al. 2003b) Bereich und ändert sich im zeitlichen Verlauf nicht.

#### **4.2.4.2 Depolarisation: $V_{\max}$**

Weiterhin ist für ESDC eine Zunahme der mittleren  $V_{\max}$  im Verlauf der Differenzierung beschrieben worden, wobei gezeigt werden konnte, dass dies im Wesentlichen durch eine Zunahme des schnellen  $\text{Na}^+$ -Stroms ( $I_{\text{Na}}$ ) verursacht ist (FIJNVANDRAAT et al. 2003b, WOBUS et al. 1997, MALTSEV et al. 1994). Obgleich in der frühen Differenzierung genauso APs mit hoher  $V_{\max}$  wie in der späten Differenzierung solche mit geringer  $V_{\max}$  festgestellt wurden, finden sich jedoch grundsätzlich zu Beginn der Differenzierung gehäuft APs mit geringer  $V_{\max}$ , während es in der späteren Differenzierung der ESDC gehäuft solche mit hoher  $V_{\max}$  sind (FIJNVANDRAAT et al. 2003b).

Diese Entwicklung war auch in den untersuchten WT-Zellen festzustellen. Im Gegensatz zur AP-Amplitude zeigte sich jedoch, dass die Zunahme der  $V_{\max}$  im Verlauf der Differenzierung nicht alleine auf das Verschwinden der Early-

Pacemaker-APs zurückzuführen ist. Vielmehr scheint sie ein globaler, auch in fortgeschritten differenzierten Zellen noch stattfindender Prozess zu sein. Ein möglicher Grund hierfür wäre ein zunehmender Einbau von  $\text{Na}_v$ -Kanälen in die Zellmembran der ESDC im Verlauf der Differenzierung. Und tatsächlich ist in der Literatur beschrieben, dass  $\text{Na}_v$  in ganz frühen ESDC zunächst noch nicht oder kaum exprimiert werde. Der Aufstrich des APs sei in ihnen so v.a. durch  $I_{\text{CaL}}$  bedingt und entsprechend deutlich langsamer als in reiferen Zellen mit funktionellem  $I_{\text{Na}}$  (Maltsev et al. 1994). Mit Beginn des Auftretens von  $I_{\text{Na}}$  nimmt die  $V_{\text{max}}$  dann zu (FIJNVANDRAAT et al. 2003b).

#### 4.2.4.3 Repolarisation: APD

Festgestellt wurde von Fijnvandraat et al. in den von ihnen untersuchten ESDC eine Abnahme der mittleren APD während der Entwicklung, wobei deren schnellste Abnahme in der frühen Phase der Differenzierung beobachtet wurde (FIJNVANDRAAT et al. 2003b).

Auch in den untersuchten WT-Zellen war diese Entwicklung festzustellen. Es zeigte sich, dass diese Abnahme dabei eher durch Seltenerwerden von APs mit besonders langsamer Repolarisation bedingt ist, als durch eine Häufung besonders schnell repolarisierender Zellen zu späteren Differenzierungszeitpunkten. Grundsätzlich wurde die ESDC-Population dadurch hinsichtlich der APD homogener, so dass die Spannbreite der festzustellenden APD-Werte mit dem Differenzierungsalter abnahm (aber auch nach 5d+15 immer noch erheblich blieb). Interessanterweise zeigte sich bei weitergehender Analyse der einzelnen Messungen, dass zwar die Mittelwerte aller untersuchten ESDC für APD50 und APD90 sich ähnlich verhalten. Dauer der zweiten Phase der Repolarisation (von 50% bis 90% Repolarisation) in einer gegebenen Zelle korreliert aber eindeutig nicht mit der ersten Phase (der APD50). Diese Beobachtung legt nahe, dass in für die frühe Phase der Repolarisation in den untersuchten Zellen andere Prozesse bzw. Ströme wesentlich sein könnten, als für die späte Phase der Repolarisation. Auch in adulten Kardiomyozyten spielen während des zeitlichen Ablaufs der Repolarisation unterschiedliche Ionenströme wechselnde Rollen (insbesondere verschiedene  $\text{K}^+$ -Ströme sowie der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom) (NERBONNE und KASS 2005).

#### 4.2.4.4 AP-Zykluslänge

In ESDC kommt es im Laufe der Entwicklung zu einer Verkürzung der AP-Zykluslänge (FIJNVANDRAAT et al. 2003a, FIJNVANDRAAT et al. 2003b), entsprechend einer Zunahme der spontanen Kontraktionsfrequenz der Zellen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass diese Entwicklung auch von den hier untersuchten WT-ESDC vollzogen wird.

Auch Ding hatte in ihrer Untersuchung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten WT auf der Ebene der Kontraktionsfrequenzen ganzer Cluster eine (allerdings moderate) Zunahme der Kontraktionsfrequenzen im Verlauf der Differenzierung gesehen (DING 2000). Im Vergleich mit diesen Daten fällt jedoch auf, dass auf der Ebene ganzer Cluster im Mittel durchweg höhere Kontraktionsfrequenzen festgestellt wurden, als die mittlere Spontanfrequenz der in der vorliegenden Arbeit gemessenen AP beträgt. Weiterhin wurde von Ding ein Rückgang der Kontraktionsfrequenzen zwischen 5d+4 auf 5d+7 beobachtet, während in der vorliegenden Untersuchung, und wie es auch für ESDC anderer Zelllinien beschrieben wurde (s.o.), eine kontinuierliche Zunahme der Spontanfrequenzen bzw. Abnahme der AP-Zykluslänge zu beobachten war. Die vermutliche Ursache für diese scheinbare Diskrepanz ist, dass Cluster ganz verschieden große multizelluläre Gebilde sind, deren Größe bzw. Zellzahl nicht in die Auswertung einfließt, während in der vorliegenden Arbeit einzelne APs registriert wurden.

#### 4.2.4.5 DDR

Im Gegensatz zu adulten Zellen ist  $I_f$  in ESDC zunächst nicht oder nur schwach ausgeprägt, nimmt dann allerdings im Verlauf der Differenzierung zu (MALTSEV et al. 1994, ABI-GERGES et al. 2000).

Diesem entsprechend zeigt auch die vorliegende Untersuchung eine kontinuierliche Zunahme der mittleren DDR der WT-ESDC im Verlauf der Differenzierung. Gerade zum frühen Zeitpunkt 5d+4 besteht jedoch keine klare Korrelation zwischen der DDR und der AP-Zykluslänge der untersuchten Zellen. Dieses ist vermutlich dadurch zu erklären, dass gerade in frühen ESDC die Rhythmogenese nicht in erster Linie durch spontane

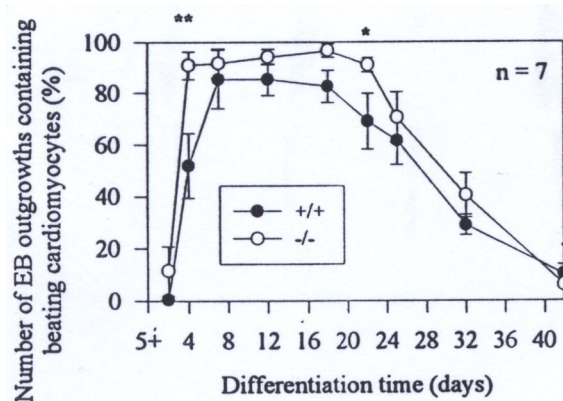


Membrandepolarisation, sondern auch durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen geschieht (VIATCHENKO-KARPINSKI et al. 1999).

### **4.3 Der KO zeigt eine veränderte Differenzierung der ESDC**

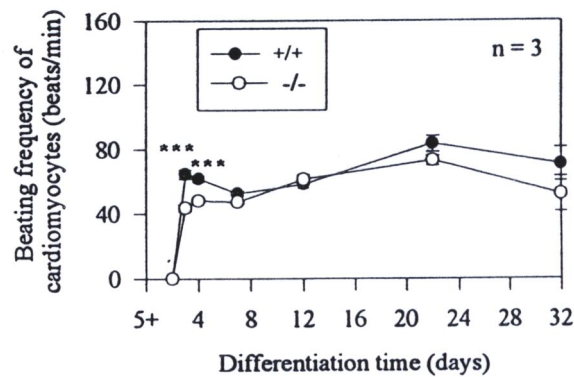
#### **4.3.1 Diskussion der Vorbefunde**

Die bislang einzige Untersuchung der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO ESC stammt von Qing Ding (DING 2000, siehe auch 1.5.2). Diese sah in der morphologischen Auswertung im KO initial, d.h. zum Zeitpunkt 5d+4, signifikant höhere Werte als im WT – im KO hatten sich zu diesem Zeitpunkt also in einem höheren Anteil der plattierten EBs bereits Cluster spontan kontrahierender ESDC gebildet. Nach 5d+8 hatte in ihrer Untersuchung der WT allerdings nunmehr ähnlich hohe Werte erreicht wie der KO – auch wenn dessen Werte durchgängig etwas höher blieben, als im WT. Weiterhin war in dieser Studie nach 5d+22 im KO ein verzögerter Abfall der morphologischen Auswertung festzustellen, d.h. der Rückgang (noch) spontan kontrahierender Cluster von ESDC war im KO gegenüber dem WT verlangsamt. In der Folge näherten sich aber erneut die Werte für KO und WT auf ähnlich niedriges Niveau an. (Siehe Abb. 4-1.) Dieser verzögerte Abfall in der morphologischen Auswertung könnte ebenso Zeichen einer beeinträchtigten terminalen Ausreifung der Zellen sein wie Zeichen einer generell vermehrten kardiomyozytären Differenzierung im KO.



**Abb. 4-1:** Ergebnisse der morphologischen Auswertung von DING 2000

Gleichzeitig konnte Ding in der ganz frühen Entwicklungsstufe von 5d+3 (Zeitpunkt des Einsetzens erster spontaner Kontraktionen) und 5d+4 im KO signifikant niedrigere (etwa 45/min vs. 60/min im WT) Kontraktionsfrequenzen auf der Ebene *ganzer Cluster* feststellen. Dieser Unterschied glich sich jedoch in der Folge schnell an und war zu späteren Zeitpunkten nicht mehr festzustellen, wie in Abb. 4-2 dargestellt ist.



**Abb. 4-2:** Kontraktionsfrequenzen der Cluster von ESDC (DING 2000)

Ebenso konnte sie, bei allerdings kleinen Stichproben ( $n=1-3$ ), keine signifikanten Unterschiede der Expression von MLC-2v, ANF,  $\beta$ -MHC,  $\alpha$ -MHC und VSM-MHC feststellen.

In den Clustern wurden zum Zeitpunkt 7d+18 im WT gut entwickelte und organisierte Myosin-Filamente festgestellt, während diese im KO nur schwach ausgebildet und irregulär organisiert waren, ebenso die sarkomerischen Strukturen. Ob diese Unterschiede im Myosin sich im Verlauf der Differenzierung noch ausgleichen, wurde nicht gezeigt. Eine kompensatorische Hochregulation von  $\alpha_2(I)$ -Kollagen wurde nicht festgestellt. Ding schloss hieraus, dass die kardiomyozytäre Differenzierung im KO initial beschleunigt sei und dabei zu den Zeitpunkten 5d+3 und 5d+4 gegenüber dem WT verminderte spontane Kontraktionsfrequenzen zeige, der Verlust der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-Funktion aber die kardiomyozytäre Differenzierung nur in der sehr frühen Phase beeinflusse und im weiteren Verlauf der Differenzierung kompensiert werde.

Hieraus ergab sich für die vorliegende Untersuchung die Arbeitshypothese, dass im KO die APs der ESDC zum Zeitpunkt 5d+4 gegenüber dem WT verändert seien, sich jedoch rasch im weiteren Verlauf der Differenzierung denen des WT angleichen würden.

#### **4.3.2 Die Neubildung von ESDC ist im KO initial stark beschleunigt**

Wie im WT sind auch im KO erste kontrahierende ESDC in der morphologischen Auswertung nach 5d+3 festgestellt werden. Dabei ist die Bildung von ESDC im KO offensichtlich initial stark beschleunigt und im Gegensatz zum WT wohl bereits nach 5d+4 weitgehend abgeschlossen: Bereits nach 5d+3 zeigen sich im KO in einem sehr viel höheren Anteil von EBs Cluster spontan kontrahierenden ESDC, als im WT (35% vs. 4%), und bereits am folgenden Tag (5d+4) ist im KO ein Anteil von EBs mit spontan kontrahierenden Zellen zu sehen, welcher im WT erst nach 5d+8 erreicht wurde. Es kommt dann im KO im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt 5d+8 Gegensatz zum WT auch zu keiner weiteren signifikanten Zunahme dieses Anteils mehr. Gleichzeitig sind im KO bereits nach 5d+4 im KO fast keine (nur 2%) Early-Pacemaker-APs festzustellen, während sie im WT noch ein Viertel aller Zellen ausmachen und im WT auch nach 5d+8 noch in deutlichem Umfang festzustellen sind.

Zusammengenommen ergibt sich aus diesen Befunden der morphologischen Auswertung und den AP-Registrierungen, dass die Neubildung von ESDC im KO initial stark beschleunigt ist und – ganz im Gegensatz zum WT – bereits zum Zeitpunkt 5d+4 weitgehend abgeschlossen ist.

#### **4.3.3 Die beschleunigte Bildung von ESDC erklärt die initial höhere AP-Amplitude, nicht aber die niedrigere AP-Frequenz im KO**

Zum Zeitpunkt 5d+4 zeigt der KO signifikant längere AP-Zykluslängen, als der WT. Dieser Befund stimmt überein mit der von Ding zu diesem Zeitpunkt beobachteten signifikanten Erniedrigung der Kontraktionsfrequenz der Cluster von ESDC im KO. Dieses Phänomen betrifft dabei global alle KO-

APs zu diesem Differenzierungszeitpunkt und nicht nur isoliert eine Subpopulation von Zellen. Allerdings unterscheiden sich KO und WT dabei nicht hinsichtlich ihrer DDR. Dieses scheinbare Paradoxon von langsamerer Spontanfrequenz bei unveränderter Spontandepolarisation ist vermutlich dadurch zu erklären, dass zu diesem frühen Differenzierungszeitpunkt vorzugsweise noch nicht die spontane Membrandepolarisation, sondern intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen der wesentliche Mechanismus der Rhythmogenese sind (s.o.). Dies ist ein Hinweis darauf, dass im KO ein Einfluss auf das zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Handlings erfolgen könnte (siehe 4.5.3 (S. 107)).

Der zweite Unterschied zwischen KO- und WT-ESDC zu diesem Zeitpunkt besteht in der im KO erhöhten AP-Amplitude. Wie in 3.4.2.1 dargestellt, zeigt sich dabei, dass diese Unterschiede sowohl im Mittelwert als auch in der Häufigkeitsverteilung der AP-Amplitude alleine darauf zurückzuführen sind, dass es zu diesem Zeitpunkt im WT (noch) eine erhebliche Zahl der niedrigamplitudigen Early-Pacemaker-APs gibt, während es im KO nur ganz wenig solche APs gibt. Wie bereits ausgeführt, ist deren Abwesenheit im KO vermutlich darauf zurückzuführen, dass in diesem nach 5d+4 die Neubildung von ESDC bereits weitgehend abgeschlossen ist. Es kann also angenommen werden, dass diese Unterschiede in der AP-Amplitude ausschließlich durch die initial beschleunigte Differenzierung der Kardiomyozyten aus den KO-ESC bedingt waren. Die im KO verlängerte AP-Zykluslänge jedoch ließ sich nicht hierauf zurückführen, zumal in beiden Zelllinien eine Verkürzung der AP-Zykluslänge im Verlauf der Differenzierung festzustellen war, so dass ein Differenzierungsvorsprung des KO zu diesem Zeitpunkt eher zum Gegenteil, nämlich einer gegenüber dem WT verkürzte AP-Zykluslänge hätte führen sollen.

Zusammenfassend erklärt die initial beschleunigte Differenzierung im KO die in diesem initial signifikant höhere AP-Amplitude. Sie erklärt aber nicht die Unterschiede in den Kontraktionsfrequenzen. Es muss also ein anderer, unmittelbarer Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagen Verlusts auf die AP-Zykluslänge angenommen werden. Dabei scheint dieser zumindest zu diesem frühen Zeitpunkt nicht in einer Beeinflussung der spontanen Membrandepolarisation

in der Phase 4 des APs zu bestehen, sondern möglicherweise in Einflüssen auf das zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Handling.

#### **4.3.4 Herausbildung neuer Unterschiede im weiteren Verlauf der Differenzierung**

Auch der KO zeigt generell die für die im Verlauf der Differenzierung von ESDC aus der Literatur zu erwartende Entwicklung der zunehmend schnellen De- und Repolarisation sowie der Zunahme der Spontanfrequenz. Dabei wurde nach der Arbeitshypothese erwartet, dass die eben diskutierten initialen Unterschiede zwischen den Zelllinien sich nunmehr im weiteren Verlauf der Differenzierung rasch angleichen würden. Bis zum nächsten Untersuchungszeitpunkt (5d+8) haben sich auch tatsächlich die AP-Amplituden durch den Rückgang der Early-Pacemaker-APs im WT zwischen KO und WT angeglichen und unterscheiden sich nicht mehr signifikant. Weiterhin kommt es im KO zwischen bis 5d+8 zu einer deutlich stärker ausgeprägten Abnahme der AP-Zykluslängen als im WT, so dass sich nach 5d+8 auch die Unterschiede in dieser Hinsicht ausgleichen. Allerdings ist die Veränderung (Zunahme) der  $V_{\max}$  im KO deutlich stärker als im WT und so dass sich als neuer Unterschied zwischen den Zelllinien nunmehr eine im KO signifikant schnellere Depolarisation manifestiert. (Die  $V_{\max}$  war bereits nach 5d+4 gegenüber dem WT etwas erhöht, zu diesem frühen Zeitpunkt jedoch noch nicht signifikant.) Hinsichtlich der sonstigen Parameter sind zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO festzustellen, obgleich die Zunahme der DDR im Zeitraum von 5d+4 auf 5d+8, ähnlich wie die Verkürzung der AP-Zykluslänge, im KO stärker ausfiel als im WT.

Interessanterweise setzen sich jedoch entgegen der Arbeitshypothese die sich bereit im Zeitraum zwischen 5d+4 und 5d+8 andeutenden unterschiedlichen Entwicklungen beider Zelllinien nun auch im Zeitraum bis 5d+15 weiter fort: Der KO zeigt nunmehr signifikant kürzere AP-Zykluslängen (d.h. Spontanfrequenzen). Dieses korrelierte mit einer nunmehr im KO signifikant erhöhten DDR. Da in späteren Differenzierungsstufen von ESDC intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen wie bereits erörtert wohl weniger Bedeutung

für die Rhythmogenese haben, ist die im KO erhöhte DDR damit auch als Ursache der schnelleren Spontanaktivität anzunehmen. Während es zudem die APD sich im WT 5d+8 und 5d+15 nicht mehr deutlich änderte, nimmt diese im KO erneut eindeutig weiter ab, und ist nunmehr signifikant kürzer als im WT. Dies geschieht dabei durch eine Tendenz hin zu *generell* kürzeren APDs, während es im vorangehenden Zeitraum vorwiegend dadurch geschah, dass APs mit besonders langen APDs seltener wurden. Letzterer Effekt lässt sich durch eine Ausreifung besonders früher ESDC-Entwicklungsstufen erklären. Der nunmehr generelle Effekt auf die APD im KO bis hin zu 5d+15 spricht dagegen eher für einen direkteren Effekt auf die Repolarisation, statt wie zuvor für einen Entwicklungsvorsprung der KO-ESDC. Auch hinsichtlich der Depolarisation verstärken sich bis 5d+8 die zuvor nach 5d+8 bereits festgestellten Unterschiede zwischen KO und WT: Die  $V_{max}$  nimmt gegenüber dem WT noch weiter stark zu. Es zeigen sich dabei innerhalb des KO Zellen mit einer im WT nicht vorkommenden AP-Morphologie finden, welche sich durch ihre extrem hohe  $V_{max}$ , kurze APD und hohe Spontanfrequenz auszeichnet sich fast ausschließlich aus Zellen des Differenzierungszeitpunkts 5d+15 rekrutiert. Diese stellt damit quasi die Extremform der zu diesem Zeitpunkt zwischen KO und WT bestehenden Unterschiede dar. Weiterhin kein Unterschiede mehr zeigen sich nach 5d+15 aber hinsichtlich der AP-Amplitude. Dieses ist offensichtlich dadurch bedingt, dass nunmehr im WT keine Early-Pacemaker-APs mehr festzustellen sind und es damit keinen Unterschied zwischen den Zelllinien in der Häufigkeit dieser niederamplitudigen APs gibt.

#### **4.3.5 AP-Morphologien im KO**

Es wurde bereits diskutiert, dass eine terminale Differenzierung der WT-ESDC innerhalb des Untersuchungs-Intervalls erst in geringem Umfang stattgefunden hat. Auch im KO finden sich nach 5d+15 erst wenige der als terminal differenziert bezeichneten APs. Während von diesen im WT jedoch etwa doppelt so viele Ventrikel-ähnlich sind, wie Vorhof-ähnlich (17% vs. 8,5%), ist im KO (mit 8,9% vs. 16,1%) das Verhältnis praktisch umgekehrt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass im KO nicht die ventrikuläre Differenzierung an sich gestört ist, sondern dieses unterschiedliche

Verhältnis vielmehr durch generelle Veränderungen der AP-Morphologie in dieser Zelllinie entsteht: Zum einen ist nicht im KO nur die APD als der letztlich wesentlichste Unterschied zwischen Ventrikel-ähnlich und Vorhof-ähnlich betroffen, sondern auch die Depolarisationsgeschwindigkeit (in der es keinen Unterschied zwischen Ventrikel- und Vorhof-ähnlich geben sollte) ist im KO erhöht. Zudem zeigt der KO auch eine weiter zunehmende erhöhte Spontanfrequenz im Sinne verstärkter schneller Schrittmacheraktivität, was sich durch eine verstärkte atriale Differenzierung nicht erklären ließe. Vor allem aber sind insbesondere auch die Veränderungen der APD nicht auf eine isoliert eine Subpopulation von Zellen bezogen, sondern es zeigt sich im KO nach 5d+15 deutlich eine globale Verkürzung der APD. Somit ist eher von einem generellen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften aller Zellen auszugehen, als von einem auf eine spezielle Zellart beschränkten Effekt.

Es zeigt sich im KO allerdings noch eine zunächst hinsichtlich ihrer extrem hohen  $V_{\max}$  deutlich abgrenzbare Subgruppe von AP, wobei der Anteil dieser Subgruppe an den gesamten AP mit dem Differenzierungsalter zunimmt. Mit einer Kombination aus extrem schnellem Aufstrich, kurzer APD und hoher Spontanfrequenz bei nicht unterschiedlicher Ruhepolarisation und AP-Amplitude verbildlichte diese Subgruppe von APs gewissermaßen innerhalb des KO die zum Zeitpunkt 5d+15 zwischen KO und WT bestehenden Unterschiede, ohne dass diese auf sie zurückzuführen gewesen wären. Interessanterweise zeigte sie damit Ähnlichkeit mit dem im  $\beta_1$ -Integrin-Knockout beschriebenen (FÄSSLER et al. 1996a) Auftreten aberranter Schrittmacher-ähnlicher AP mit ebenfalls sehr schnellem Aufstrich, kurzer APD und hoher Frequenz. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten WT-ESDC sind vergleichbare APs nicht festzustellen.

#### **4.4 Zusammenfassung der Entwicklungen in WT und KO**

Zusammenfassend zeigt der WT eine normale, durch Zunahme der AP-Amplitude, zunehmend schnellere De- und Repolarisation sowie Zunahme der Spontanfrequenz charakterisierte Entwicklung.

Interessanterweise zeigt sich entgegen der Ausgangshypothese, dass die erwarteten Unterschiede zwischen WT und KO nicht nur die sehr frühe Phase der Differenzierung betreffen: Zwar zeigen die untersuchten Zelllinien auch in der vorliegenden Untersuchung deutlich die bereits von Ding für die frühe Phase der Differenzierung beschriebenen Unterschiede im Verlauf der morphologischen Auswertung. Dabei kann in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass im KO eine beschleunigte Neubildung von ESDC stattfindet und diese die Ursache für das initial häufigere Auftreten von spontan kontrahierenden ESDC-Clustern und die zum Zeitpunkt 5d+4 zunächst im KO im Mittel bereits höhere AP-Amplitude ist. Unterschiede in der spontanen AP-Zykluslänge ließen sich hierauf jedoch nicht zurückführen. Wie erwartet bilden sich diese Unterschiede in der weiteren Differenzierung zwar zurück. Entgegen der Arbeitshypothese bilden sich jedoch hinsichtlich der weiteren AP-Parameter im weiteren Verlauf der Differenzierung immer deutlicher Unterschiede zwischen KO und WT heraus. Dies führte dazu, dass nach 5d+15 die ESDC im KO schneller de- und repolarisierten und eine höhere AP-Spontanfrequenz bei schnellerer spontaner diastolischer Depolarisation zeigten. Diese Unterschiede lassen sich nicht durch das Auftreten bzw. Fehlen einer Subgruppe von AP in einer der beiden Zelllinien erklären, sie sprechen für einen generellen Einfluss des Verlusts des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens auf die AP-Morphologie. Damit zeigt auch der KO die vom WT vollzogene der im Verlauf der Differenzierung schneller werdenden De- und Repolarisation sowie der Zunahme der Spontanfrequenz. Dieses geschieht jedoch im KO in im Vergleich zum WT teils völlig übersteigertem Maße.

Die vorliegende Arbeit zeigt damit am Beispiel des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens erstmalig unmittelbar, dass die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix die elektrophysiologische Differenzierung von Kardiomyozyten beeinflussen kann.



## **4.5 Einordnung der Ergebnisse**

### **4.5.1 Vergleich mit Vorbefunden zum $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO**

In den Vorarbeiten von Ding war vermutet worden, dass lediglich initiale Unterschiede zwischen KO und WT bestünden, diese sich aber im Verlauf rasch angleichen würden. In der vorliegenden Arbeit dagegen zeigen sich dagegen im Verlauf der Differenzierung zunehmend Unterschiede zwischen den ESDC beider Zelllinien.

Hinsichtlich der scheinbar diskrepanten Befunde zur Spontanfrequenz der APs und der ganzer Cluster wurden bereits Erklärungen diskutiert. Zudem zeigten sich in der vorliegende Arbeit die Unterschiede der Differenzierung in der morphologischen Auswertung deutlicher, als diese in der Untersuchung von Ding zu sehen waren, so dass möglicherweise einfach auch in dieser Vorarbeit die Unterschiede zwischen KO und WT nicht so deutlich herauskamen, wie in der vorliegenden Arbeit. Weiterhin lassen sich entgegen ihrer Schlussfolgerung auch in Dings Ergebnissen durchaus Hinweise darauf finden, dass auch noch über 5d+7 hinaus Unterschiede zwischen KO und WT bestanden: So setzte in Dings Untersuchung der Abfall der Häufigkeit noch spontan kontrahierender Cluster in der morphologischen Auswertung (welcher im Zeitfenster der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde) im KO später ein, als im WT. Dieses könnte auf eine gestörte terminale Ausreifung im KO hindeuten. Ebenso war in ihrer Arbeit das ANF zum Zeitpunkt 5d+16 im KO noch deutlich (wenn auch bei n=3 nicht signifikant) erhöht, wobei sich dieses im weiteren Verlauf wieder anglich. ANF wird im gesunden adulten Herzen fast ausschließlich in den chromaffinen Zellen der Vorhöfen exprimiert und wurde interessanterweise auch in ESDC als Marker für die Differenzierung von atrialen Zellen herangezogen (GUAN et al. 1999a, FÄSSLER et al. 1996a). Damit würde ein nach 5d+16 im KO erhöhtes ANF durchaus zu der in der vorliegenden Arbeit festgestellten Verkürzung der APD der KO-APs (d.h. schneller Repolarisation wie in atrialen Zellen) nach 5d+15 passen. Interessanterweise zeigt auch der im Folgenden (siehe 4.5.1.3) noch diskutierte  $\beta_1$ -integrin-KO eine (allerdings permanente) Erhöhung des ANF, welcher Parallelen zu den in der vorliegenden Arbeit im

KO beobachteten AP-Veränderungen zeigt (FÄSSLER et al. 1996a). Zwar wurde die Verwendung von ANF und MLC-2v als Marker für einen bestimmten Subtypen embryonaler Kardiomyozyten kritisch diskutiert, da sie embryonal im Gegensatz zum adulten Herzen nicht ausschließlich auf bestimmte Herzregionen beschränkt sind, Konsens besteht aber in der Feststellung des Abfalls des ANF im Zuge der terminalen Differenzierung der ESDC (FIJNVANDRAAT et al. 2003b). Somit sprechen beides, verspäteter Abfall des Anteils von EB mit noch spontan kontrahierenden Clustern in der morphologischen Auswertung und erhöhtes ANF in Dings Untersuchung, ebenfalls für die in der vorliegenden Arbeit zu diesen Zeitpunkten im KO gezeigte erhöhte Spontanaktivität und eventuell verzögerte Ausreifung der Zellen. Sie bieten damit einen weiteren Hinweis darauf, dass der Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Knockouts sich noch jenseits der ersten Differenzierungstage erstreckt. Weiterhin zeigte sich in Dings Studie, dass die Sarkomere im KO nach 7d+18 verkürzt und stark desorganisiert angelegt waren. Auch dieses spricht dafür, dass zu diesem Zeitpunkt offensichtlich doch noch Unterschiede zwischen KO und WT bestehen. In wieweit sich dieser Defekt der Sarkomerorganisation im weiteren Verlauf angleicht, ist jedoch nicht bekannt. Zusammenfassend lassen sich also auch in Dings Untersuchung des  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO Hinweise auf eine über die initiale Phase hinausgehende Störung der Differenzierung im KO finden. Die Frage, wie weit diese Effekte im weiteren Verlauf kompensiert werden, sollte gerade auch in Zusammennahme mit den Befunden der vorliegenden Arbeit erneut gestellt werden.

#### **4.5.2 Weitere Befunde zu Kollagenen und ESDC**

Interessanterweise führt auch die wiederholte Behandlung von ESDC mit „Matrigel“ (einer Kollagen Typ-I-freien künstlichen ECM) zur Induktion Schrittmacher-ähnlicher Zellen, während gleichzeitig die Differenzierung zu Zellen mit ventrikulärer AP-Morphologie (d.h. längerer APD) vermindert und die zu Zellen mit atrialer AP-Morphologie (d.h. kürzere APD) verstärkt wird (DING 2000). Damit liegen eindeutige Parallelen zu den in der vorliegenden Arbeit gesehenen AP-Veränderungen vor. Matrigel-Behandlung führt weiterhin zu einem gestörten Ansprechen auf Modulatoren der Chronotropie

(BAHARVAND et al. 2005). (Der Mechanismus des Matrigel-Einflusses ist jedoch derzeit unbekannt.)

Auch aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass Kollagene die Differenzierung von Kardiomyozyten beeinflussen, obgleich deren Einfluss auf die Elektrophysiologie der Zellen und die frühesten Phasen der Differenzierung in diesen Arbeiten nicht untersucht wurde. So wurde interessanterweise an kultivierten neonatalen Kardiomyozyten festgestellt, dass nicht nur die Konzentration des Typ-I-Kollagens der ECM, sondern sogar auch dessen Orientierung den Phänotyp der Zellen beeinflusst (SIMPSON et al. 1994). Aus weiteren Befunden dieser Untersuchung wurde geschlußfolgert, dass der  $\alpha_1\beta_1$ -Integrin-Komplex die in der Tertiärstruktur der die Zelle umgebenden Matrix enthaltene Phänotypen-Information aufnimmt und transduziert. Fisher und Periasamy konnten zeigen, dass in embryonalen Kardiomyozyten durch Inhibition der Kollagensynthese auch die Myofibrillogenese unterbrochen wird. Dies äußerte sich auch im Ausbleiben der Kontraktionen sowie darin, dass die Expression von Troponin-T und MHC vermindert wird. Sie schlossen daraus, dass Kollagensynthese auch in der Beibehaltung des differenzierten Phänotyps von Kardiomyozyten eine wesentliche Rolle spielt (FISHER und PERIASAMY 1994).

#### **4.5.3 Integrine als mögliche Vermittler der Effekte im KO**

Wie bereits in der Einleitung ausgeführt (1.5.3), sind Integrine die wichtigsten Oberflächenrezeptoren, über welche die ECM auf die Zellen einwirkt. Sie gelten dabei auch als vermutlicher Vermittler elektrophysiologischer Reaktionen auf mechanische Stimuli in Kardiomyozyten (VALENCIK et al. 2006). Wichtigster Bindungspartner der Integrine sind die Kollagene. Es erscheint daher plausibel, dass Integrine auch an der Vermittlung der im  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO beobachteten Effekte zumindest beteiligt sind. Dafür spricht ebenfalls, dass im KO Sarkomere und Z-Banden disorganisiert sind (DING 2000) und  $\beta_1$ -Integrin nahe der Z-Scheibe lokalisiert ist und an Aktin-Filamenten ankert.

#### 4.5.3.1 Parallelen von $\beta_1$ -Integrin-KO und $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO

Wie der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO, ist auch der  $\beta_1$ -Integrin-KO früh embryonal letal, wobei auch hier die Differenzierung  $\beta_1$ -Integrin-defizienter ESC die Untersuchung des Einflusses auf die kardiomyozytäre Differenzierung erlaubte. Da Kollagen Typ I wichtigster Bindungspartner des  $\beta_1$ -Integrins ist, kann vermutet werden, dass der Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens zu verminderter Stimulation des  $\beta_1$ -Integrins und damit zu zumindest teilweise ähnlichen bzw. abgeschwächten Effekten führt, wie der  $\beta_1$ -Integrin-KO.

Und tatsächlich zeigt der  $\beta_1$ -Integrin-KO-ESDC interessanterweise Veränderungen der AP-Morphologie (FÄSSLER et al. 1996a) ähnlich (aber stärker ausgeprägt) denen des in der vorliegenden Arbeit untersuchten  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO: In ihm ist ebenfalls die APD verkürzt und die AP-Zykluslänge vermindert. Und auch in diesem KO sind in 14-26 Tage alten Kulturen eine Subgruppe von Zellen mit sehr ähnlichen Eigenschaften (sehr schnelle Depolarisation, kurze APD, hohe Spontanfrequenzen) wie die in der vorliegenden Arbeit identifizierte Subgruppe  $V_{max}$ . Desweiteren tritt im  $\beta_1$ -Integrin-KO die Expression des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals, des ersten herzspezifischen Transkripts in ESDC, verfrüht auf – ein Hinweis auf eine auch im  $\beta_1$ -Integrin-KO initial beschleunigte kardiomyozytäre Differenzierung. Parallelen zeigen  $\beta_1$ -Integrin- und  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO weiterhin in der in beiden gestörten Sarkomer-Entwicklung. Im Gegensatz zum  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO jedoch zeigte sich in einer weiteren Untersuchung des  $\beta_1$ -Integrin-KO (GUAN et al. 2001) ein weitestgehendes Ausbleiben des Abfalls in der morphologischen Auswertung. Dieses ist vermutlich dadurch bedingt, dass sich im  $\beta_1$ -Integrin-KO lediglich passager (14d-24d) einige APs mit Ventrikel-ähnlicher oder Vorhof-ähnlicher Morphologie zeigten und auch zum spätesten Untersuchungszeitpunkt (37d) sämtliche isolierte Zellen starke Schrittmachereigenschaften zeigten (FÄSSLER et al. 1996a). Damit zeigt der  $\beta_1$ -Integrin-KO grundsätzlich schwerere Veränderungen in der AP-Morphologie als der  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO und in ihm ist im Gegensatz diesem die terminale Differenzierung der ESDC und die Genexpression im Verlauf schwerstens gestört. Bei vermutetem gleichem oder ähnlichem Wirkmechanismus ist dieser Unterschied dennoch aus zwei Gründen absolut plausibel: Zum einen ist im  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO die Organisation des Gesamt-

Kollagens zwar zum Zeitpunkt 5d+11 noch gestört, nach 5d+28 allerdings mittlerweile kompensiert, so dass zu diesem späteren Differenzierungszeitpunkt von einer nunmehr normal hohen Integrin-Bindung und -Stimulation im  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO ausgegangen werden kann. Dieses würde erklären, dass dort letztlich doch eine normale Ausreifung der Zellen stattfindet. Zweitens ist Kollagen Typ I zwar der wichtigste, nicht aber der einzige Bindungspartner des  $\beta_1$ -Integrins, so dass bei Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens trotzdem eine weitere Stimulation des Rezeptors stattfindet und es nahe liegt, dass das ECM-Integrin-Signalling nur innerhalb gewisser Grenzen gestört ist.

#### **4.5.3.2 Mögliche Mechanismen, über welche Integrine ECM-Einflüsse auf die zelluläre Elektrophysiologie vermitteln**

Calreticulin, ein intrazellulär Integrin-bindendes Protein ist essentiell für die Beeinflussung von  $Ca^{2+}$ -Strömen durch die ECM (COPPOLINO et al. 1995, COPPOLINO et al. 1997). Dabei ist Calreticulin interessanterweise gleichzeitig sowohl wichtig für die Kollagen Typ-I-Bindung des Rezeptors (LEUNG-HAGESTEIJN et al. 1994, COPPOLINO et al. 1995), wie auch für die Vermittlung des Integrin-vermittelten  $Ca^{2+}$ -Einstroms in die Zelle und die intrazelluläre IP3-sensitive  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung. Neben der  $Ca^{2+}$ -Homöostase beeinflusst es noch eine Vielzahl weiterer Zellfunktionen, so u.a. Genexpressionen, die Synthese und den Transport von Ionenkanälen, Oberflächenrezeptoren und Rezeptoren, wobei die Mechanismen dieser Wirkungen erst teilweise bekannt sind (COPPOLINO und DEHAR 1998, BOHELER et al. 2002).

Wie die Integrin-vermittelten Einflüsse auf die AP-Morphologie vermittelt sind, ist weitgehend unbekannt. Neben der Rolle des Calreticulins gibt es einen weiteren möglichen Mechanismus: Im Herzen führt adrenerge Stimulation zu positiv chronotropen, dromotropen und inotropen Effekten. Dem entgegengestellt ist die über den muscarinergen M2-Rezeptor vermittelte negativ chronotrope und dromotrope Wirkung. Eine wichtige Rolle in der Vermittlung dieser Effekte spielt die Regulation der spannungsabhängigen L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanäle (BERS 2001). Es konnte gezeigt werden, dass in ESDC aus dem  $\beta_1$ -Integrin-KO die Modulation des spannungsabhängigen L-Typ

$\text{Ca}^{2+}$ -Stroms über den muscarinergen M2-Rezeptor aufgehoben ist, was u.a. als wesentlicher Mechanismus der im  $\beta_1$ -Integrin-KO erhöhten Spontanaktivität angesehen wird (HESCHELER und FLEISCHMANN 2002). Gleichzeitig ist in frühen Schrittmacher- und Vorhof-ähnlichen ESDC ausschließlich die muscarinerge, nicht jedoch die adrenerge Regulation ausgebildet (KOLOSSOV et al. 2005), welche erst nach 7d+9 bis 7d+12 deutlich ausgeprägt ist (MALTSEV et al. 1999). Damit ist im  $\beta_1$ -Integrin-KO der wesentliche Modulationsmechanismus des L-Typ-Stroms zu frühen Zeitpunkten aufgehoben und zu späteren Zeitpunkten zugunsten adrenerger Einflüsse gestört. In ESDC (wie auch in adulten Kardiomyozyten) beeinflusst der L-Typ-Strom wesentlich die APD (MALTSEV et al. 1994) und Blocker des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals haben einen negativ chronotropen Effekt (WOBUS et al. 1991). So kann auch der Muscarin-Agonist Carbachol je nach bereits entwickeltem Rezeptorbesatz der Zelle potente negative chronotrope Effekte durch Modulation des L-Typ-Stroms (DING 2000) vermitteln. Diese Befunde könnten somit die im  $\beta_1$ -Integrin-KO bereits beobachteten signifikant erhöhten AP-Frequenz und verkürzten APD (FÄSSLER et al. 1996a).

Unter oben angeführten der Annahme, dass verminderte Integrin-Stimulation zu den im  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagen-KO beobachteten Effekten beiträgt, könnte eine solche Integrin-vermittelte Wirkung auf die Modulation des L-Typ Stroms somit die im  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagen KO beobachteten quasi chronotropen (Verkürzung der Zykluslänge) Effekte und die Verkürzung der APD erklären. Diese Vermutung wird weiter gestützt durch Berichte, wonach die Zusammensetzung einer künstlichen ECM in ESDC das Ansprechen auf chronotrope Modulatoren beeinflusst (BAHARVAND et al. 2005). Hier war in auf der Kollagen Typ-I-freien künstlichen ECM Matrigel kultivierten ESDC die Antwort auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation gegenüber der Kontrolle verstärkt.

Wie erwähnt sind die adrenergen Modulationsmechanismen in ESDC nicht von Anfang an voll vorhanden, sondern entwickeln sich erst im späteren Verlauf der Differenzierung. So ist die  $\beta$ -adrenergen Modulation des L-Typ Stroms in sehr frühen ESDC nach 7d+2 noch nicht vorhanden, nach 7d+5 erst schwach und erst nach 7d+12 deutlich ausgeprägt (MALTSEV et al. 1999). Dies würde nun erklären, warum die in der vorliegenden Arbeit

letztlich nach 5d+15 festgestellten Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien sich erst im Verlauf der Differenzierung der Zellen entwickeln.

Auf diesen Wegen könnten die eben dargestellten Mechanismen also Integrin-vermittelt den in der vorliegenden Arbeit im  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO beobachteten Phänotyp hervorrufen. Integrine können jedoch, wie bereits erörtert, eine Vielzahl von Wirkungen auf Zellen ausüben, u.a. auf Genexpression und Differenzierung. Es ist also durchaus möglich, dass auch jenseits der eben diskutierten Signalwege Integrin-vermittelte Effekte eine Rolle für den Phänotyp spielen, beispielsweise durch Beeinflussung der Expression von Ionenkanälen.

## **4.6 Physiologische und pathophysiologische Einordnung der Ergebnisse**

In der Physiologie und Pathophysiologie des Herzens lassen sich Beispiele finden, in denen möglicherweise eine Beeinflussung der physiologischen oder pathophysiologischen elektrophysiologischen Entwicklung der Kardiomyozyten durch das Kollagen der ECM stattfindet.

### **4.6.1 Im Rahmen der Herzinsuffizienz**

Bei Herzinsuffizienz kommt es im Rahmen des Remodelings der ECM, zur Zunahme des Kollagen Typ-I-Anteils in der ECM. Die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung der Verkürzung der APD bei Verlust des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens lässt vermuten, dass umgekehrt eine Vermehrung des Kollagens Typ I zu einer Verlängerung der APD führen kann. Und tatsächlich konnte bei Herzinsuffizienz eine Verlängerung der APD festgestellt werden (NEEF und MAIER 2007), wofür also unter anderem auch die Vermehrung des Kollagens eine Rolle spielen könnte. Funktionell durchaus sinnvoll wäre eine solche Induktion der Verlängerung der APD bei Fibrose insofern, als während der verlängerten Plateauphase es zu einem länger andauernden  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zellen kommen würde (damit verstärkter Kontraktions-Stimulus) und eine längere Zeit für die vollständige Kontraktion zur

Verfügung stünde. Dieses könnte der vermehrten Steifigkeit des Myokards bei Fibrose entgegenwirken. Und tatsächlich wurde festgestellt, dass durch eine Verlängerung der APD sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR auch in Kardiomyozyten aus insuffizienten Herzen abhängig von der Herzfrequenz verbessern lässt (LITWIN und ZHANG 2002). Eine Verminderung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung wiederum ist bekannt als wesentlicher Mechanismus der verminderten Kontraktionskraft bei Herzinsuffizienz (NEEF und MAIER 2007). So könnte eine Verlängerung der APD eine sinnvolle Antwort der Kardiomyozyten auf einen Anstieg des Kollagengehalts in ihrer Umgebung bei Fibrose und die dadurch bedingte vermehrte Steifigkeit des Gewebes sein.

#### **4.6.2 Kollagen im Sinusknoten**

Im Sinusknoten, dem Areal des Herzens, in welchem physiologisch die Zellen mit der höchsten Automatizität sitzen, ist der Kollagen-Anteil in der ECM stark vermindert (JAMES 1967, JAMES 1977, LU et al. 1993). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass vermindertes Kollagen zu erhöhter Automatizität der differenzierten Zellen führt (verkürzter Zykluslänge, erhöhter DDR). Lokal vermindertes Kollagen könnte damit ein wichtiger Differenzierungsreiz zur Herausbildung der speziellen Schrittmacherzellen im Sinusknoten sein. Andererseits zeigen jedoch die  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagen defizienten ESDC ganz im Gegensatz zu APs des Sinusknotens einen besonders schnellen Aufstrich (hohe  $V_{\text{max}}$ ) in Phase 0 des APs, so dass hier sicher noch weitere Faktoren eine Rolle spielen.

Kollagen könnte neben der Organogenese jedoch auch in der Pathophysiologie des Sinusknotens eine Rolle spielen: So kommt es neben einer allgemeinen Zunahme des Kollagen-Gehalts des Herzens im Alter auch zur Fibrose des Sinusknotens und der atrioventrikulären Leitungsbahnen (BLANK und OSSWALD 2007). Interessanterweise nimmt dabei parallel im Alter die Zahl der Schrittmacherzellen im Erregungsleitungssystem um etwa 90% ab (RIBERA-CASADO 1999), während sich in der vorliegenden Arbeit umgekehrt bei Verlust des  $\alpha_1(\text{I})$ -Kollagens eine gesteigerte Bildung von Zellen mit hoher Automatizität – also mit Schrittmachereigenschaften – zeigte.



## **4.7 Therapeutische Implikationen**

Die Therapie mit Stammzellen bzw. der aus ihnen differenzierten Zellen eröffnet große therapeutische Möglichkeiten zur Versorgung des kranken Herzens. Wie bereits erwähnt, besitzen jedoch ESDC ein inertes arrhythmogenes Potential (ZHANG et al. 2002). Vor diesem Hintergrund und zur gezielten Differenzierung kardialer Zellen bestimmter Funktion (beispielsweise Zellen mit ventrikulären Eigenschaften oder solcher mit definierter Schrittmacheraktivität) ist die Untersuchung der Umgebungseinflüsse auf die kardiale Differenzierung und Spezialisierung von Stammzellen und insbesondere auch auf die Elektrophysiologie der differenzierten Zellen von großer Bedeutung. Dies umso mehr, da sowohl bei Myokardfibrose als auch bei der Transplantation von Zellen in ein vernarbendes Infarktgebiet die Zellen einer pathologisch veränderten ECM ausgesetzt sind.

Die vorliegende Arbeit zeigt nun erstmalig, dass ein Bestandteil der ECM einen Einfluss auf die elektrophysiologische Differenzierung von ESDC hat. Insbesondere der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Einfluss auf die APD und Automatizität der ESDC stellt natürlich ein erhebliches potentielles arrhythmogenes Risiko dar. Hinsichtlich des arrhythmogenen Potentials der ESDC erscheint deswegen die weitere Erforschung des Einflusses der Umgebungsfaktoren im Zielgewebe angeraten, um die Sicherheit des Einsatzes dieser Zellen beurteilen zu können. Inwiefern sich der in der vorliegenden Arbeit festgestellte Einfluss des Kollagens auch auf bereits ausdifferenzierte ESDC und die Beibehaltung ihres primären Phänotyps niederschlägt ist eine weitere Frage, die hinsichtlich der therapeutischen Anwendung von ESDC berücksichtigt werden sollte. Ebenso zeigt die vorliegende Arbeit, dass auch für die gezielte Differenzierung von Kardiomyozyten mit speziellen elektrophysiologischen Eigenschaften (z.B. von Ventrikelzellen zum Gewebeersatz nach Infarkt oder von Purkinjezellen als Schrittmacher-Ersatz) die Berücksichtigung des Einflusses der ECM hierauf wichtig ist.

## **5 Zusammenfassung**

Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM) im Herz. Knockout (KO) des  $\alpha_1(I)$ -Kollagens ist embryonal letal. Mittels in-vitro-Differenzierung von Kardiomyozyten aus murinen embryonalen Stammzellen (ESDC, embryonic stem cell derived cardiomyocytes) kann dennoch der Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO auf die Entwicklung von Kardiomyozyten untersucht werden. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass im KO zu Beginn der Differenzierung ESDC-Cluster niedrigere spontane Kontraktionsfrequenzen zeigen, als im Wildtyp (WT).

In der vorliegenden Arbeit wurde deswegen der Einfluss des  $\alpha_1(I)$ -Kollagen-KO auf die Aktionspotentiale (AP) und spontane Membrandepolarisation von frühen ESDC im Vergleich zum WT mittels Patch-Clamp untersucht. Hierfür wurde zunächst eine Technik etabliert, mit welcher diese Untersuchung auch ohne vorherigen Verdau des Kollagens möglich ist. Es zeigt sich im KO zu Beginn der Differenzierung eine höhere AP-Amplitude. Diese lässt sich durch ein im KO nur noch sehr seltenes Vorkommen früher Schrittmacher-APs erklären, vermutlich bedingt durch eine initial stark beschleunigte kardiomyozytäre Differenzierung im KO. Nicht erklärt werden hierdurch die im KO zunächst niedrigeren spontanen AP-Frequenzen der Zellen, so dass hier andere Mechanismen eine Rolle spielen müssen. Zwar gleichen sich wie erwartet diese Unterschiede zwischen KO und WT in den nächsten Tagen der ESDC-Differenzierung zunächst an. Überraschenderweise bilden sich jedoch im weiteren Verlauf neue Unterschiede zwischen KO und WT heraus: Der KO zeigt nun zunehmend höhere spontane AP-Frequenzen und schnellere spontane Membrandepolarisation sowie eine schnellere De- und Repolarisation der APs.

Es konnte damit erstmalig ein direkter Einfluss von ECM-Bestandteilen auf die elektrophysiologische Differenzierung bzw. Eigenschaften von Kardiomyozyten gezeigt werden. Dieser Einfluss des Kollagens auf die Elektrophysiologie der Zellen könnte physiologisch in der lokalen Spezialisierung von Kardiomyozyten in der Organentwicklung eine Rolle spielen und im pathophysiologischen Kontext dazu dienen, die vermehrte Steifigkeit des Gewebes bei Fibrose in der Kontraktion auszugleichen.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

ANF:	Atrialer natriuretischen Faktor
AP:	Aktionspotential
APD:	Aktionspotentialdauer
$C_{fast}$ :	schnelle Komponente des kapazitiven Artefakts
$C_{slow}$ :	langsame Komponente des kapazitiven Artefakts
DD:	Diastolische Depolarisation
DDR:	Diastolische Depolarisationsrate
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EB:	„Embryoid Body“, Embryoidkörperchen
ECM:	Extrazellulärmatrix
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
ESC:	„Embryonic stem cells“, embryonale Stammzellen
ESDC:	„Embryonic Stem cell Derived Cardiomyocytes“, aus embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
FCS:	„Fetal Calf Serum“, fetales Kälberserum
FL:	„Feeder Layer“, ko-kultivierte Fibroblasten, welche die Stammzellen „ernähren“
HCN-Kanäle:	„Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide gated“ – durch Hyperpolarisation aktiviert und durch zyklische Nukleotide gesteuerte Kationen-Kanäle
$I_{CaL}$ :	L-Typ-Calcium-Strom
$I_f$ :	Hyperpolarisations-aktivierter nichtselektiver Kationenstrom
$I_K$ :	Kalium-Strom
$I_{K1}$ :	Einwärts-gleichrichtender Kaliumstrom
IMC:	„Inner Cell Mass“, innere Zellen der Blastozyste
IMDM:	Iscove's modified DMEM
$I_{Na}$ :	Natrium-Strom
KO:	Knockout

---

LIF:	Leukämie inhibierender Faktor
MDP:	Maximale diastolische Polarisierung
mESC:	Murine embryonale Stammzellen
MHC:	„Myosin heavy chain“, Myosin-schwere-Kette
MLC:	„Myosin Light Chain“, Myosin-leichte-Kette
MMC:	Mitomycin C
MTG:	$\alpha$ -Monothioglycerol 3-mercapto-1,2-propandiol
Na <sub>v</sub> -Kanäle:	spannungsabhängige Natrium-Kanäle
NEAA:	„Non Essential Amino Acids“, nichtessentielle Aminosäuren
PBS:	„Dulbecco's Phosphate Buffered Saline“, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
RA:	„Retinoic Acid“, Retinsäure
rER:	Rauhes endoplasmatisches Retikulum
t <sub>Vmax</sub> :	Zeitpunkt der maximalen Depolarisationsgeschwindigkeit (V <sub>max</sub> )
VDCC:	Voltage Dependent Calcium Channels – spannungsabhängige Calcium-Kanäle (L-Typ)
V <sub>max</sub> :	Maximale Depolarisationsgeschwindigkeit
V <sub>mem</sub> :	Membranpotential
VSM:	„Vascular smooth muscle“, glatte Muskulatur der Gefäße
WT:	Wildtyp

## **6.2 Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1:	S. 2
Abb. 1.2:	S. 3
Abb. 1.3:	S. 4
Abb. 1.4:	S. 7
Abb. 1.5:	S. 9
Abb. 1.6:	S. 16
Abb. 1.7:	S. 19
Abb. 1.8:	S. 21
Abb. 1.9:	S. 22
Abb. 1.10:	S. 24
Abb. 1.11:	S. 27
Abb. 2.1:	S. 36
Abb. 2.2:	S. 38
Abb. 2.3:	S. 44
Abb. 2.4:	S. 50
Abb. 2.5:	S. 51
Abb. 3.1:	S. 60
Abb. 3.2:	S. 62
Abb. 3.3:	S. 63
Abb. 3.4:	S. 64
Abb. 3.5:	S. 65
Abb. 3.6:	S. 66
Abb. 3.7:	S. 67
Abb. 3.8:	S. 67
Abb. 3.9:	S. 68
Abb. 3.10:	S. 69
Abb. 3.11:	S. 69
Abb. 3.12:	S. 70
Abb. 3.13:	S. 71
Abb. 3.14:	S. 73
Abb. 3.15:	S. 75
Abb. 3.16:	S. 76

Abb. 3.17:	S. 77
Abb. 3.18:	S. 77
Abb. 3.19:	S. 78
Abb. 3.20:	S. 79
Abb. 3.21:	S. 80
Abb. 3.22:	S. 81
Abb. 3.23:	S. 82
Abb. 3.24:	S. 82
Abb. 3.25:	S. 83
Abb. 3.26:	S. 85
Abb. 3.27:	S. 86
Abb. 3.28:	S. 87
Abb. 4.1:	S. 97
Abb. 4.2:	S. 98
Abb. 6.1:	S. 122

### **6.3 Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1:	S. 53
Tab. 2.2:	S. 53
Tab. 2.3:	S. 53
Tab. 2.4:	S. 54
Tab. 2.5:	S. 54
Tab. 2.6:	S. 54
Tab. 2.7:	S. 54
Tab. 2.8:	S. 55
Tab. 2.9:	S. 55
Tab. 2.10:	S. 55
Tab. 2.11:	S. 55
Tab. 2.12:	S. 55
Tab. 3.1:	S. 61
Tab. 6.1:	S. 119
Tab. 6.2:	S. 120
Tab. 6.3:	S. 121

## 6.4 APD80 und APD90 tabellarisch

WT 5d+4		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	22,4	26,9
Standardfehler	1,6	1,9
Anzahl APs	64	64

KO 5d+4		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	19,5	23,2
Standardfehler	1,2	1,6
Anzahl APs	51	51

T-Test vs. WT 5d+4 (p=)	0,167 n.s.	0,156 n.s.
----------------------------	---------------	---------------

WT 5d+8		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	17,4	20,2
Standardfehler	1,2	1,4
Anzahl APs	50	50

KO 5d+8		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	16,7	19,7
Standardfehler	0,8	1,0
Anzahl APs	52	52

T-Test vs. WT 5d+8 (p=)	0,639 n.s.	0,768 n.s.
----------------------------	---------------	---------------

WT 5d+15		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	18,1	21,3
Standardfehler	0,8	0,9
Anzahl APs	47	47

KO 5d+15		
	APD80 (ms)	APD90 (ms)
Mittelwert	13,9	16,6
Standardfehler	0,7	0,9
Anzahl APs	56	56

T-Test vs. WT 5d+15 (p=)	0,000 p<0.001	0,000 p<0.001
-----------------------------	------------------	------------------

Tab. 6-1

## 6.5 RT50, RT80 und RT90 tabellarisch

WT 5d+4			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	13,3	20,2	24,6
Standardfehler	1,0	1,4	1,8
Anzahl APs	64	64	64

KO 5d+4			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	11,8	17,9	21,5
Standardfehler	0,8	1,2	1,5
Anzahl APs	51	51	51

T-Test vs.	0,273	0,228	0,203
WT 5d+4 (p=)	n.s.	n.s.	n.s.

WT 5d+8			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	10,3	15,0	17,8
Standardfehler	0,6	0,9	1,2
Anzahl APs	50	50	50

KO 5d+8			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	10,0	15,2	18,1
Standardfehler	0,5	0,6	0,8
Anzahl APs	52	52	52

T-Test vs.	0,689	0,863	0,833
WT 5d+8 (p=)	n.s.	n.s.	n.s.

WT 5d+15			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	10,6	16,6	19,7
Standardfehler	0,5	0,7	0,9
Anzahl APs	47	47	47

KO 5d+15			
	RT50 (ms)	RT80 (ms)	RT90 (ms)
Mittelwert	7,7	12,7	15,4
Standardfehler	0,4	0,6	0,8
Anzahl APs	56	56	56

T-Test vs.	0,000	0,000	0,000
WT 5d+15 (p=)	p<0.001	p<0.001	p<0.001

Tab 6-2



## 6.6 Ergebnisse Vorversuche Hanging Drops

200 Zellen pro Hanging Drop								
Zeitpunkt	5d+2		5d+3		5d+4		5d+8	
Genotyp	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM
<b>WT</b>	0.00	0.00	1.43	0.72	16.50	5.14	43.76	13.27
<b>KO</b>	0.00	0.00	10.68	2.24	38.45	8.50	57.24	7.90

300 Zellen pro Hanging Drop								
Zeitpunkt	5d+2		5d+3		5d+4		5d+8	
Genotyp	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM
<b>WT</b>	0.00	0.00	5.72	0.73	39.35	4.62	80.77	4.36
<b>KO</b>	0.00	0.00	46.27	10.15	79.64	8.34	88.94	5.31

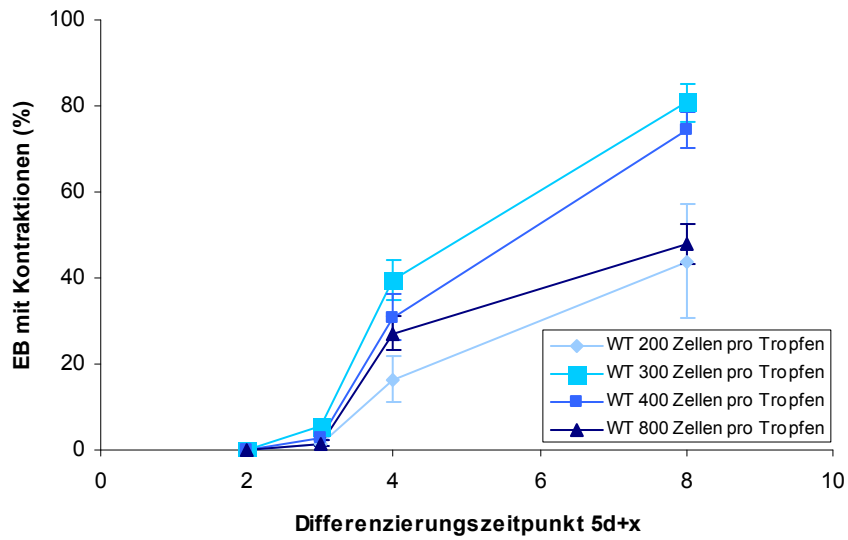
400 Zellen pro Hanging Drop								
Zeitpunkt	5d+2		5d+3		5d+4		5d+8	
Genotyp	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM
<b>WT</b>	0.00	0.00	2.85	0.70	30.79	5.40	74.34	4.31
<b>KO</b>	0.00	0.00	33.57	4.82	65.93	5.25	83.36	4.42

800 Zellen pro Hanging Drop								
Zeitpunkt	5d+2		5d+3		5d+4		5d+8	
Genotyp	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM	% EBs	SEM
<b>WT</b>	0.00	0.00	1.43	0.72	27.20	3.99	47.92	4.68
<b>KO</b>	0.00	0.00	22.81	4.49	54.51	5.05	65.91	5.94

Tab 6-3: Ergebnisse der morphologischen Auswertung der Vorversuche mit verschiedenen Zellzahlen pro Hanging Drop

**Vorversuche: Vergleich der morpholog. Auswertungen  
Anteil EB mit Clustern spontan kontrahierender ESDC**



**Vorversuche: Vergleich der morpholog. Auswertungen  
Anteil EB mit Clustern spontan kontrahierender ESDC**

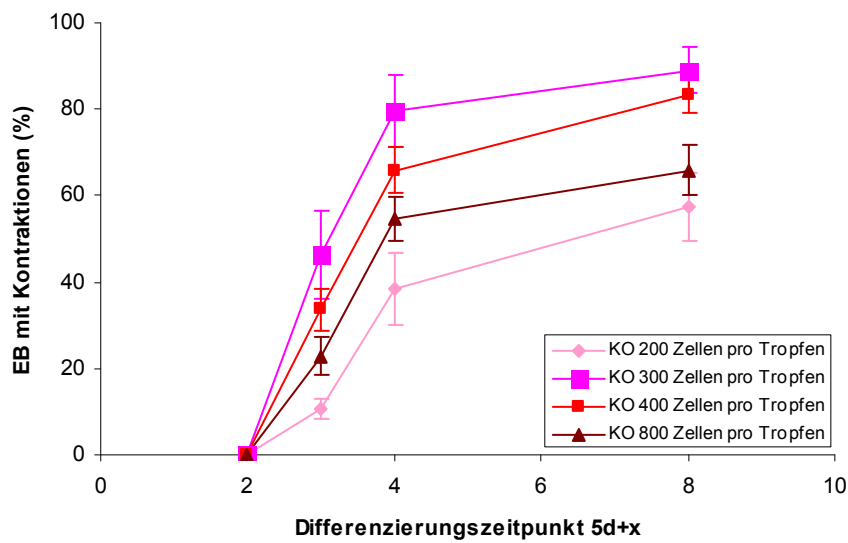


Abb. 6-1: Zeitlicher Verlauf des Anteils von EB mit spontan kontrahierenden ESDC in der morphologischen Auswertung für die Differenzierungsversuche in WT (oben) und KO (unten)

## **7 Literaturverzeichnis**

- Abi-Gerges N, Ji GJ, Lu ZJ, Fischmeister R, Hescheler J, Fleischmann BK (2000): Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol* 523, 377–389
- Arteaga-Solis E, Gayraud B, Ramirez F (2000): Elastic and collagenous networks in vascular diseases. *Cell Struct Funct* 25, 69-72.
- Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK (2005): The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 38, 495-503
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI (1995): Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168, 342–357
- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC (2004): Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 428, 668-673
- Bers, DM: Excitation-contraction Coupling and Cardiac Contractile Force, 2. Auflage; Kluwer Academic Press, Dordrecht 2001
- Blank R, Osswald S (2007): Rhythmusstörungen im Alter – So gelingt auch der letzte Lebensabschnitt im Takt. *Geriatric Prax* 2/2007, 11-17
- Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM (2002): Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes *Circ Res* 91, 189-201
- Bosman FT, Stamenkovic I (2003): Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200, 423-428
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984): Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255–256
- Brilla CG, Maisch B, Zhou G, Weber KT (1995): Hormonal regulation of cardiac fibroblast function. *Eur Heart J Suppl* C, 45-50
- Bruneau BG (2002): Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* 90, 509-519

- Chapman D, Weber KT, Eghbali M (1990): Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67, 787-794
- Chipman SD, Sweet HO, McBride DJ Jr, Davisson MT, Marks SC Jr, Shuldiner AR, Wenstrup RJ, Rowe DW, Shapiro JR (1993): Defective pro alpha 2(I) collagen synthesis in a recessive mutation in mice: a model of human osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1701-1705
- Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF (2000): Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 223, 266-278
- Coppolino MG, Dedhar S (1998): Calreticulin. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 553-558
- Coppolino M, Leung-Hagesteijn C, Dedhar S, Wilkins J (1995): Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 270, 23132-23138
- Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinstein S, St-Arnaud R, Dedhar S (1997): Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386, 843-847
- Corda S, Samuel JL, Rappaport L (2000): Extracellular matrix and growth factors during heart development. *Heart Fail Rev* 5, 119-130
- Czyz J, Wobus AM (2001): Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation* 68, 167-174
- Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA (2005): Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 112: 214-223
- Danen EH, Sonnenberg A (2003): Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol* 201, 632-641
- Dhalla AK, Kandala JC, Weber KT, Guntaka RV (1997): Identification of negative and positive regulatory elements in the rat alpha 1(I) collagen gene promoter. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 143-51
- Ding Q: Influence of extracellular matrix proteins on embryonic stem (ES) cell-derived cardiac differentiation. *Med. Diss. Halle-Wittenberg* 2000

- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985): The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87, 27–45
- Doss MX, Winkler J, Chen S, Hippler-Altenburg R, Sotiriadou I, Halbach M, Pfannkuche K, Liang H, Schulz H, Hummel O, Hübner N, Rottscheidt R, Hescheler J, Sachinidis A (2007): Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Genome Biol* 8, R56
- Dziadek M, Timpl R, Jaenisch R (1987): Collagen synthesis by cell lines derived from Mov-13 mouse embryos which have a lethal mutation in the collagen alpha 1(I) gene. *Biochem J* 244, 375–379
- Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989): A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414, 600-612
- Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seifter S, Blumenfeld OO (1988): Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Moll Cell Cardiol* 20, 267-276
- Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, Buttrick PM, Leinwand LA, Robinson TF, Zern MA, Giambone MA (1989): Localization of types I, III und IV collagen mRNAs in heart tissue by in situ hybridization. *J Moll Cell Cardiol* 21, 103-113
- Ehler E, Perriard JC (2000): Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart. *Heart Fail Rev* 5, 259-269
- Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156
- Fässler R, Meyer M (1995): Consequences of lack of beta 1 integrin expression in mice. *Genes Dev* 9, 1896-1908
- Fässler R, Rohwedel J, Maltsev V, Bloch W, Lentini S, Guan K, Gullberg D, Hescheler J, Addicks K, Wobus AM (1996a): Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* 109, 2989-2999
- Fässler R, Georges-Labouesse E, Hirsch E (1996b): Genetic analyses of integrin function in mice. *Curr Opin Cell Biol* 8, 641-646

- Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK (2006): Cardioprotective c-kit cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 116, 1865-1877
- Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, Schumacher CA, Boheler KR, Lekanne Deprez RH, Christoffels VM, Moorman AF (2003a): Cardiomyocytes purified from differentiated embryonic stem cells exhibit characteristics of early chamber myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1461–1472
- Fijnvandraat AC, van Ginneken AC, de Boer PA, Ruijter JM, Christoffels VM, Moorman AF, Lekanne Deprez RH (2003b): Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells resemble cardiomyocytes of the embryonic heart tube. *Cardiovasc Res* 58, 399-409
- Fisher SA, Periasamy M (1994): Collagen synthesis inhibitors disrupt embryonic cardiocyte myofibrillogenesis and alter the expression of cardiac specific genes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 26, 721-731
- Fishman MC, Chien KR (1997): Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 124, 2099-2117
- Francis GS (2001): Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med* 110 Suppl 7A, 37-46
- Guan K: Differentiation of embryonic stem cells in vitro and modulation of differentiation. Biol. Diss. Halle-Wittenberg 1998
- Guan K, Rohwedel J, Wobus AM (1999a): Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30, 211–226
- Guan K, Furst DO, Wobus AM (1999b): Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation. *Eur J Cell Biol* 78, 813-823
- Guan K, Czyz J, Furst DO, Wobus AM (2001): Expression and cellular distribution of alpha(v)integrins in beta(1)integrin-deficient embryonic stem cell-derived cardiac cells. *J Mol Cell Cardiol* 33, 521-532
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100

- Harbers K, Kuehn M, Delius H, Jaenisch R (1984): Insertion of retrovirus into the first intron of  $\alpha 1(I)$  collagen gene leads to embryonic lethal mutation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 81, 1504-1508
- Hasenfuss G, Pieske B (2002): Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 34, 951-969
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003): Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93, 32-39
- Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, Cleutjens KB, Daemen MJ (2003): The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J Pathol* 200, 516-525
- Hermann HP, Hasenfuss G (2004): Therapie der Herzinsuffizienz. *Intensivmed Notfallmed* 41, 451-464
- Hescheler J, Fleischmann BK (2002): Regulation of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels in the early developing heart: role of beta1 integrins. *Basic Res Cardiol* 97, Supplement 1, 153-158
- Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krauwurst D, Rosenthal W, Schultz G (1991): Morphological, biochemical and electrophysiological characterization of a clonal cell line (H9c2) from rat heart. *Circ Res* 69, 1476-1486
- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM, Addicks K (1997): Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 36, 149-162
- Hynes RO (2002): Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687
- Iruela-Arispe ML, Vernon RB, Wu H, Jaenisch R, Sage EH (1996): Type I collagen-deficient Mov-13 mice do not retain SPARC in the extracellular matrix: implications for fibroblast function. *Dev Dyn* 207, 171-183
- James TN (1967): Anatomy of the cardiac conduction system in the rabbit. *Circ Res* 20, 638-648
- James TN (1977): The sinus node. *Am J Cardiol* 40, 965-986

- Jane-Lise S, Corda S, Chassagne C, Rappaport L (2000): The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail Rev* 5, 239-250
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F (2006): Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 367, 113-121
- Jaquet K, Krause KT, Denschel J, Faessler P, Nauerz M, Geidel S, Boczor S, Lange C, Stute N, Zander A, Kuck KH (2005): Reduction of myocardial scar size after implantation of mesenchymal stem cells in rats: what is the mechanism? *Stem Cells Dev* 14, 299-309
- Jia ZQ, Mickle DA, Weisel RD, Mohabeer MK, Merante F, Rao V, Li G, Li RK (1997): Transplanted cardiomyocytes survive in scar tissue and improve heart function. *Transplant Proc* 29, 2093-2094
- Kamino K (1991): Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol Rev* 71, 53-91
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G, Huber I, Satin J, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2004): Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 1282-1289
- Keller RS, Shai SY, Babbitt CJ, Pham CG, Solaro RJ, Valencik ML, Loftus JC, Ross RS (2001): Disruption of integrin function in the murine myocardium leads to perinatal lethality, fibrosis, and abnormal cardiac performance. *Am J Pathol* 158, 1079-1090
- Kimes BW, Brandt BL (1978): Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res* 78, 367-381
- King MW (2005 (Abrufdatum)):  
<http://web.archive.org/web/20050329091621/http://web.indstate.edu/thcm/mwking/extracellularmatrix.html>)



- Koh GY, Klug MG, Soonpaa MH, Field LJ (1993): Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. *J Clin Invest* 92, 1548-1554
- Kolossov E, Fleischmann BK, Liu Q, Bloch W, Viatchenko-Karpinski S, Manzke O, Ji GJ, Bohlen H, Addicks K, Hescheler J (1998): Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 143, 2045-2056
- Kolossov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J, Fleischmann BK (2005): Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *FASEB J* 19, 577-579
- Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK (2006): Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 203, 2315-2327
- Kral V: Untersuchung verschiedener Methoden der Differenzierungshemmung bei Langzeitkultivierung embryonaler Stammzellen D3 im Hinblick auf die Durchführung des Embryonic Stem Cell Tests. Vet. Med. Diss. Berlin 2006
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK, Rohwedel J (2000): Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 92, 193-205
- Leung-Hagesteijn CY, Milankov K, Michalak M, Wilkins J, Dedhar S (1994): Cell attachment to extracellular matrix substrates is inhibited upon downregulation of expression of calreticulin, an intracellular integrin alpha-subunit-binding protein. *J Cell Sci* 107, 589-600
- Litwin SE, Zhang D (2002): Enhanced sodium-calcium exchange in the infarcted heart: effects on sarcoplasmic reticulum content and cellular contractility. *Ann N Y Acad Sci* 976, 446-453

- Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R (1997): Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1852-1856
- Löffler G: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 3. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1999
- Lohler J, Timpl R, Jaenisch R (1984): Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* 38, 597–607
- Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR (1997): Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* 100, 2315-2324
- Lu Y, James TN, Yamamoto S, Terasaki F (1993): Cardiac conduction system in the chicken: gross anatomy plus light and electron microscopy. *Anat Rec* 236, 493-510
- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R (2001): Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292, 1389–1394
- Magin TM, McWhir J, Melton DW (1992): A new mouse embryonic stem, cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20, 3795-3796
- Maltsev VA, Lakatta EG (2008): Dynamic interactions of an intracellular Ca<sup>2+</sup> clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc Res* 77, 274-284.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993): Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44, 41-50
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J (1994): Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 75, 233-244

- Maltsev VA, Ji GJ, Wobus AM, Fleischmann BK, Hescheler J (1999): Establishment of beta-adrenergic modulation of L-type Ca<sup>2+</sup> current in the early stages of cardiomyocyte development. *Circ Res* 84, 136-145
- Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634–7638
- Menasche P (2004): Cellular transplantation: hurdles remaining before widespread clinical use. *Curr Opin Cardiol* 19, 154-161
- Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, Bel A, Sarateanu S, Scorsin M, Schwartz K, Bruneval P, Benbunan M, Marolleau JP, Duboc D (2003): Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 41, 1078-1083
- Min JY, Yang Y, Sullivan MF, Ke Q, Converso KL, Chen Y, Morgan JP, Xiao YF (2003): Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125, 361-369
- Miner EC, Miller WL (2006): A look between the cardiomyocytes: the extracellular matrix in heart failure. *Mayo Clin Proc* 81, 71-76
- Molleman A: Patch Clamping. John Wiley & Sons Ltd., Chichester 2003
- Moorman AF, de Jong F, Denyn MM, Lamers WH (1998): Development of the cardiac conduction system. *Circ Res* 82, 629-644
- Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, Muller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus HA, Franz WM (2000): Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J* 14, 2540–2548
- Mummery C, Ward D, van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M, Pera M (2002): Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat* 200, 233-242
- Munke M, Harbers K, Jaenisch R., Francke U (1986): Chromosomal mapping of four different integration sites of Moloney murine leukemia virus including the locus for alpha-1(I) collagen in mouse. *Cytogenet Cell Genet* 43, 140-149

- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ (2004): Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993): Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8424-8428
- Nakajima Y, Morishima M, Nakazawa M, Momma K, Nakamura H (1997): Distribution of fibronectin, type I collagen, type IV collagen, and laminin in the cardiac jelly of the mouse embryonic heart with retinoic acid-induced complete transposition of the great arteries. *Anat Rec* 249, 478-485
- Nakano T, Kodama H, Honjo T (1994): Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101
- Nattel S, Maguy A, Le Bouter S, Yeh YH (2007): Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. *Physiol Rev* 87, 425-456
- Neef S, Maier LS (2007): Remodeling of excitation-contraction coupling in the heart: inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca(2+) leak as a novel therapeutic approach. *Curr Heart Fail Rep* 4, 11-17
- Neher E (1991): Ion channels for communication between and within cells. (Nobel Lecture) <http://nobelprize.org/medicine/laureates/1991/neher-lecture.pdf>
- Neher E, Sakmann B (1976): Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802
- Nerbonne JM, Kass RS (2005): Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 85, 1205-1253
- Nichols J, Evans EP, Smith AG (1990): Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* 110, 1341-1348
- Numberger M, Draguhn A: Patch-Clamp Technik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 1996
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE (2004): Bone marrow-derived

- hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 10, 494-501
- OMIM - „Online Mendelian Inheritance in Man“ / Johns Hopkins University 2007 (Abrufdatum):  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=120150> (
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705
- Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams RL (1990): Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 141, 344-352
- Perry D (2000): Patients' voices: the powerful sound in the stem cell debate. *Science* 287, 1423
- Piper HM: Herz; in: Lehrbuch Vorklinik, Teil C; Schmidt RF, Unsicker K, Kurtz A, Scharlt M (Hrsg.); Deutscher Ärzte-Verlag / Köln 2003, 139-177
- Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA (1979): The biosynthesis of collagen and its disorders (second of two parts). *N Engl J Med* 301, 77-78
- Ribera-Casado JM (1999): Ageing and the cardiovascular system. *Z Gerontol Geriatr* 32, 412-419
- Risau W, Sariola H, Zerwes HG, Sasse J, Eklom P, Kemler R, Doetschman T (1988): Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 102, 471-478
- Rodda SJ, Kavanagh SJ, Rathjen J, Rathjen PD (2002): Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development. *Int J Dev Biol* 46:449-458
- Rohwedel J, Guan K, Wobus AM (1999): Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro. *Cells Tissues Organs* 165, 190-202
- Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus Am (1994): Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164, 87-101
- Rohwedel J, Sehlmeier U, Shan J, Meister A, Wobus AM (1996): Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble

- undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int* 20, 579–587
- Sachinidis A, Kolossov E, Fleischmann BK, Hescheler J (2002): Generation of cardiomyocytes from embryonic stem cells experimental studies. *Herz* 27, 589-597
- Sachs HG, McDonald TF, DeHaan RL (1973): Tetrodotoxin sensitivity of cultured embryonic heart cells depends on cell interactions. *J Cell Biol* 56, 255-258
- Sasse P, Zhang J, Cleemann L, Morad M, Hescheler J, Fleischmann BK (2007): Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations, a potential pacemaking mechanism in early embryonic heart cells. *J Gen Physiol* 130, 133-144
- Schmidt RF, Thews G (Hrsg.): *Physiologie des Menschen*. 27. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 1997
- Schnieke A, Harbers K, Jaenisch R (1983): Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the  $\alpha 1(I)$  collagen gene. *Nature* 304, 315-320
- Sigworth FJ (1986): The patch clamp is more useful than anyone had expected. *Fed Proc* 45, 2673-2677
- Simpson DG, Terracio L, Terracio M, Price RL, Turner DC, Borg TK (1994): Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *J Cell Physiol* 161, 89-105
- Sipido KR, Marban E (1991): L-type calcium channels, potassium channels and novel non-specific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle. *Circ Res* 69, 1487-1499
- Smith AG (2001): Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cel Dev Biol* 17, 435-462
- Sperelakis N (1978): Cultured heart cell reaggregate model for studying cardiac toxicology. *Environ Health Perspect* 26, 243-267
- Sperelakis N, Pappano AJ (1983): Physiology and pharmacology of developing heart cells. *Pharmacol Ther* 22, 1-39
- Sperelakis N, Shigenobu K (1972): Changes in membrane properties in chick embryonic heart during development. *J Gen Physiol* 60, 430-453
- Spielmann H, Scholz G (2002): Invitox Protokoll 113 - Embryonic stem cell test (EST). <http://ecvam-sis.jrc.it> bzw.

- dbalm.jrc.cec.eu.int/public\_view\_doc.cfm?id=DC5ABDF7AC30F1B7DF7E  
F27E87D68AAC7180BB0BC12CB10496CDA74B54630A05A3291B8955  
81F634
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P (2002): Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 106,1913-1918
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993): Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423, 511-518
- Tagawa H, Koide M, Sato H, Zile MR, Carabello BA, Cooper G 4th (1998): Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ Res* 82, 751-761
- Takebayashi S, Li Y, Kaku T, Inagaki S, Hashimoto Y, Kimura K, Miyamoto S, Hadama T, Ono K (2006): Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 766-773
- Tang YL, Zhao Q, Qin X, Shen L, Cheng L, Ge J, Phillips MI (2005): Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg* 80, 229-236
- Terracio L, Rubin K, Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R, Borg TK (1991): Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res* 68, 734-744
- Thomas KR, Capecchi MR (1987): Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147
- Valencik ML, Zhang D, Punske B, Hu P, McDonald JA, Litwin SE (2006): Integrin activation in the heart: a link between electrical and contractile dysfunction? *Circ Res* 99, 1403-1410

- Van der Rest M, Garrone R „Collagen family of proteins” (1991) *FASEB J* 5, 2814–2823
- Viatchenko-Karpinski S, Fleischmann BK, Liu Q, Sauer H, Gryshchenko O, Ji GJ, Hescheler J (1999): Intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations drive spontaneous contractions in cardiomyocytes during early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8259-8264
- Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006): The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int* 17, 319-336
- Villarreal FJ, Dillmann WH (1992): Cardiac hypertrophy induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262, 1861-1866
- Watt FM and Hogan BL (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427–1430
- Weber KT, Brilla CG (1991): Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83, 1849-1865
- Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG (1987): Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 10,Suppl 6, 37-50
- Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP (1994): Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 26, 279–292
- Wie H, Juhasz O, Li J, Tarasova YS, Boheler KR (2005): Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *J Cell Mol Med* 9, 804-817
- Wiles MV, Keller G (1991): Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259–267
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM (1988): Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684–687
- Wobus AM, Guan K (1998): Embryonic stem cell-derived cardiac differentiation: modulation of differentiation and "loss-of-function" analysis in vitro. *Trends Cardiovasc Med* 8, 64-72



- Wobus AM, Guan K, Yang HT, Boheler KR (2002): Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol.* 185, 127-156
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J (1984): Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152, 212-219
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J (1991): Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation* 48, 173-182
- Wobus AM, Guan K, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G, Fleischmann B, Katus HA, Hescheler J, Franz WM (1997): Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29, 1525–1539
- Yamada KM, Miyamoto S (1995): Integrin transmembrane signalling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 7, 681-689
- Zandstra PW, Le HV, Daley GQ, Griffith LG, Lauffenburger DA (2000): Leukemia inhibitory factor (LIF) concentration modulates embryonic stem cell self-renewal and differentiation independently of proliferation. *Biotechnol Bioeng* 69, 607–617
- Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, Dudley Jr SC (2002): Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 106, 1294-1299

---

**Verzeichnis von Publikationen, die sich auf die vorliegende  
Dissertationsschrift beziehen**

**Neef S**, Höcht E, Qing D, Maier LS, Guan K, Picht E, Melzer M, Fässler R, Hasenfuß G, Wobus AM „Typ I Kollagen beeinflusst frühe Prozesse der kardialen Differenzierung von embryonalen Stammzellen“ (Vortrag Jahrestagung der DGK 2004)

## **Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater, Prof. Dr. med. Lars S. Maier, für freundliche Hilfe, praktische wie theoretische Unterstützung und Motivation. Das Vorbild seiner Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten war es nicht zuletzt, was mich dazu motiviert hat, weiterhin wissenschaftlich tätig sein zu wollen. Auch im Verlauf der letzten Jahre war er für mich eine Quelle der Motivation und des profunden wissenschaftlichen und klinischen Verständnisses.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. med. Elisabeth M. Zeissberg (Harvard University, Boston/USA) bedanken für die Überlassung des Themas, das tatkräftige Anstieben der Untersuchungen, Rat in vielen praktischen und theoretischen Fragen sowie nicht zuletzt die geduldige Motivierung in schwierigen Zeiten.

Prof. Dr. rer. nat. Anna M. Wobus danke ich herzlich für die Überlassung der untersuchten Zelllinien sowie Dr. rer. nat. Qing Ding für die erste Untersuchung dieser Zellen, aus welcher sich erst der Anstoß für die vorliegende Arbeit ergab.

Weiterhin danken möchte ich Dr. rer. nat. Kaomei Guan-Schmidt, in deren gemeinsamem Labor ich freundlicherweise die Zellkulturen durchführen durfte.

Ebenfalls gilt mein tiefer Dank Dr. med. Eckard Picht, welcher mich in die Tiefen und Untiefen des Patch-Clampings einführt.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Mit-Doktoranden im Stammzelllabor bedanken, ganz besonders bei Diana Lages (deren Aufzeichnungen zur Stammzellkultur Gold wert waren) und Frieder Wolf, sowie bei unseren TAs Susanne Burkhardt und Anke Cierpka für die freundliche Zusammenarbeit und gute Laune.

Abschließend möchte ich meinen Dank Prof. Dr. med. Gerd Hasenfuß aussprechen, der mich nicht nur in seiner Abteilung die Doktorarbeit machen ließ, sondern mir nun auch die Gelegenheit zu einer hochinteressanten klinischen Ausbildung sowie zur weiteren wissenschaftlichen Tätigkeit gibt..

## **Lebenslauf**

Am 13. Juli 1975 wurde ich, Stefan Neef, in Berlin-Charlottenburg als Sohn von Brigitte und Dr. phil. Rainer Neef geboren. Meine Einschulung erfolgte 1982. 1995 legte ich das Abitur ab (Gesamtnote 1,0). Den Zivildienst leistete ich vom Sommer 1995 bis Sommer 1996. Im Wintersemester 1996 begann ich das Studium der Physik an der Georg-August-Universität Göttingen. Das Studium der Humanmedizin an der Universitätsmedizin Göttingen nahm ich im Wintersemester 1997 auf. Für die vorliegende Arbeit setzte ich diese Studien vom Sommersemester 2003 bis einschließlich Wintersemester 2004 aus. Die daraus hervorgegangenen Ergebnisse konnte ich 2004 auf der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in einem Vortrag präsentieren. Nach Ablegen des 2. Staatsexamens begann ich das Praktische Jahr, welches ich im Ospedale die Brunico (Innere Medizin), im Städtischen Klinikum Oldenburg (Innere Medizin und Chirurgie) sowie im Niedersächsischen Landeskrankenhaus Wehnen (Wahlfach Psychiatrie) absolvierte und nach dem Sommersemester 2005 mit dem 3. Staatsexamen („sehr gut“) abschließen konnte. Seit März 2006 bin ich als Assistenzarzt in der Abteilung für Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen beschäftigt und neben meiner klinischen Tätigkeit dort auch wissenschaftlich aktiv.