

DER EINFLUSS VON *RESVERATROL* AUF DIE
KARDIALE DIFFERENZIERUNG VON EMBRYONALEN
STAMMZELLEN UND DIE ENTSCHLÜSSELUNG DES
ZUGRUNDELIEGENDEN SIGNALWEGNETZWERKES
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON
MEMBRANSTÄNDIGEN ESTROGENREZEPTOREN UND
DER ADENOSINMONOPHOSPHAT AKTIVierten
KINASE

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von: Matthias Jahnen
geboren am 11.05.1993 in Bad Neuenahr-Ahrweiler

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg
2. Herr Prof. Dr. Thomas Zimmer
3. Herr Prof. Dr. Alexander Kleger

Tag der öffentlichen Verteidigung: 20.04.2021

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2 EINLEITUNG.....	3
2.1 EMBRYONALE STAMMZELLEN UND EMBRYOID BODIES ALS MODELLSYSTEM.....	3
2.3 KARDIALE DIFFERENZIERUNG AUS EMBRYONALEN STAMMZELLEN UND KARDIALE MARKER ..	6
2.4 DAS PFLANZLICHE POLYPHENOL <i>RESVERATROL</i>	7
2.5 ESTROGENREZEPTOREN.....	10
2.6 ADENOSINMONOPHOSPHAT AKTIVIERTE KINASE	14
2.7 SIRTUINE.....	20
2.8 DAS <i>RESVERATROL</i> SIGNALWEGNETZWERK	23
3 ZIELSTELLUNG.....	25
4 MATERIAL UND METHODEN.....	26
4.1 MATERIALIEN	26
4.1.1 Geräte	26
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	28
4.1.4 Puffer, Lösungen und Gele	30
4.1.5 Res.- und Blocker-Stocklösung	31
4.1.6 Medien.....	32
4.1.7 Immunfluoreszenz und Western Blot.....	32
4.1.8 Primer	33
4.1.9 Software	33
4.2 METHODEN	34
4.2.1 Zellkultur.....	34
4.2.2 Ca^{2+} -Signal Messung	38
4.2.3 Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot.....	39
4.2.4 Immunfluoreszenz	44
4.2.5 Genexpression.....	45
4.2.6 Statistische Auswertung.....	48
5 ERGEBNISSE.....	49
5.1 ZELLKULTUR	49
5.1.1 Schlaganalyse der ausplattierten Embryoid Bodies	49
5.2 ESTROGEN-REZEPTOR ANALYSE.....	51
5.3 Ca^{2+} -SIGNAL ANALYSE	53
5.4 AKTIVITÄTSANALYSE DER AMPK	61
5.4.1 Inkubation mit Resveratrol	61
5.4.2 Inkubation mit Resveratrol und Signalwegblockern.....	63
5.5 QUANTIFIZIERUNG KARDIALER MARKER.....	67
5.5.1 qPCR.....	67
5.5.2 Western Blot.....	68
6 DISKUSSION.....	69
6.1 ZELLKULTUR UND SCHLAGANALYSE DER AUSPLATTIERTEN EMBRYOID BODIES.....	69
6.2 ESTROGEN REZEPTOR ANALYSE	71
6.3 Ca^{2+} -SIGNAL MESSUNG.....	73

6.4 QUANTIFIZIERUNG DER PAMP-KINASE AKTIVITÄT	75
6.5 ANALYSE DER KARDIALEN MARKER.....	78
7 SCHLUSSFOLGERUNG	82
8 ANHANG.....	85
8.1 SCHLAGFREQUENZ ANALYSE AUSPLATTIERTER <i>EBS</i>	85
8.2 AKTIVITÄTSANALYSE DER AMPK	85
8.3 ESTROGENREZEPTOR ANALYSE	86
9 QUELLENVERZEICHNIS.....	87
10 APPENDIX.....	I
10.1 DANKSAGUNG.....	I
10.2 LEBENS LAUF.....	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
10.3 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	II

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Marker der Kardiomyogenese in <i>Embryoid Bodies</i>	7
Abb. 2 <i>Resveratrol</i> und Estradiol (E2) Strukturformel	9
Abb. 3 Estrogenrezeptor mit Agonisten und Antagonisten.....	12
Abb. 4 Wirkungsweise von Estrogenrezeptor α/β und GPER-1	14
Abb. 5 Schematische Darstellung der AMPK.....	19
Abb. 6 Schematische Darstellung eines Sirtuin Proteins	22
Abb. 7 Beschriebene Interaktionspartner von <i>Res.</i> und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Signalwegblocker	24
Abb. 8 Gewinnung der embryonalen Stammzellen aus Mausblastozysten und Beginn des Zellkulturzeitstrahls.....	37
Abb. 9 Zellkulturzeitstrahl in Relation zu den angewandten Methoden.....	37
Abb. 10 Schlaganalyse der ausplattierten <i>EBs</i>	50
Abb. 11 Immunfluoreszenz gegen ER α , ER β , GPER an nicht permeabilisierten Einzelzellen	51
Abb. 12 Immunfluoreszenz gegen ER an ausplattierten <i>EB's</i> im Zeitverlauf	52
Abb. 13 Ca ²⁺ -Signale in dissoziierten <i>EB</i> -Zellen 10, 25, 40 und 120 Sek. nach <i>Res.</i> -Zugabe	53
Abb. 14 Ca ²⁺ -Signale gemessen an dissoziierten <i>EBs</i> nach Zugabe von <i>Res.</i>	54
Abb. 15 Ca ²⁺ -Signale gemessen an dissoziierten <i>EBs</i> nach Zugabe von <i>Res.</i>	55
Abb. 16 Ca ²⁺ -Signale gemessen an dissoziierten <i>EBs</i> (<i>Res.</i> 50 vs. <i>Res.</i> 50 + ICI 182 780)....	56
Abb. 17 Ca ²⁺ -Signale gemessen an dissoziierten <i>EBs</i> (<i>Res.</i> 50 vs. <i>Res.</i> 50 + Tamoxifen).....	57
Abb. 18 Ca ²⁺ -Signale gemessen an dissoziierten <i>EBs</i> (ICI 182 780 vs. Tamoxifen)	57
Abb. 19 Positiv Kontrolle mit 10 μ M ADP	58
Abb. 20 Anteil an Zellen mit Ca ²⁺ -Signal.....	58
Abb. 21 Vergleich der maximalen Signalamplituden	59
Abb. 22 Vergleich der Zeit bis zur maximalen Signalintensität	59
Abb. 23 Vergleich der durchschnittlichen Signallänge.....	60
Abb. 24 Aktivitätsanalyse der pAMPK und AMPK	61
Abb. 25 Absolute Signalintensität.....	62
Abb. 26 Western Blot gegen pAMPK, AMPK und GAPDH	62
Abb. 27 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h <i>Res.</i> - und STO-607- Inkubation	63
Abb. 28 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH.....	63
Abb. 29 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h <i>Res.</i> - und EX-527-Inkubation	64
Abb. 30 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH.....	64
Abb. 31 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h <i>Res.</i> - und ICI 182 780 - Inkubation	65
Abb. 32 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH.....	65
Abb. 33 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h Signalwegblocker-Inkubation.....	66
Abb. 34 mRNA Expression der kardialen Marker MLC2v und MLC2a.....	67
Abb. 35 Protein Expression des kardialen Markers MHC	68
Abb. 36 Western Blot gegen MHC und GAPDH	68
Abb. 37 Geschlussfolgertes <i>Resveratrol</i> Signalwegnetzwerk.....	84
Abb. 38 Schlagfrequenz Analyse ausplattierter <i>EBs</i>	85
Abb. 39 Expressionsverhältnis der AMPK und pAMPK.....	85
Abb. 40 Western Blot gegen ER α	86

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
AID	Auto-Inhibitorische Domäne
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Binding Domäne
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Cyclisches Adenosin Monophosphat
CBM	Kohlenwasserstoffbindendes Modul
CBS	Cystathionine-beta-Synthase
cDNA	Complementary DNA
cLSM	Confocal Laser Scanning Microscope
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
E1	Estrone
E2	17 β -Estradiol
EBs	Embryoid Bodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogen Rezeptoren
EX	EX-527
FBS	Fetal Bone Serum
ICI	ICI 182 780
Ig	Immunglobuline
IZM	Innere Zell Masse
IP3	Inositol Trisphosphate Receptor
KD	Kinase Domäne
LIF	Leukemia Inhibiting Factor
LSM	Laser Scanning Mikroskop

MMP-2	Matrix Metalloprotease 2
mER	Membranständiger Estrogen Rezeptor
MHC	Myosin Heavy Chain
Mlc2a	Myosin Light Chain (atrial)
Mlc2v	Myosin Light Chain (ventrikulär)
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium-Chlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
nER	Nukleärer Estrogen Rezeptor
pAMPK	Phosphorylierte AMPK
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
Pol2a	Polymerase 2a
Res.	Resveratrol
RP	Retionblastom Protein
RT	Raum-Temperatur
Ser	Serotonin
SF	Spinnerflasche
STO	STO-607
SD	Standardabweichung
Tamox	Tamoxifen
TEMED	Teramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
UE	Untereinheit

1 Zusammenfassung

Murine embryonale Stammzellen (ESCs) können sich *in vitro* unter den richtigen Umständen spontan in *Embryoid Bodies* (EBs) differenzieren. Dieses dreidimensionale Zell-Modell enthält Zellen aller drei Keimblätter und kann dafür genutzt werden, Differenzierungsprozesse eingehend zu untersuchen. Bereits durch das Erkennen mikroskopisch sichtbarer, sich kontrahierender Areale innerhalb des EBs lassen sich Rückschlüsse auf die Kardiomyogenese ziehen.

In dieser Arbeit wurden ESCs der CGR8 Zelllinie genutzt, um unter Zuhilfenahme des Stoffes *Resveratrol* (*Res.*) sowie durch die Inhibierung verschiedener Signalwege die Rolle dieser in der Kardiomyogenese zu untersuchen und das *Res.* Signalwegnetzwerk besser zu verstehen.

Die grundlegende Methode dieser Arbeit war zunächst die Analyse der EBs hinsichtlich ihrer kardialen Differenzierung. Um diese zu beobachten, wurden die in Spinnerflaschen kultivierten EBs auf Petrischalen ausplattiert und dort mittels Lichtmikroskop auf ihr Schlagverhalten hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch die Inkubation mit *Res.* 50µM die frühe kardiale Differenzierung ab Tag 6 gefördert wird. Die gesteigerte Genexpression so wie der erhöhte Nachweis kardialer Strukturproteine mittels Western Blot an Tag 12 lässt auf eine persistente Förderung der Kardiomyogenese durch *Res.* 50µM schließen.

Estrogen Rezeptoren (ER), die AMP aktivierte Kinase (AMPK) und Sirtuine werden in der Literatur als Interaktionspartner von *Res.* beschrieben. Wie diese Signalproteine in einem Signalwegnetzwerk, welches die Kardiomyogenese initiiert, zusammenarbeiten, ist noch unbekannt. Besonderer Fokus wurde in der vorliegenden Arbeit auf membranständige Estrogen Rezeptoren (mER) als potentielle Schlüsselmoleküle im Zusammenspiel mit *Res.* gelegt. mER sind in der Lage über Adenylatcyklase und Phospholipase C-Aktivierung einen intrazellulären Ca²⁺-Einstrom, welcher weitere Signalkaskaden aktiviert, zu bewirken. Durch Immunfluoreszenz Färbung ließ sich die Expression von mERα-, mERβ- und GPER auf EB-Zellen beobachten.

Durch den Einsatz der Signalwegblocker STO-607, EX-527, ICI 182 780 und Tamoxifen wurde versucht, mittels Inhibierung der obengenannten Signalproteine den Ablauf unterschiedlicher Signalwege sowie den *Res.*-Effekt auf ESCs zu verändern. Es zeigte sich durch die Modulation von mERs durch ICI 182 780 aber nicht durch Tamoxifen die Unterbindung *Res.* spezifischer Ca²⁺-Signale. Mittels Western Blot konnte eine durch *Res.* induzierte Aktivierung der AMPK per Phosphorylierung an THR 172 nachgewiesen werden. Diese Aktivierung konnte durch die Inhibierung von mER mittels ICI 182 780 und der

Calcium-Dependent Protein Kinase (CAMKK α/β) durch STO-607 aufgehoben werden. Auch die Inhibierung von SIRT 1 durch EX-527 führte zur einer Herunterregulierung der AMPK-Aktivierung.

Am EB Modell konnte durch die Inhibierung von ER durch ICI 182 780 und der Inhibierung der CAMKK α/β die Aufhebung des fördernden Effektes von *Res.* auf die frühe Kardiomyogenese an Tag 6 bis 8 beobachtet werde. Durch die Inkubation mit ICI 182 780 und Tamoxifen kam es außerdem zu einer Abnahme der Genexpressionssteigerung kardialer Strukturproteinen durch *Res.* an Tag 12. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Res.* via mER Ca²⁺-Signale induziert, welche u.a. die AMPK aktivieren und so die frühe Kardiomyogenese fördern. Durch diese neuen Erkenntnisse war es möglich, die Wirkungsweise von *Res.* auf ESCs in Bezug auf die Kardiomyogenese darzustellen und ein besseres Verständnis des zugrundeliegenden Signalwegnetzwerkes zu generieren.

2 Einleitung

2.1 Embryonale Stammzellen und Embryoid Bodies als Modellsystem

Eine einzelne embryonale Stammzelle (ESC) ist in der Lage durch kontinuierliche Vermehrung und Differenzierung der Ursprung eines hochkomplexen Organismus bestehend aus tausenden von unterschiedlichen Zellen zu sein (Sobhani et al. 2017).

Die Fähigkeit einer Zelle sich in jede Zelle des Körpers oder der embryonalen Plazenta zu entwickeln nennt man Totipotenz. Die Pluripotenz beschreibt Zellen, die sich in jedes der drei Keimblätter, welche den Ursprung der unterschiedlichen Organsysteme bilden, entwickeln können (Sobhani et al. 2017, Ratajczak et al. 2016). Dieses Differenzierungspotential wird als *Stemness* bezeichnet und beruht auf unterschiedlichen molekulargenetischen Vorgängen. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Zusammenhang eine grundlegende Schlüsselrolle den Transkriptionsfaktoren Oct-4, Sox-2 und Nanog zufällt (Rodda et al. 2005), da diese zum einen die Promoterregionen zahlreicher Gene beeinflussen können und zum anderen Einfluss auf den TGF- β und Wnt-Signalweg haben, welche die Selbsterneuerung von Stammzellen steuern. Durch das Hinzukommen von inhibierenden Stoffen, epigenetischer Veränderungen - die Änderung von Genfunktionen ohne die Änderung des genetischen Codes - und der Aktivitätsreduktion von Transkriptionsfaktoren wie Oct-4, sinkt das genetische Differenzierungspotential. Dies hat die Ausreifung der Zelle zur Folge. (Babaie et al. 2007)

Unterschiedlichste Botenstoff, der Energiestoffwechsel, physikalische Einwirkungen und weitere Faktoren beeinflussen ESCs auf ihrem Entwicklungsweg in eine bestimmte Differenzierungsrichtung und in der Ausbildung unterschiedlicher Organsysteme (Ratajczak et al. 2016, Folmes et al. 2012). Viele dieser Faktoren wurden bereits identifiziert. Die Liste reicht von Interleukinen (Mascheck et al. 2015), über Leukotrienen (Huang et al. 2016) und purinergen Botenstoffen (Mazrouei et al. 2015) bis hin zu zellulärer Interaktion via Zell-Zellkontakten (Chen et al. 2010). Die kardiale Differenzierung scheint darüber hinaus durch Stickstoffmonoxid (NO), Sauerstoffradikale (ROS), Scherkräfte und elektromagnetische Felder induziert zu werden (Bekhite et al. 2016, Sharifpanah et al. 2016). Dennoch ist das Netzwerk, welches die einzelnen Prozesse mit einander verknüpft und so zur Ausdifferenzierung der Anfangs pluripotenten Stammzellen zu einem komplexen Organismus führt, in seiner Gesamtheit noch nicht verstanden. Aber nicht nur bei der frühen Embryonalentwicklung, sondern auch während des ganzen Lebens spielen Stammzellen eine entscheidende Rolle. So sind adulte Stammzelle die Grundlage jeglicher

Regenerationsprozesse und bieten Lebewesen die Möglichkeit sich Alterungsprozessen und unterschiedlichsten Verletzungen entgegenzusetzen (Ratajczak et al. 2016).

Immer wieder werden neue Stoffe gefunden, die in der Lage sind, Einfluss auf die Entwicklung von Stammzellen zu nehmen. Diese Forschungsergebnisse versprechen, dass man zukünftig in der Lage sein könnte, Stammzellen effektiv in eine ausgewählte Richtung und zu einem gewünschten Produkt der Organogenese zu führen. Dies könnte durch das Ermöglichen von gezieltem, kontrollierbarem *Tissue Engineering* viele neue medizinische Möglichkeiten im Bereich des Organersatzes bedeuten (Ratajczak et al. 2016).

Ferner ist es auch von Interesse, über die Identifizierung solcher Stoffe und ihrer Interaktionspartner die genauen zellulären Prozesse aus dem begrenzten Arsenal intrazellulärer Signalwege aufzuklären, die den Differenzierungsprozessen zugrunde liegen. Dieses Wissen ist Grundlage für medizinische und pharmakologische Innovationen, um Patienten mit degenerativen, genetischen und neoplastischen Erkrankungen zu helfen. (Sobhani et al. 2017)

Die methodische Grundlage dieser Arbeit bildete die Kultivierung embryonaler Mausstammzellen der Zelllinie CGR8. Das Anlegen der dafür benötigten permanenten Zelllinien geschah durch die Gewinnung von Zellen aus der inneren Zellmasse von Maus-Blastozysten (Wobus et al. 1984). Für diese Arbeit wurden pluripotente CGR8-Stammzellen verwendet, welche 84 h nach Befruchtung der Eizelle aus der inneren Zellmasse männlicher Maus-Blastozysten gewonnen wurden.

Für weiterführende Untersuchungen musste darüber hinaus eine Kultivierung ohne die ansonsten physiologische Differenzierung möglich sein, um die Zellen standardisierten Experimenten zuführen zu können. Dies gelingt entweder durch eine *Feeder Layer* Co-Kultur mit Maus-Fibroblasten oder durch die Kultivierung mit dem *Leukemia Inhibiting Factor* (LIF), einem Zytokin der Interleukin-6-Familie (Smith et al. 1988). Letzteres Verfahren wurde in dieser Arbeit eingesetzt. Die Inhibition der Differenzierung beruht auf einer Aktivierung von Stat3 via Janus Kinase nach der Bindung von LIF am LIF-Rezeptor (Martello und Smith 2014). Durch Weglassen des Faktors LIFs an Tag 0 des Differenzierungszeitstrahls beginnen die Zellen auszureifen (Smith et al. 1988).

Um den anschließenden Prozess der Ausdifferenzierung untersuchen zu können gibt es verschiedene Verfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das 1998 durch Wartenberg et al. etablierte Verfahren der Suspensionskultur in der Spinnerflasche angewendet (Wartenberg M 1998). Durch diese Spinnerflaschen, welche eine konstante Rotation auf das Kulturmedium

ausüben, können die Zellen in einen Schwebestand versetzt werden. So bilden sich *in vitro* embryo-artige, runde Zellaggregate - die *Embryoid Bodies (EBs)*. Innerhalb der *EBs* differenzieren sich Zellen spontan in Zellen aller drei Keimblätter. Beginnend mit einer endodermartigen Hülle und einer ektodermalen Randzone, gefolgt von mesodermalen Zellen im Inneren entwickeln sich die Zellen der *EBs* in Systeme, die große physiologische und histologische Ähnlichkeit mit der *in-vivo* Entwicklung des Maus Embryos haben (Guan et al. 1999). Unter anderem lassen sich Vaskularisierung, Hämatopoese und sogar neurogene Entwicklungen an diesem Modell darstellen. Darüber hinaus ist auch eine kontrollierte Einflussnahme auf diese Prozesse möglich. (Guan et al. 1999, Huang et al. 2016)

Einer der ersten Prozesse, der die frühe Differenzierung der Zellen innerhalb der *EBs* prägt, ist die Kardiomyogenese (Folmes et al. 2012). Diese ist eindrücklich durch sich kontrahierenden Gewebareale im *EB* unter leichter Vergrößerung zu erkennen. Diese schlagenden Areale lassen sich am besten an auf Petrischalen ausplattierten *EBs* identifizieren, deswegen wurde diese Methode im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendet.

Durch die Kombination aus Kultivierung mit LIF-Faktor (undifferenziertes Stadium), *EB*-Entwicklung in Spinnerflaschen (beginnende mesodermale Differenzierung), anschließende Ausplattierung und adhärentem Wachstum der *EB's* (kardiale Differenzierung) konnte ein Modell geschaffen werden, mit dem die Kardiomyogenese und der Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Kardiomyogenese reproduzierbar untersucht werden konnte.

2.3 Kardiale Differenzierung aus Embryonalen Stammzellen und kardiale Marker

Mit der Differenzierung von ESCs in die drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) beginnt die Organogenese, welche den Startpunkt eines Lebewesens mit heterogenen Organsystemen darstellt. Eine der ersten Organanlagen, die sich in der embryonalen Entwicklung bildet, ist die Anlage des Herzens. Diesen Prozess nennt man Kardiomyogenese. Beim Menschen beginnt die Kardiomyogenese in der dritten Woche nach Befruchtung der Eizelle im kranialen Abschnitt des Embryos aus viszeralem Mesoderm in der kardiogenen Zone. Dabei bildet sich zunächst ein aus Endokard, Myokard und Epikard bestehender kontraktionsfähiger Herzschauch, welcher sich durch Faltungs- und Rotationsprozesse zu einer Herzscheife entwickelt. Diese enthält bereits primitive atriale und ventrikuläre Anlagen. Durch den fortschreitenden Anschluss an das venöse und arterielle System, verbunden mit dem Wachstum der Herzsepten und -klappen, entsteht so bis zur fünften Woche ein an der Blutzirkulation effektiv teilnehmendes Organ. (Sadler 2003)

Das weitere Wachstum des Herzens ist insbesondere das Resultat von Hypertrophie, die Vergrößerung der Zellen, und nicht von Hyperplasie, der Vermehrung und Entstehung neuer Herzzellen (Lüllmann-Rauch 2009). Auf zellulärer Ebene ist dies ein Prozess, bei dem sich pluripotente Stammzellen in mesodermale Keimbahnzellen, weiter in kardiales Mesoderm und über unreife Kardiomyozyten in reife Kardiomyozyten differenzieren (Genead et al. 2010). Die Kardiomyozyten sind über *Gap Junctions* zu einer funktionellen Einheit verbunden und unterteilen sich in Arbeitsmyokard, Reizleitungssystem und Zellen mit endokrinologischer Funktion (Lüllmann-Rauch 2009).

Zur Darstellung der kardialen Differenzierung in dieser Arbeit wurden *EBs* aus CRG8-Zellen als Modell verwendet. In diesem Modell erfolgt die Differenzierung von ESCs bis hin zu ausgereiften Kardiomyozyten im Laufe der ersten zwölf Tage des Differenzierungszeitstrahls. Zur Charakterisierung von Kardiomyozyten und deren Reifezustand kann die Analyse von unterschiedlichen kardialen Marker verwendet werden. Bei weitestgehend ausgereiften Zellen gehören dazu vor allem die Struktur- und Funktionsproteine des kardialen Kontraktionsapparates wie Aktin, Myosin und Troponin (Lüllmann-Rauch 2009). Die früheren Phasen kardialer Differenzierung sind insbesondere durch die Expression mesodermaler (Brachyury) und kardial spezifischer (ISL-1, Nkx-2.5, Flk-1) Proteine und Transkriptionsfaktoren gekennzeichnet (David et al. 2011) (Abb. 1).

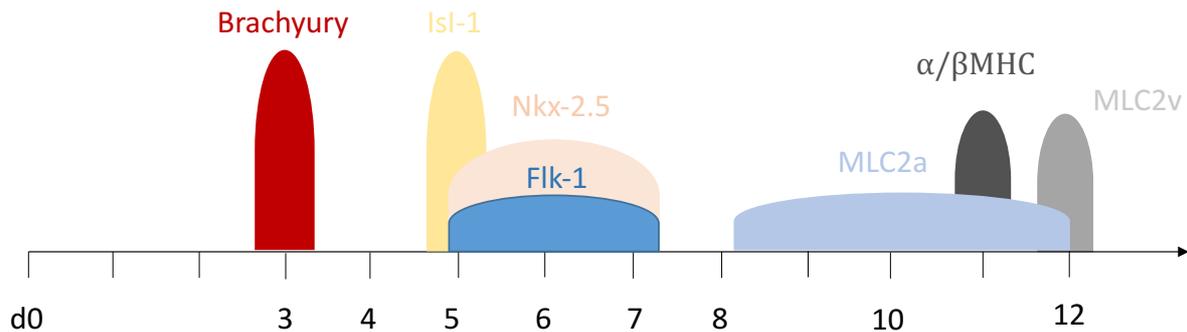


Abb. 1 Marker der Kardiomyogenese in *Embryoid Bodies*

Dargestellt ist das Auftreten kardialer Marker in Relation zum Differenzierungszeitstrahl. Tag 0 stellt den Tag dar, an dem das erste Mal der LIF-Faktor weggelassen wird und die Stammzellen ihr Differenzierungspotential entfalten können. (MHC: *Myosin Heavy Chain*, Mlc2a: *Myosin Light Chain atrial*, Mlc2v: *Myosin Light Chain ventrikulär*)

2.4 Das pflanzliche Polyphenol *Resveratrol*

Bei der Optimierung von Differenzierungsprotokollen sucht man nach Faktoren, welche gezielt Signalwege anstoßen, die gewünschte Differenzierungen fördern, in unserem Fall die Kardiomyogenese vorantreiben. Es geht dabei nicht nur um *Tissue Engineering*, sondern auch um ein grundlegendes Verständnis der Differenzierungsprozesse. Ein Stoff, der in den letzten Jahren immer mehr an Aufmerksamkeit gewonnen hat und durch seine Eigenschaften auch von großem Interesse für die Stammzellforschung geworden ist, ist das pflanzliche Polyphenol *Resveratrol* (*Res.*).

Dieser Stoff wurde 1939 in den Wurzeln des Weißen Germers (*Veratrum grandiflorum*) entdeckt. Mittlerweile wurde *Res.* in 72 unterschiedlichen Pflanze gefunden. Am meisten untersucht ist das Vorkommen in Weintrauben und Wein. In diesem Zusammenhang wurde *Res.* zunächst bekannt wegen seiner positive Wirkung auf Endothelien durch die Freisetzung von endogenem NO (Gehm et al. 1997, Kondratyuk et al. 2011, Castaldo et al. 2019).

Betrachtet man die Struktur von *Res.* kann man zwischen cis- und trans- Isomeren unterscheiden. Vor allem der trans-Isoform werden unterschiedliche Wirkungen zugeschrieben. (Cheng et al. 2019) Des Weiteren ähnelt *Res.* wegen seiner zwei Phenolringen und drei Hydroxylgruppen Estrogenen, deswegen wird es als Phytoestrogen bezeichnet, welches in der Lage ist, agonistisch an Estrogenrezeptoren (ER) zu binden und Estrogen-Effekte auf Zellen zu vermitteln (Abb. 2) (Gehm et al. 1997). Diese strukturelle und funktionelle Verwandtschaft führt auch zu ähnliche Effekten auf unterschiedliche Zellen und Organismen. Im Maus Modell konnten z.B. gleichartige, protektive Effekte von *Res.* und Estrogenen dargestellt werden. Es konnten gezeigt werden, dass beide Stoffe gleichermaßen

vor Streptozotocin induziertem Diabetes schützten. (Li et al. 2018) Abhängig von der Unterart des ER und der *Res.* Konzentration kann *Res.* aber auch partial agonistisch und antagonistisch an ER wirken, so dass die genaue Wirkung von *Res.* an ER umstritten ist (Chen und Chien 2019).

In der Literatur finden sich darüber hinaus eine Vielzahl von Berichte über weitere Interaktion zwischen *Res.* und unterschiedlichen Signalwegkomponenten, die tiefgreifend in zelluläre Prozesse eingreifen können. Zu diesen gehören unter anderem: Die Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase (AMPK), Sirtuine, Pi3K/Akt, *Peroxisome Proliferator-activated Receptor* (PPAR δ), *Nuclear Factor of activated B-cells* (NF κ B) und der *Nuclear Factor-erythroid-derived 2-related Factor-2* (Nrf2). Durch eine Unterdrückung von NF κ B Signalen wirkt *Res.* antiinflammatorisch (Safaeinejad et al. 2017). Eine Aktivierung von PPAR δ durch *Res.* hat unter anderem eine Einflussnahme auf den Fett- und Insulin- Stoffwechsel zu Folge (Benitez et al. 2007). Via Nrf2 werden durch *Res.* vor allem antioxidative Effekte vermittelt (McCubrey et al. 2017).

Im Einklang damit haben mehrere Studien herausgefunden, dass *Res.* auch über die zelluläre Ebene hinaus diverse, protektive Wirkungen zugeschrieben werden können. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass *Res.* eine lebensverlängernde Wirkung auf Mikroorganismen, Fruchtfliegen und adipöse Mäuse hat (Park et al. 2012). Außerdem konnten kardioprotektive Effekte von *Res.* nachgewiesen werden (Lieben Louis et al. 2019). An Mauszellen konnte zum einen eine selektive Zytotoxizität gegenüber kardialer Fibroblasten unter Aussparung von Kardiomyozyten gezeigt werden, zum anderen werden *Res.* auch im Zusammenhang mit anderen Arten von kardiotoxischen Einflüssen schützende Effekte zu geschrieben. So konnte in Arbeiten am Mausmodell mittels *Res.* beladener Nanopartikel der kardiotoxische Effekt des Chemotherapeutikums Doxorubicin nachweislich reduziert werden (Zhang et al. 2019). Anhand des *EB*-Modells konnte in vorangehenden Arbeiten auch ein verstärkender und langfristig stabilisierender Effekt von *Res.* auf die Kardiomyogenese aus ESCs dargestellt werden (Mühlbrandt 2018). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Res.* selektiv zytotoxisch auf undifferenzierte Pankreas- und Mundbodontumore wirkt (Chang et al. 2015), positive Auswirkung auf den Fett- und Energiestoffwechsel hat (Korsholm et al. 2017), sich positiv auf die Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks auswirkt (Sims und Baur 2017) und positiv in neurodegenerative Prozesse eingreift (Al Dera 2017). All diese Effekte haben *Res.* auch zu einem sehr interessanten Produkt für die Industrie gemacht. Es wird vor allem im asiatischen Raum als Mittel gegen Übergewicht und Alterserscheinungen verkauft und ist auch im westlichen Raum von wachsendem Interesse (Park et al. 2012).

Neben den oben genannten protektiven Eigenschaften kann *Res.* aber auch potentiell toxische Prozesse anstoßen. So wurde gezeigt, dass abhängig vom pH-Wert oder der Tageszeit *Res.* zu verstärktem oxidativen Stress mit gesteigerter Lipoperoxidation und 4'-phenoxy Radikal Bildung führt (Salehi et al. 2018). Auch scheint die Wirkung von *Res.* konzentrationsabhängig zu sein. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass *Res.* in niedrigen Konzentrationen (unter 1µM) einer Aktivierung von Nrf2 bewirkt, in Konzentrationen von 20-30 µM aber die Aktivierung von SIRT1 überwiegt (McCubrey et al. 2017). Weiter Studien zeigten, dass ab Konzentrationen von 50 µM eine Phosphodiesterase hemmende Wirkung von *Res.* in den Vordergrund tritt. (Park et al. 2012)

Zusammengefasst ergibt sich unter Berücksichtigung aller bisher beschriebenen Effekte von *Res.* ein Geflecht aus unterschiedlichen direkten und indirekten Interaktionen, welches noch weitere Untersuchungen erfordert für ein umfassendes Verständnis. (McCubrey et al. 2017, Salehi et al. 2018) Die Komplexität dieses Netzwerkes erschwert auch die Einschätzung des Potentials von *Res.* als möglichen Arzneistoff für die medizinische Praxis (Cheng et al. 2019). Weitere Erkenntnisse über das *Res.* Signalwegnetzwerk tragen aber nicht nur zu einem besseren Verständnis der Wirkungsweise von *Res.* bei, sondern können auch dabei helfen, zelluläre Prozesse wie z.B. die Stammzellendifferenzierung weiter zu entschlüsseln.

Für die Forschung an ESCs mit Fokus auf die Kardiomyogenese und die allgemeine Kardiovaskuläre Funktion sind einzelne Signalwege von besonderem Interesse.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit besonderer Fokus auf durch *Res.* aktivierte Signalachsen mit postuliertem positiven Effekt auf Kardiomyozyten, die Kardiomyogenese und Alterungsprozesse gelegt.

Zu diesen gehören: unterschiedliche Estrogenrezeptor Klassen, die Klasse III Histone Deacetylase SIRT 1 und die AMPK (McCubrey et al. 2017, Louis et al. 2019). Die Funktion und Verbindung zum Kardio- Vaskulären System dieser Signalproteine wird in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

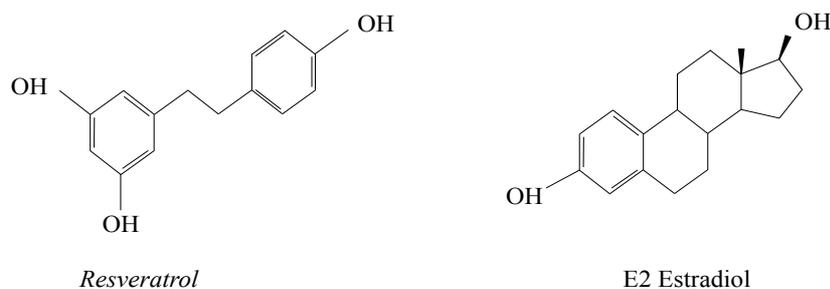


Abb. 2 Resveratrol und Estradiol (E2) Strukturformel

Dargestellt sind die sich ähnelnden Strukturformeln von *Res.* und dem potentesten Estrogen, Estradiol (E2).

2.5 Estrogenrezeptoren

Estrogene und die durch ihre Rezeptoren vermittelten Signale, bilden die Grundlage für viele verschiedene Wachstums-, Ausreifungs- und Alterungsprozesse im menschlichen Körper. Diese Prozesse sind nicht nur wichtig in den geschlechtsspezifischen Sexualorganen der Frau, sondern sind darüber hinaus auch in vielen anderen Organsystemen gegenwärtig. Insbesondere die Effekte von Estrogenen auf das Herz-Kreislaufsystem sind seit langem bekannt und von hohem wissenschaftlichen Interesse (Luo und Kim 2016).

Das Geschlecht ist ein anerkannter Risikofaktor bezüglich Inzidenz und *Outcome* von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass gegenüber gleichaltrigen Männern prämenopausalen Frauen ein erniedrigtes Risiko haben an schwereren Herz- und Gefäßkrankheiten zu erkranken. Zudem ist eine Hormonersatztherapie bei postmenopausalen Frauen nachweislich mit einem Überlebensvorteil in Bezug auf kardiale Erkrankungsbilder assoziiert. (Luo und Kim 2016)

Neben diesen klinischen Erkenntnissen konnten auch auf zellulärer Ebene protektive, durch Estrogenen vermittelte Effekte gezeigt werden. So schützen Estrogene unterschiedlichste Zellreihen vor hypoxischem Stress und vor hypertrophen Stimuli. Die zugrundeliegenden Signalwege sind zum Teil entschlüsselt und zum Teil Gegenstand aktueller Forschung. (Luo und Kim 2016)

Die körpereigenen Estrogenquellen sind neben den Ovarien die Knochen, die Brust, das Fettgewebe und das Gehirn. Darüber hinaus konnte auch im kardialen Gewebe das entscheidende Enzym für die Estrogensynthese, die Cytochrome p450-Aromatase, nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine kardiale Estrogensynthese hin (Luo und Kim 2016). Insgesamt ist der Körper in der Lage, drei verschiedene Estrogene zu synthetisieren: Estrone (E1), 17 β -Estradiol (E2) und Estriol. Von diesen ist E2 das potenteste (Levin 2009).

Die Vermittlung der Estrogensignale wird mittels Estrogenrezeptoren (ER) realisiert. ER gehören zu der Familie der nukleären Hormonrezeptoren, die mit Steroidhormonen interagieren, sobald diese in das Zytoplasma diffundiert sind. Die Rezeptoren treten daraufhin in direkten Kontakt mit der DNA und regulieren so wie andere Steroidrezeptoren in Interaktion mit Ko-Regulatoren direkt Transkriptionsprozesse. Nach heutigem Wissensstand gibt es zwei solcher nukleären Estrogenrezeptoren (nER): nER α und nER β . Diese beiden Rezeptoren ähneln sich sehr in ihrer dimeren Struktur und Funktionsweise. Vor allem in den Domänen für DNA- und Ligandenbindung sind sie homolog. (Lutz Hein 2014)

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass strukturell ähnliche ER auch in der Plasmamembran zu finden sind und dort einen Anstoßpunkt von schnellen, intrazellulären Signalwegen bilden (Revankar et al. 2005, Revankar et al. 2019). Dass diese Rezeptoren denselben genetischen Ursprung wie nER α und nER β haben, konnte in ER α /ER β knockout Mäusen gezeigt werden. Zellen dieser Mäuse sind nach der Zugabe von E2 weder in der Lage mit der Aktivierung schneller Signalwegkaskaden, noch mit der Transkription spezifischer, mit nER assoziierten Genen zu antworten. (Levin 2009) Den unterschiedlichen zellulären Positionen liegt eine Translokation der Rezeptoren in die Plasmamembran durch einen Cavelion-1 vermittelten Prozess zugrunde. Diesem geht die Palmitoylierung an Cystein 447 in der Estrogen-bindenden Domäne und eine Methylierung an Arginin 260 in der DNA-bindenden Domäne voraus. (Levin 2009) Durch diese Prozesse werden zellabhängig circa 5-10% der ER in die Plasmamembran verlagert und sind dort vor allem in cholesterinreichen Caveolen, welche eine spezifische signalproteinreiche Unterstruktur der Plasmamembran bilden, zu finden (Levin 2009, Levin 2002, Revankar et al. 2019).

Es konnte gezeigt werden, dass membranständige ER α /ER β (mER) mit G α - und G γ -Proteinen in Verbindung stehen. Durch diese ist der Anstoß von intrazellulären Signalen möglich. (Revankar et al. 2005) Eine Aktivierung dieser Proteine führt unter anderem zu einer Generierung von *Second Messenger* wie einer Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und der Generierung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) mittels Adenylatcyclase- (AC) und Phospholipase C-Aktivierung (PLC). Dadurch kommt es zur Aktivierung von Proteinkinasen wie z.B. MAPK und IP3K. Diese modulieren unterschiedliche Zellfunktionen und können so ins Überleben, der Migration und der Proliferation von Zellen eingreifen. (Levin 2009)

Neben nukleären und membranständigen ER α /ER β gibt es darüber hinaus einen weiteren membranständigen G-Protein-assoziierten ER, der keine strukturelle Ähnlichkeit mit ER α /ER β aufweist. Dieser Rezeptor ist unter dem Namen GPER-1 oder GPR30 bekannt (Holm et al. 2013). Dieser aus sieben Transmembran-Domänen bestehende Rezeptor kommt vor allem auf der Plasmazellmembran und der Membran des Endoplasmatischen Retikulums vor. GPER-1-Agonisten aktivieren den Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum, was zur Aktivierung von G-Proteinen so wie SRC, AC und PLC führt. SRC kann über die Aktivierung der Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) und der Freisetzung des Epidermalen Growth Factors (EGF) weitere Signalwege wie z.B. PI₃K/AKT aktivieren.

Durch Aktivierung von AC und dem daraus resultierenden cAMP- und IP₃-Anstieg werden zudem Zellsignale wie die Mobilisierung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern

ausgelöst (Koganti 2015). GPER-1 gilt somit als wichtiger Modulator von Estrogen Effekten (Revankar et al. 2019). Neben seinem Einfluss auf Brust- und Endometriumzellen konnte gezeigt werden, dass GPER-1 auch Anteil an den kardialen und vaskulären Effekte von Estrogenen hat (Koganti 2015, Holm et al. 2013, Meyer et al. 2011).

Neben ihren strukturellen Unterschieden und Funktionsweisen unterscheiden sich ER α /ER β und GPER-1 auch in der Form ihrer Liganden. Zwar werden beide Rezeptortypen von den körpereigenen Estrogenen aktiviert, aber synthetische Antagonisten und Modulatoren haben an den Rezeptoren unterschiedliche Effekte (Revankar et al. 2019). So ist der im Rahmen dieser Arbeit verwendete, selektive *Estrogenrezeptor-Downregulator* ICI 182 780 (ICI) ein kompletter ER α /ER β Antagonist. ICI wirkt aber agonistisch an GPER-1. Dieser Agonismus wird auch bei dem ebenfalls verwendeten selektiven *Estrogenrezeptor-Modulator* Tamoxifen beobachtet (Lutz Hein 2014, Long et al. 2017, Meyer et al. 2011) (Abb.3).

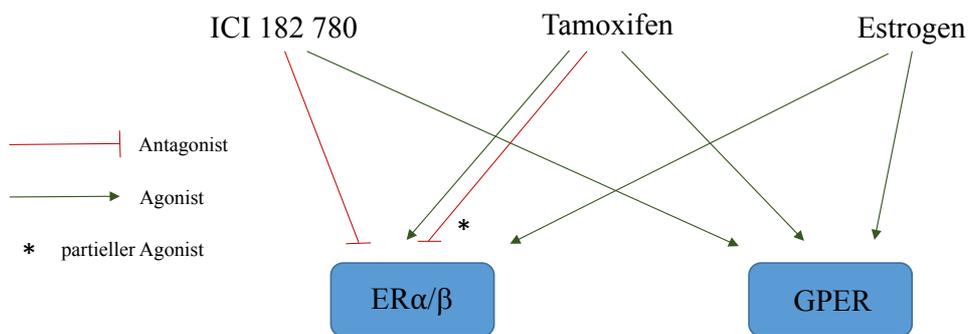


Abb. 3 Estrogenrezeptor mit Agonisten und Antagonisten

Nach jetzigem Erkenntnisstand scheinen Estrogene über unterschiedliche Rezeptoren und Signalwege Einfluss auf eine Vielzahl von Zellen zu nehmen. Bisherige Untersuchungen lassen hier eine komplexe Zusammenarbeit von mER und nER vermuten, die sich gegenseitig beeinflussen und verstärken (Levin 2009, Majumdar et al. 2019).

Die kardioprotektiven Effekte von Estrogenen scheinen vor allem Resultat eines positiven Einflusses auf das Koronarendothel und auf die Kardiomyozyten zu sein (Louis et al. 2019). Zu den herzzellspezifischen Effekten von Estrogenen gehört zum einem die Regulierung des kardialen Stoffwechsels, eine Verbesserung der aeroben mitochondrialen Zellatmung und die Reduktion der Apoptose von ausdifferenzierten Herzzellen (Luo und Kim 2016).

Neben solch einem Einfluss auf den Stoffwechsel ausgereifter Kardiomyozyten spielen Estrogene auch eine Rolle in der Stimulation der Kardiomyozytenregeneration. So konnte gezeigt werden, dass nach einem Herzinfarkt eingewanderte C-kit⁺ Stammzellen aus dem

Knochenmark durch E2/mER α -Interaktion in ihrer Funktion verstärkt werden und so den Funktionserhalt des restlichen Herzgewebes durch parakrine Effekte fördern (Su et al. 2015). Darüber hinaus hat eine E2/ER-Interaktion auch Einfluss auf ventrikuläre Hypertrophie und wirkt protektiv sowohl bei physiologischen Prozessen, als auch bei maladaptem Wachstum. Die Aktivierung von nER α /mER α scheint in diesem Zusammenhang vor allem normalen Wachstumsprozesse zu unterstützen, während die Aktivierung von nER β /mER β mit einem protektiven Einfluss auf maladaptem kardialer Hypertrophie und Angiotensin II induzierter kardialer Fibrose in Verbindung gebracht wird (Luo und Kim 2016, Levin 2002). Man geht bei diesen Prozesse mittlerweile davon aus, dass Estrogene ihre Effekte nicht nur durch die Interaktion mit nukleären Rezeptoren, sondern viel mehr durch die Integration mehrere Signalwege, die ihren Ursprung im Zellkern, auf der Plasmamembran und dem Endoplasmatischen Retikulum haben, auslösen (Zivadinovic und Watson 2005, Levin 2009, Majumdar et al. 2019).

Die vielfältigen Einflüsse von Estrogenen auf Kardiomyozyten lassen auch eine Wirkung auf die embryonale Kardiomyogenese vermuten. Ob es solch einen Effekt gibt, welche Signalwege möglicherweise in diesem Kontext von Bedeutung sind und ob durch E2/ER-Interaktion die Kardiomyogenese aus ESCs gefördert wird, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass nER und mER in ESCs und EBs gesteigert exprimiert werden und diese einen Einfluss auf die Genexpression haben. Dies weist darauf hin, dass Steroidhormone bereits in die frühe Embryonalentwicklung und wohlmöglich auch in die Kardiomyogenese eingreifen können. (Hong et al. 2004)

Zusammenfassend lässt sich aus den Erkenntnissen früherer Arbeiten schlussfolgern, dass durch ER Signale vermittelt werden, die Einfluss auf Kardiomyozyten haben und ggf. auch Einfluss auf die Differenzierung von ESCs nehmen können. Da *Res.* bekanntermaßen in Wechselwirkung mit ER tritt, bildete die Betrachtung dieser Interaktion einen großen Bestandteil dieser Arbeit (Gehm et al. 1997, Levin 2002, Hong et al. 2004, Louis et al. 2019).

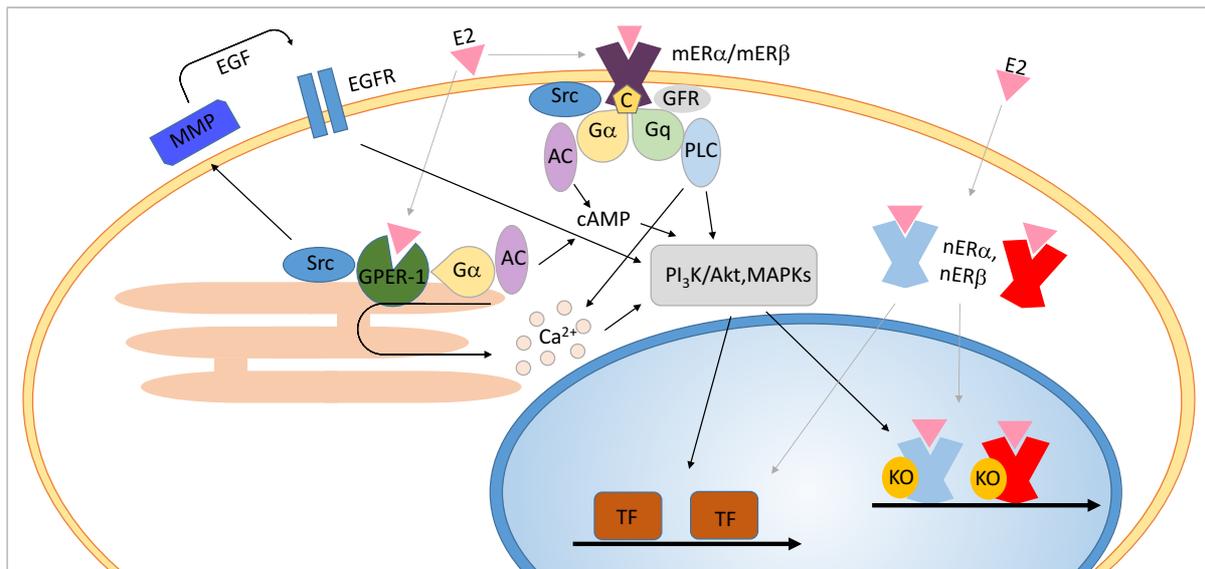


Abb. 4 Wirkungsweise von Estrogenrezeptor α/β und GPER-1

Schematisch dargestellt sind die unterschiedliche Wirkungsweisen von nukleären und membranständigen Estrogenrezeptoren in Abhängigkeit ihrer Lokalisation in der Zelle. (E2: Estradiol, mER: membranständiger Estrogenrezeptor, nukleärer Estrogenrezeptor, TF: Transkriptionsfaktor, KO: Cofaktor)

2.6 Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase

Auf einen Organismus und seine einzelnen Zellen wirken anhaltend eine Vielzahl unterschiedlicher Stressoren ein. Die Summe dieser Stressoren in Verbindung mit der zellulären Antwort bedingen die Anpassung und fortschreitende Alterung der Zellen. Bereits mit der Ausdifferenzierung von ESCs beginnt die Zellalterung, so dass diese Prozesse eng mit einander verbunden sind. Durch adäquate Anpassung, Reparaturvorgänge und das Wiedererreichen einer zellulären Homöostase sind einzelnen Zellen und dadurch letztendlich auch der Organismus in der Lage, sich unterschiedlichsten zellschädigenden Einflüssen zu widersetzen und den Alterungsprozess zu verlangsamen. Um dies zu koordinieren, verfügen Zellen über unterschiedliche Signalwege und Reparaturenzyme, die z.B. interzelluläre Kommunikation, gezielte Translations- sowie epigenetische Prozesse und Autophagie initiieren können. (Khorraminejad-Shirazi et al. 2019).

Ein entscheidender Spieler in der Erkennung eines zellulären Ungleichgewichtes und der Wiederherstellung der Homöostase ist die Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase (AMPK). Die AMPK ist eine Seronin/Threonin (Ser/Thr) Kinase und vor allem bekannt als sensibler Sensor des Adenosinmonophosphat-/Adenosintriphosphat-Levels (AMP/ATP)

(Wang et al. 2012). Sie ist in der Lage, die metabolische Situation einer Zelle zu erkennen und bei einem AMP-Überangebot den Stoffwechsel von anabol auf katabol umzustellen. Dies gelingt dadurch, dass die AMPK ein Protein mit einer sensorischen und gleichzeitig einer katalysierenden Funktion ist. Neben dieser entscheidenden Position im Energiestoffwechsel konnten in den letzten Jahren weitere Substrate der AMPK entdeckt werden, über die die AMPK auf weitere, für die Homöostase entscheidende Prozesse Einfluss nehmen kann (Herzig und Shaw 2017, Fu et al. 2013, Feng et al. 2018). Durch die AMPK und den von ihr abhängigen Signalwegen wird z.B. Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoff Species (ROS), Autophagie, Zellproliferation und Apoptose genommen (Khorraminejad-Shirazi et al. 2017). Auch bei der Regelung von Prozessen außerhalb des Zytoplasmas, in einzelnen Zellorganellen kommt der primär zytoplasmatisch gelegenen AMPK eine entscheidende Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass die AMPK durch Aktivierung unterschiedlichster Signalwege die Mitochondrien-Funktion in zellulären Stresssituationen aufrechterhält und zu einem Großteil für eine regulierte Zellatmung verantwortlich ist (Herzig und Shaw 2017).

Neben den beschriebenen Funktionen in adulten Zellen, konnte auch gezeigt werden, dass die AMPK in Verbindung mit der metabolischen Ausgangslage Differenzierungs- und Proliferationsprozesse in adulten und ESCs beeinflussen kann (Khorraminejad-Shirazi et al. 2017). So wurde gezeigt, dass AMPK-Aktivatoren einen positiven Effekt auf das Überleben und die Stressantwort von neuronalen Stammzellen haben (Chiang et al. 2017), einen entscheidenden Beitrag bei der Ausdifferenzierung von mesenchymalen Fett-Stammzellen leisten (Imran et al. 2018) und sich positiv auf die Regeneration kardialen Gewebes durch mesenchymale Stammzellen auswirken (Liu et al. 2017). In Bezug auf ESCs wird auch der Einfluss der AMPK auf die Kardiomyogenese diskutiert. Im Zusammenspiel mit der Adenylatkinase (AK), einem weiteren metabolischen Signalprotein, tragen diese beiden Kinasen möglicherweise zu einer gesteigerten Ausreifung von Stammzellen zu kardialen Zellen bei. Während der Differenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten konnte eine gesteigerte Expression der AMPK und der AK, die Verlagerung der aktivierten pAMPK in den Zellkern, eine Steigerung des AMP/ATP-Verhältnisses und eine Anlagerung der AK an herzspezifische Proteine gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass der Energiestoffwechsel und die damit in feiner Abstimmung stehenden Kinasen eine Rolle in der kardialen Ausdifferenzierung spielen. (Dzeja et al. 2011, Andre et al. 2019) Ergänzend dazu haben andere Experimente gezeigt, dass ein Überangebot an Glucose und Energieträgern wie ATP und NADH die Differenzierung von Stammzellen in Kardiomyozyten vermindert. Selbiges

Überangebot führt auch zu einer Inaktivierung der AMPK. (Yang et al. 2016b) In ihrer Gesamtheit deuten diese früheren Arbeiten darauf hin, dass neben den etablierten Treibern von Stammzellendifferenzierung und -proliferation, wie Wachstumsfaktoren und Zytokinen, auch metabolische Signalwege eine Rolle bei diesen Prozessen spielen. In welcher Weise *Res.* als bekannter AMPK-Aktivator Einfluss auf die Ausreifung von ESCs nimmt und dadurch möglicherweise auch in die Kardiomyogenese eingreift, ist noch weitestgehend unbekannt und setzt zunächst einmal ein Verständnis der allgemeinen Aktivierung und der molekularen Struktur der AMPK voraus.

Die AMPK ist ein heterotrimerer Komplex aus einer Alpha-, Beta- und Gamma-Untereinheit (UE). Die genetischen Informationen für diese Untereinheiten liegen auf zwei (α/β) respektive drei (γ) Genloci, so dass zwölf verschiedene, funktionsfähige Versionen der AMPK gebildet werden können. Einige Versionen werden in vivo aber bevorzugt gebildet. Die α -UE der AMPK beherbergt das katalytische Zentrum mit der Kinase-Domäne. Diese befindet sich in der Nähe der kritischen Phosphorylierungsstelle Thr172 welche die bisher einzig bekannte, für die Aktivierung entscheidende Phosphorylierungsstelle der AMPK darstellt. Auf die Kinase-Domäne folgt die auto-inhibitorische Domäne der α -Untereinheit, welche die katalytische Domäne blockiert solange kein AMP an der γ -UE gebunden ist. Die Verbindung zwischen α - und γ -UE wird durch die Bindungsdomäne (α Linker) am C-terminalen Ende der α -UE realisiert. Die γ -UE besteht an ihrem C-terminalen Ende aus vier *Tandem Repeats*, sogenannten Cystathionin-beta-Synthasen (CBS1-CBS4). Diese vier bilden zwei sogenannte *Bateman Domänen* (CBS1/2 und CBS3/4), welche insgesamt vier mögliche Bindungsstellen für den Liganden AMP darstellen. Die Interaktion mit AMP führt zu einer Veränderung der Proteinstruktur und die Freigabe der KD durch die AID. Des Weiteren sind die CBS Domänen auch in der Lage, mit ATP in einer die AMPK hemmenden Art und Weise zu interagieren. Dadurch ist die AMPK in der Lage, das ATP-AMP-Verhältnis zu messen und den Energiestoffwechsel zu überwachen. Die β -UE der AMPK besteht aus zwei konservierten Regionen, die wichtig für die Funktion des fertigen Enzyms zu sein scheinen. Die eine interagiert mit der BD der α -UE, die andere stellt ein kohlenwasserstoffbindendes Modul dar (CBM). Mit dieser Domäne sind einige Versionen der AMPK in der Lage Glykogenpartikel zu binden. Vor allem die Muskel-AMPK mit ihrer β -2-UE scheint hierzu in der Lage. Die genaue Bedeutung dieser Interaktion zwischen der AMPK und Glykogen ist noch nicht verstanden. Die Beteiligung beider am zellulären Energiestoffwechsel, gibt aber Anlass zu der

Vermutung, dass die AMPK auch in den Glykogenstoffwechsel eingreift. (Grahame Hardie 2016) (Abb. 5)

Aus der Struktur der AMPK geht hervor, dass für die Aktivierung dieser Kinase mehrere Bedingungen gegeben sein müssen. So ist grundsätzlich ein AMP/ATP Verhältnis zu Gunsten von AMP zur Aufhebung der Auto-Inhibition notwendig. Zusätzlich ist aber auch die Phosphorylierung an Thr172 erforderlich für die Umwandlung der AMP in die pAMPK (phosphorylierte/aktivierte Form). Es wird postuliert, dass in vitro diese Phosphorylierung durch zwei unterschiedliche, *upstream* der AMPK befindliche Kinasen realisiert wird. Zu diesen Kinasen gehört zum einen die *Liver Kinase 1B* (LKB1), zum anderen die *Calcium-Dependent Protein Kinase* (CAMKK α/β). Letztere wird durch die Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration aktiviert. (Herzig und Shaw 2017) Die LKB1 scheint unter physiologischen Bedingungen eine konsekutiv aktive Kinase zu sein, um so zu gewährleisten, dass allein eine Veränderung des ATP/AMP-Verhältnis zu einer Funktionsänderung der AMPK führt. Die Funktion von LKB1 kann aber durch posttranslationale Veränderungen und pharmakologische Stoffe verändert werden, so ist z.B. die Histon-Deacetylase SIRT1 in der Lage, durch Deacetylierung die Aktivität von LKB1 zu steigern. (Canto und Auwerx 2010).

Die aktivierte AMPK ist durch Phosphorylierung verschiedener Proteine in der Lage, die zelluläre Funktion entweder rasch z.B. durch Aktivierung von Stoffwechsellzymen und Ionen-/ Glukose-Kanäle zu beeinflussen oder durch die gesteigerte Transkription von bestimmten Zielgenen langfristige Veränderungen zu bewirken (Canto und Auwerx 2010, Feng et al. 2018). Die AMPK ermöglicht dies nicht nur durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktor im Zytoplasma, sondern auch durch direkte Phosphorylierung von mit der DNA interagierenden Proteinen nach Verlagerung in den Zellkern. Die so ausgelösten epigenetischen Effekte sind bisher aber noch nicht verstanden. Diese bieten aber interessante neue Erklärungsansätze, wie die AMPK direkt in Differenzierungsprozesse eingreifen kann. (Canto und Auwerx 2010, Dzeja et al. 2011)

Darüber hinaus konnten weitere Interaktionspartner der AMPK gefunden werden. Ein medizinisch vielversprechendes Feld scheint die Regulation von p53 und des Retinoblastom-Protein (RB) durch die AMPK zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die AMPK in der Lage ist, diese Zellzyklusmodulatoren zu beeinflussen. Durch die Stabilisierung von p53 durch Phosphorylierung an SER15 bzw. Inaktivierung der RB-Funktion über direkte Phosphorylierung an SER804, werden Zellen zum Verweilen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus gebracht. Daraus lässt sich schließen, dass die AMPK bei einem

Energieminderangebot eine Verlangsamung der Zellteilung induzieren kann, um Ressourcen zu sparen und um eine fortschreitende Alterung zu bremsen. Darüber hinaus bietet diese Signalachse aber auch Möglichkeiten, AMPK-Aktivatoren in der Bekämpfung von Tumoren einzusetzen. (Russo et al. 2013) Ein anderer Signalweg der durch die AMPK beeinflusst wird, ist die Modulation von Akt/mTOR. Dieser vermittelt zum einen Proliferationssignale, aber kann auch die Autophagie von u.a. Kardiomyozyten anstoßen (Guan et al. 2019). Der Prozess der Autophagie ist ein wichtiger Bestandteil der körpereigenen Strategie, Alterungsprozessen entgegenzuwirken. Dies gelingt indem gezielt Zellkomponenten abgebaut und wieder verwertet werden. So wurde z.B. gezeigt dass die Induktion von Autophagie eine Stammzell-Therapie nach stattgefundenen Herzinfarkten zu unterstützen (Liu et al. 2017). Des Weiteren wurde gezeigt, dass durch AMPK induzierte Autophagie ein positiver Effekt auf kardiale Hypertrophien und pathologische Umbauprozesse ausgeübt werden kann (Feng et al. 2018). In Bezug auf die embryonale Kardiomyogenese konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Aktivierung der AMPK zu einer Generierung von NO führt. NO ist ein Schlüsselregulator der Kardiomyogenese, so dass die AMPK auch eine wichtige Rolle im Signalwegnetzwerk einnimmt, welches die kardiale Differenzierung von ESCs initiiert (Padmasekar M 2011).

Wie bereits erwähnt, gibt es viele Signale, die zur Aktivierung der AMPK führen. Diese sind meist mit zellulärer Dysbalancen bzw. einer Verschiebung der metabolischen Homöostase vergesellschaftet. Darüber hinaus gibt es aber auch pharmakologische Substanzen und pflanzliche Produkte, die die AMPK aktivieren. Ähnlich zu der Vielzahl an Mechanismen, die die AMPK unter physiologischen Bedingungen aktivieren, gibt es auch bei diesen AMPK-Aktivatoren unterschiedliche Wege, die zu einer gesteigerten Kinaseaktivität der AMPK führen (Grahame Hardie 2016). Zum einen ist AICAR als klassischer AMPK-Aktivator bekannt, da es an den AMP-Bindungsstellen binden kann und so die Auto-Inhibition der α -UE aufheben kann. Zum anderen interagieren andere AMPK-Aktivatoren wie Metformin oder Berberin mit der mitochondrialen Atmungskette. Der dadurch veränderte *ATP Output* aktiviert wiederum die AMPK (Grahame Hardie 2016). Ein anderer bekannter Mechanismus verläuft über die gesteigerte Aktivierung der CAMKK α/β durch die Mobilisierung von Ca^{2+} in das Zytoplasma (Park et al. 2012). Auch eine gesteigerte LKB1-Aktivität z.B. durch SIRT1-Aktivierung, genauso wie die Hemmung inhibitorischer Phosphatasen, erhöhen das pAMPK-Level und steigern damit die Kinaseaktivität (Price et al. 2012). Das Interesse an pharmakologischen und pflanzlichen AMPK-Aktivatoren ist groß, da der Einfluss der AMPK

auf den Stoffwechsel und die Zellalterung bei der Entwicklung neuer Behandlungsstrategien für Volkserkrankungen, wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes mellitus, von zentraler Bedeutung sein kann.

Auch *Res.* ist als AMPK-Aktivator bekannt. Wie aber die gesteigerte Phosphorylierung und Aktivität der AMPK als zelluläre Antwort auf *Res.* genau vermittelt wird, ist in Teilen noch unklar und wird im Rahmen unterschiedlicher Theorien diskutiert (Park et al. 2012, Chiang et al. 2017, Price et al. 2012). Dieses Wissen ist entscheidend, um weitere Schlüsse zu ziehen in welchem Zusammenspiel *Res.*, die AMPK und der Energiestoffwechsel stehen und wie eine *Res.* vermittelte AMPK-Aktivierung Einfluss auf ESCs und die Kardiomyogenese nehmen könnte.

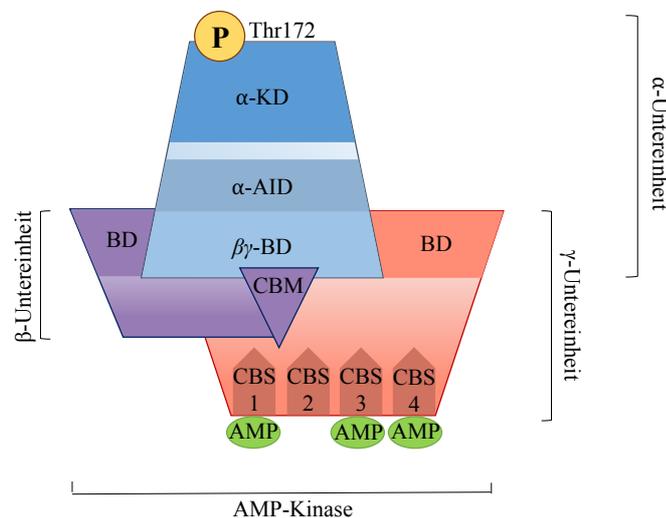


Abb. 5 Schematische Darstellung der AMPK

Schematisch dargestellt ist die AMPK, bestehend aus drei UE und den für die Funktion der AMPK entscheidenden Domänen.

2.7 Sirtuine

Für ein umfassendes Verständnis der Wirkungsweise von *Res.* ist es außerdem notwendig, sich mit einem weiteren Interaktionspartner auseinanderzusetzen, den Sirtuinen. Sirtuine sind evolutionär streng konservierte NAD^+ abhängige Deacetylasen, welche durch die Deacetylierung von Histonen und Nicht-Histonproteinen eine Vielzahl von zellulären Prozessen steuern (Chang und Guarente 2014). In Säugetieren spielen vor allem das zytoplasmatische und nukleäre SIRT1 und das mitochondrial gelegene SIRT3 eine große Rolle (Nogueiras et al. 2012). Untersuchungen der Kristallstruktur von SIRT1 und verschiedene andere Versuche konnten zeigen, dass SIRT1 ein allosterisches Zentrum besitzt, welches durch die Bindung mit *Res.* substratabhängig stimuliert wird (Cao et al. 2015, McCubrey et al. 2017).

Durch ihre Abhängigkeit von NAD^+ sind auch die SIRT-Proteine ähnlich wie die AMPK zelluläre Energiesensoren, die Einfluss auf den Metabolismus und auf das Überleben von Zellen haben (Rahman und Islam 2011). So wurde gezeigt, dass eine verminderte Kalorienzufuhr, vermittelt vor allem durch Sirtuine, zelluläres Überleben in unterschiedlichen Organismen verlängert (Duncan et al. 2016). Darüber hinaus wirken Sirtuine protektiv gegen Langzeitfolgen eines chronischen Energieüberschusses und Übergewicht. So hat eine Überexpression von SIRT1 in Mäusen eine Verminderung von Adipositas, des Serum-Cholesterinspiegels und der Insulinresistenz zur Folge (Chang und Guarente 2014). Um als Energiesensor den metabolischen Status des Organismus genau kontrollieren zu können, wird SIRT1 vor allem in der Leber, dem Fettgewebe, den Skelettmuskeln und in den das Hunger- und Sättigungsgefühl kontrollierenden Kerne im Hypothalamus exprimiert (Chang und Guarente 2014). Neben ihrer Rolle im Stoffwechsel konnten noch weitere Funktionen von Sirtuinen gefunden werden. Dazu gehören der Schutz vor DNA-Schäden durch erhöhtem oxidativen Stress, die Ausbildung neuronaler Netzwerke im Hypothalamus, die Kontrolle über den circadianen Rhythmus und ein positiver Einfluss auf die vaskuläre und kardiale Funktion (Maiese 2015, Rahman und Islam 2011). Die weitreichenden Effekte von Sirtuinen auf Stoffwechsel-, Alterungs- und Proliferationsprozesse machen es nicht nur zu einem interessanten Angriffspunkt in einem medizinisch, pharmakologischen Kontext, sondern auch in der Forschung mit ESCs. Um diesen Belange nachgehen zu können, ist ein Verständnis der molekularen Aktivierung und Wirkungsweise von SIRT Proteinen von entscheidender Bedeutung.

Die Aktivierung von Sirtuinen erfolgt physiologischerweise durch eine Veränderung des NAD^+/NADH -Verhältnisses und des $\text{NAD}^+/\text{Nicotinamid}$ -Verhältnisses. Ein gesteigertes NAD^+ - und ein gesunkenes NADH -Angebot stehen für ein Energieminderangebot, welches durch eine verringerte Aufnahme oder einen erhöhten Verbrauch von Energieträgern bewirkt wird. Im Rahmen dieses metabolischen Ungleichgewichts sind Sirtuine in der Lage, in Abhängigkeit von NAD^+ , ADP-Ribosylierungen zu katalysieren. Dies ist ein Mechanismus, der beispielsweise mit der Unterstützung durch die Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (PARP1), zu einer Verbesserung von Reparationsvorgängen bei Doppelstrangbrüchen der DNA durch oxidativen Stress führt. (Jang et al. 2017) Vor allem wird aber durch das Überangebot von NAD^+ die Deacetylasereaktion von Sirtuinen an Lysin-Resten ermöglicht. Bei dieser komplexen, sechsschrittigen Reaktion wird NAD^+ verbraucht und Nicotinamid entsteht, während Acetyl-Reste von unterschiedlichen Proteinen entfernt werden (Rahman und Islam 2011). Dies hat in Abhängigkeit des Zielproteins unterschiedlichste zelluläre Effekte. Durch die Deacetylierung von Lysin-Resten von Histonen, Proteine die essenziell sind für die enge Verpackung der DNA zu Chromatin, wird deren Ladung positiver. Dies führt zu einer vermehrten Interaktion mit der negativ geladenen DNA und so zu einer gesteigerten Kondensation des Chromatins. Dieses kompakte, als Heterochromatin bezeichnete Chromatin erschwert die Transkription und so die Genexpression der entsprechenden DNA-Bereiche. In welcher Art und Weise Sirtuine bestimmte Histone und DNA-Bereiche ansteuern und gezielt in die Transkription eingreifen ist Gegenstand aktueller Forschung. Die Reproduzierbarkeit der Deacetylierungsmuster lassen aber auf einen nicht dem Zufall überlassenen Mechanismus schließen (Heo et al. 2017). Weitere bekannte Substraten von SIRT1 sind: p53, NF- κ B und für den Metabolismus entscheidende Transkriptionsfaktoren wie PPAR α , PPAR γ und PGC-1 α . (Duncan et al. 2016, Rahman und Islam 2011)

Auch die bereits im Zusammenhang mit der AMPK beschriebene Kinase LKB1 wird durch SIRT1 abhängige Deacetylierung aktiviert. Das SIRT1 und die AMPK durch diese Verbindung eng mit einander interagieren, konnte bereits in β -Zellen der Pankreas dargestellt werden. In diesem Zusammenhang fördert SIRT1, in Abhängigkeit von einer ausreichenden AMPK-Aktivierung, die Regenerierung von β -Zellen (Wu et al. 2019).

Auch auf kardiale Zellen können Sirtuine einen protektiven Einfluss haben. Der anti-entzündliche und anti-oxidative Stoff Melatonin schützt Herzzellen durch die Induktion einer gesteigerten SIRT1 Expression (Savran et al. 2019). Urämietoxine, welche bei Versagen der renalen Funktion anfallen, wirken sich negativ auf das Überleben kardialer Zellen aus und führen zu maladaptiven, fibrotischen Umbauprozessen. Am Mausmodell konnten Hinweise

erbracht werden, dass diese Prozesse durch eine gesteigerte SIRT1 Aktivierung verlangsamt werden können (Li et al. 2019).

Auf Grund ihres Potentials epigenetische Veränderungen zu bewirken sind Sirtuine auch in der Forschung mit Stammzellen von Interesse. So konnten Heo J et al. zeigen, dass SIRT1 in Interaktion mit Dnmt3l das Methylierungsmuster von Keimbahn-Genen verändern kann und so entscheidend in das Differenzierungspotential von ESCs eingreifen kann (Heo et al. 2017). Auch mit Oct4, einem entscheidenden *Enhancer* des für die *Stemness* von ESCs entscheidenden Gennetzwerks, konnte ein über Deacetylierung vermitteltes Zusammenspiel mit SIRT1 gezeigt werden. Dies könnte, in Verbindung mit der metabolischen Sensor-Funktion von Sirtuinen, möglicherweise eine Brücke zwischen Umweltfaktoren und dem Differenzierungsstatus von ESCs darstellen. (Williams EO 2016) Darüber hinaus konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine SIRT1-Expression in autolog transplantierten Stammzellen zur Behandlung von kardialer Insuffizienz, den therapeutischen Effekt und die kardiale Funktion steigert. Dies lässt sich vor allem durch den positiven Einfluss von SIRT1 auf Alterungsprozesse wie Hypertrophie und Myokardfibrose erklären. (Ozawa et al. 2016) Im Mausmodell konnte außerdem beobachtet werden, dass *Res.* die Knochenregeneration aus Mesenchymalen Stammzellen unterstützt, in dem es die Stammzellalterung deutlich verlangsamt. Für diesen Effekt wird in erster Linie die SIRT1-SOX2 Signal Achse verantwortlich gemacht (Choi et al. 2019).

Zusammengenommen scheint es plausibel, dass *Res.* durch eine Aktivierung von Sirtuinen ggf. auch im Zusammenspiel mit der AMPK auf ESCs und deren Ausdifferenzierung einwirken kann. Dies macht es als potentiellen Interaktionspartner im Rahmen der Untersuchung des *Res.*-Effektes auf ESCs interessant.

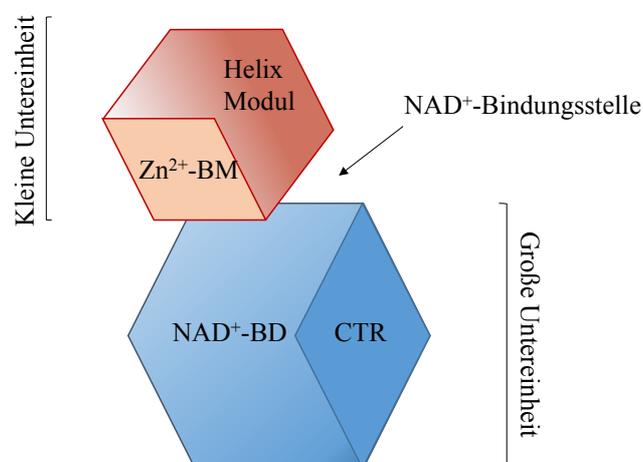


Abb. 6 Schematische Darstellung eines Sirtuin Proteins

2.8 Das Resveratrol Signalwegnetzwerk

Voranehend wurden unterschiedliche Interaktionspartner von *Res.* beschrieben, die unabhängig voneinander, aber auch im Zusammenspiel miteinander, Einfluss auf die Differenzierung von ESCs nehmen können und in ihrer Gesamtheit positiv auf kardiale Zelle einwirken. Welches Netz aus Signalwegen *Res.* nutzt, um seine Wirkungen zu realisieren, ist wegen dessen Komplexität noch nicht vollständig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Netzwerk in Bezug auf ESCs und den Effekt von *Res.* auf die Kardiomyogenese hin untersucht. Es wurde versucht, bereits untersuchte Effekte mit neuen Erkenntnissen zu einem Gesamtkonstrukt zu integrieren.

Zu dem bereits bekannten Wissen gehört zum einen, dass *Res.* über die Hemmung von Phosphodiesterasen und der damit verbundenen Erhöhung des zellulären cAMP Spiegels in der Lage ist, Signalwege anzustoßen, die den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen ins Cytoplasma bewirken (Park et al. 2012). Die Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Gehalts ist ein rudimentärer Zellsignalmechanismus, der zu einer Änderung des Membranpotentials, Aktivierung von Signalproteinen und zu einer erhöhten Reaktionsbereitschaft zellulärer Enzyme Reaktionen führt. Die Frequenz, die Amplitude, so die Anwesenheit von Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Calreticulin und Calcineurin, sind entscheidend für die weitere Signalverarbeitung. Im Zusammenhang mit ESCs konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion von Ca^{2+} und Ca^{2+} -bindenden Proteinen entscheidend für die Ausreifung und kardiale Differenzierung von embryonalen Maus Stammzellen ist (Karimzadeh und Opat 2017). Auch kann durch solche Signale die Phosphorylierung der AMPK via CamKK β angestoßen werden und somit, wie bereits beschrieben, ein Schlüsselenzym für diversen Stoffwechselsituationen mit Einfluss auf Differenzierungsprozessen aktiviert werden (Park et al. 2012) (Chiang et al. 2017).

Zudem wird *Res.* immer wieder mit SIRT1 in Verbindung gebracht. Neben unterschiedlichen eigenständigen zellulären Funktionen, ist SIRT1, durch die Aktivierung der LKB1, auch wegen des Einflusses auf die AMPK und den MEK/ERK-Signalweg bekannt (Safaeinejad et al. 2017, Price et al. 2012). Dies veranschaulicht die Komplexität und die möglichen Verstrickungen eines durch *Res.* aktivierten zellulären Signales.

Ein anderer Interaktionspartner und möglicher Startpunkt interzellulärer Signalwege bilden ER. Aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit mit Estrogenen und hydrophober molekularen Struktur ist *Res.* in der Lage mit nER zu interagieren (Gehm et al. 1997). Dies bedeutet, dass eine Interaktion mit den strukturell sehr ähnlichen mER möglich ist. Diese sind in der Lage, über *Second-Messenger-Systeme* Signale in die Zelle weiterzuleiten. Dadurch

kommt es zur Aktivierung von Signalwege wie PLC/IP3R und PI3K/Akt. Diese Signalwege werden unter anderem auch durch den *Vascular Epidermal Growth Factor* (VEGF) aktiviert. Eine Kardiomyogenese fördernde Wirkung dieser Signalachsen konnte bereits in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden (Bekhte MM 2011). Solch eine Interaktion würde gleichzeitig das Potential aber auch die Komplexität des *Res.* Signalwegnetzwerkes weiter erhöhen. Zusätzlich wurde vorangehend gezeigt, dass es durch die Zugaben von *Res.* zu einer Generierung von ROS an den Tagen 5 -7 des Differenzierungszeitstrahls innerhalb der *EBs* kommt (Mühlbrandt 2018). ROS spielen vor allem in der frühen Kardiomyogenese eine fördernde Rolle (Bartsch C 2011).

Um die Wirkungsweise des Signalwegnetzwerkes besser zu verstehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der *Res.*-Effekt durch unterschiedliche Verfahren unter Einsatz mehrerer Signalwegblocker untersucht. Dafür wurden die Estrogenrezeptor-Modulatoren ICI 182 780 und Tamoxifen, STO-609 ein Inhibitor der AMPK aktivierenden Kinase CamKK β und EX-527 als SIRT1 Inhibitor eingesetzt.

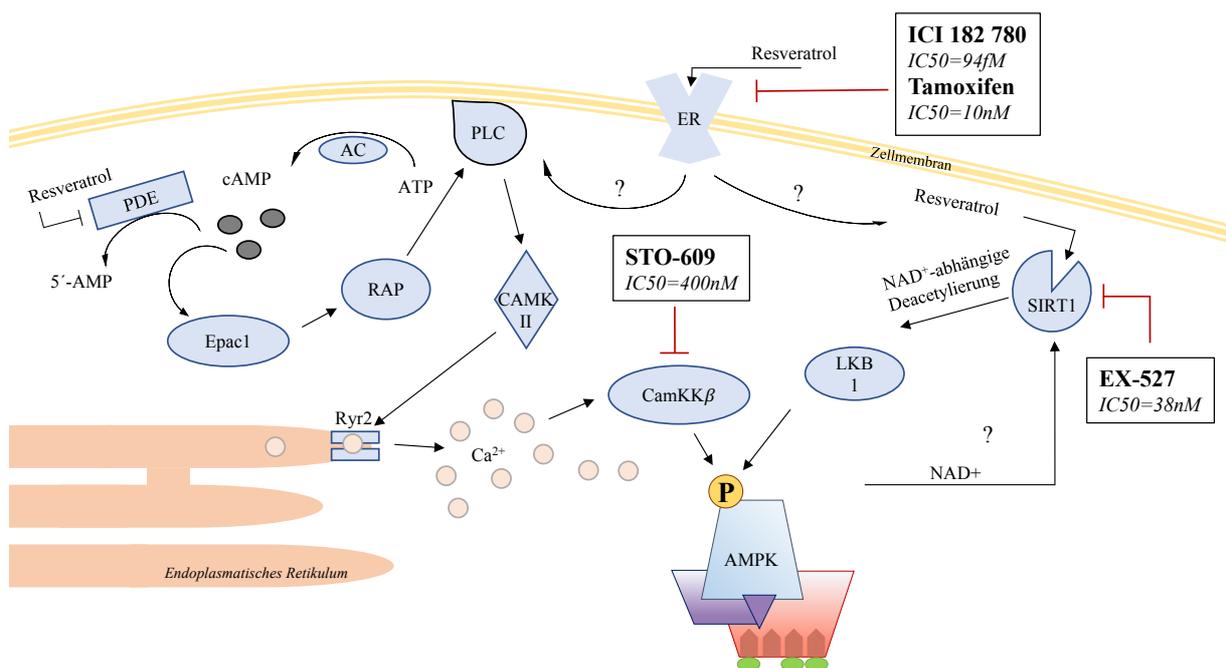


Abb. 7 Beschriebene Interaktionspartner von *Res.* und im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Signalwegblocker

Die Abbildung zeigt *Res.* als SIRT1- und AMPK-Aktivator und Phosphodiesterase-Hemmer, der über eine cAMP-Erhöhung zu einem Ca²⁺-Einstrom führt. Zudem wird eine mögliche Interaktion mit mER illustriert. Des Weiteren sind die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Signalwegblocker dargestellt.

3 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollen im Wesentlichen die folgenden vier Probleme bearbeitet werden:

1. Wie beeinflusst *Res.* die frühe Kardiomyogenese embryonaler Stammzellen?
2. Falls eine Beeinflussung besteht, lässt sich ein einzelner zugrundeliegender Signalweg identifizieren?
3. Welche Rolle spielen Estrogenrezeptoren in der Interaktion von *Res.* mit Stammzellen?
4. Wirkt *Res.* aktivierend auf die AMPK in embryonalen Stammzellen und wenn dem so ist, auf welche Art und Weise wird diese Aktivierung vermittelt?

In ihrer Gesamtheit sollen diese Ziele dazu beitragen, eine Zusammenfassung der zellulären Interaktionen von *Res.* aufzustellen. Aus bereits in der Literatur beschriebenen Reaktionspartnern, ergänzt durch neue Erkenntnis dieser Arbeit, soll so ein Gesamtbild entstehen, welches das durch *Res.* aktivierte Netzwerk aus Signalwegen umfassend beschreibt und als Vorlage auch abseits der Stammzellforschung dienen kann.

Des Weiteren leitet sich aus den oben genannten Zielen ab, dass die Erkenntnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Kardiomyogenese beitragen sollen, wodurch diesem zu meist schlecht kontrollierbaren Prozess bessere Steuerbarkeit verliehen werden könnte. Dies kann wiederum Grundlage für weiterführende Ziele der Stammzellforschung sein, wie der Etablierung von sicherem und praktikablem *tissue engineering*, welches eine Vielzahl von medizinischen Problemen lösen könnte.

Die Grundlage dieser Arbeit wurde während meiner Zeit als Student der „Leitlinie für Forschungs-orientierte Medizin“ der FSU Jena gelegt, welche mir das wissenschaftliche Arbeiten und das Forschen mit Stammzellen nähergebracht hat. Daher stellt es auch ein Ziel dieser Arbeit dar, die im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Erkenntnisse und praktischen Fähigkeiten weiter zu verfolgen und für das Fertigstellen einer Dissertation zu nutzen.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage BP 221S	Sartorius AG, Deutschland
ApoTome	Carl Zeiss AG, Deutschland
Autoklav23	MELAG OHG Medizintechnik, Deutschland
Schüttler, beheizbar	VWR International GmbH, Deutschland
BP 221 S Waage	Sartorius, Germany
Countess II FL	Life Technologies, USA
Criterion Blotter	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Eiswanne (gelb)	NeoLab, Deutschland
Eiswanne (Styropor)	NeoLab, Deutschland
Elektrophoresekammer Agagel Midi-Wide	Biometra GmbH, Deutschland
Geldokumentationsanlage G:BOX EF	Syngene, United Kingdom
Handzähler	IVO, Deutschland
Heizplatte Hot Plate 062	Labotec Labor-Technik-Göttingen GmbH, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Labor Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Deutschland
LAS 3000 High Mode	Fujifilm, Japan
Laser Scanning Mikroskop cLSM510 Meta®	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mini Protean System	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Deutschland
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Fischer Scientific, USA
Pipetboy acu	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Plastikschalen (schwarz, verschließbar)	Vector Laboratories, INC USA
Plastikschalen - RNase/DNase & Pyrogen Safe (blau, offen)	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Plastikbox zum Waschen weiß	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Rotor Gene Q 5Plex HRM Cycler	Quiagen, Niederlande

Research plus Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Deutschland
Spinnerflaschen IBS Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Spinnerflaschen-Rührsystem Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Standard Power pack p25 für Elektrophorese	Biometra GmbH, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Steuergerät HAT 200 W für Heizsystem	Minitüb GmbH, Deutschland
Stoppuhr	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Deutschland
Tecan Infinite 200 Microplate Reader	Tecan Group, Schweiz
Vortexer Vortex-Genie 2	VWR International GmbH, Deutschland
Wasserbad GFL 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
<i>24-Well-Zellkulturplatten</i>	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
<i>96-Well-Platte</i>	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Bakterielle Petrischalen (6, 10 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Blot Absorbent Filter Paper	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Blot Schwämme	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Descosept	AF Dr. Schumacher GmbH, Deutschland
Einfrierröhrchen (2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
FACS-Röhrchen Falcon™ (5, 50 ml)	VWR International GmbH, Deutschland
Filtrationseinheit Stericup	Millipore Corporation, USA
Glasplättchen (12 mm, 22 mm)	Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
Latex, Handschuhe Sensiclean Micro-Touch	Ansell GmbH, Deutschland
Nitrocellulose Membrane, 0.2 µm	Bio-Rad Laboratories, Inc. USA
Paraffin Film	Indiamart, USA
PCR Tubes 0,2 ml	Qiagen, Niederlande
Petriperm-Schalen lumox DISH 50	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

Pipettenspitzen (10, 200, 1000 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5ml; 0,5 ml)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturschale, wachstumsfördernd behandelt	VWR International, USA
Zellschaber	Faust Lab Science GmbH, Deutschland
Zellsieb BD Falcon Cell Stainer 30 µm	Miltenyi Biotec GmbH, Deutschland
Zellzähl Slide, Countless Cell Counting Chamber Slide	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Anbieter
0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Deutschland; Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	Amresco Inc., USA
ADP	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Basal ISCOVE Medium	Biochrom AG, Deutschland
Bovine Serum Albumin – Fraction V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Bradford Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Collagenase Type IV	SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland
Destl. Wasser	Evoqua Laboranlage
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich GmbH, USA
DTT (0,1 M)	Invitrogen GmbH, Deutschland
EDTA (25 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, USA
EX-527	Sigma-Aldrich GmbH, USA
FBS	Sigma-Aldrich GmbH, USA
First-Strand Puffer (5x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Gelantine	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Glucose	Sigma-Aldrich GmbH, USA
GMEM (Glasgow Minimal Essential Medium)	Sigma-Aldrich GmbH, USA

Hyper Ladder IV	Bioline, USA
Tamoxifen	Sigma-Aldrich GmbH, USA
ICI 182 780	Tocris Cookson, UK
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kaleidoskop-Detektions-Letter	Cell Signaling Technology, Inc., USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich GmbH, USA
LIF (ESGRO) (107 U/ml)	Millipore GmbH, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Natrium-L-Laktat	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Quanti Fast SYBR Green PCR Master Mix	Quiagen, GmbH Deutschland
Resveratrol	Sigma-Aldrich GmbH, USA
SDS	Sigma-Aldrich GmbH, USA
STO-609	Sigma-Aldrich GmbH, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
TRIZOL® Reagent	Thermo Fisher Scientific, USA
TWEEN 80	Sigma-Aldrich GmbH, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, USA
0,25 % Trypsin/EDTA	Thermo Fisher Scientific, USA
0,4 % Trypan Blau	Life Technologies USA

4.1.4 Puffer, Lösungen und Gele

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1 % PBS-T	1 % Triton X-100 in PBS
0,01 % PBS-T	1 ml 1 % PBS-T auf 100 ml PBS
5 % BSA-Lösung	5 % Bovine Serum Albumin – Fraction V in 0,01 % PBS-T
Gelatine-Lösung	0,1 % Gelatine in PBS
Lysepuffer	1 ml RIPA-Puffer 2 µl Protease-Inhibitor 10 µl Phosphatase-Inhibitor 1 mM Glycerophosphat 1 mM EDTA pH8,0
Methanol/Aceton-Lösung	Mehtanol:Aceton-Gemisch 7:3
PBS	0,8 g Natriumchlorid 0,02 g Kaliumchlorid 0,144 g Natriumhydrogenphosphat 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat 100 ml Aqua dest. pH 7,4
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 7,4 150 mM NaCl 1% Novidel P-40 0,1 % SDS 0,5% Deoxycholate 84 ml Aqua dest. pH 7,4
Sammelgel (4%)	3 ml 40% Acrylamid 3,75 ml 0,5 M Tris-HCL pH 6,8 150 µl 10 % SDS 150 µl 10 % APS 10 µl TEMED 7,95 ml Aqua dest. pH 7,4
SDS-Ladepuffer	2,5 ml 20% SDS 1,0 ml Glycerol 1,5 ml 1 M Tris; pH = 6,8 Spur Bromphenylblau
SDS-Laufpuffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glyzin 1 g SDS 1 l Aqua dest.
Stripping-Puffer	100 ml 10 % SDS 62,5 ml 1 M Tris; pH 6,8 4 ml Beta-Mercaptoethanol 333,5 ml Aqua dest.

10x TBS-T Stock	24,22 g Tris-Base 292,20 g NaCl 1 l Aqua dest.
1x TBS-T	100 ml 10x TBS-T Stock, pH 7,4 900 ml Aqua dest. 1 ml Tween
10x Transferpuffer Stock	30,3 g Tris-Base 144,0 g Glycin pH 8,3
1x Transferpuffer	100 ml 10x Transferpuffer Stock; pH7,4 300 ml Aqua dest. 200 ml Methanol 400 ml Aqua dest.
Trenngel (10 %)	3,75 ml 40 % Acrylamid 3,75 ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8 150 µl 10 % SDS 150 µl 10 %APS 10 µl TEMED 7,2 ml Aqua dest.
Tyrodepuffer	7,89 g/l Kaliumchlorid 0,447 g/l Calciumchlorid 0,047 g/l Natriumhydrogenphosphat 50 ml Natrium-Pyrovat (100mM) 0,222 g/l Calciumchlorid 0,0952 g/l Magnesiumchlorid 1,801 g/l Glucose 2,383 g/l HEPES; pH 7,4

4.1.5 Res.- und Blocker-Stocklösung

Stocklösungen	Konzentrationen der Stocklösung	Konzentration im Zielmedium (1 µl Stocklösung pro 1 ml Medium)
Resveratrol gelöst in DMSO	Zellkultur: 50 mM und 25 mM Ca ²⁺ -Signal Messung: 5 mM und 2,5 mM	50 bzw. 25 µM
EX-527 (IC ₅₀ 38 nM) gelöst in DMSO	Zellkultur: 10 mM	10 µM
ICI 182 780 (IC ₅₀ 0,3 nM) gelöst in DMSO	Zellkultur und Ca ²⁺ -Signal Messung: 0,3 mM	0,3 µM
STO-609 (IC ₅₀ 400 nM) gelöst in DMSO	Zellkultur: 25 mM	25 µM
Tamoxifen (IC ₅₀ 10 nM) gelöst in DMSO	Zellkultur und Ca ²⁺ -Signal Messung: 1 mM	1 µM

4.1.6 Medien

Medium	Bestandteile
CGR8-Proliferationsmedium (LIF-Medium)	22 ml GMEM 2,5 ml hitzeinaktiviertes, steril-filtrierte FBS (Fetal Bone Serum) 250 µl L-Glutamin 250 µl <i>leukemia inhibitory factor</i> (LIF) (105 U/ml) 12,5 µl β-Mercaptoethanol-Arbeitslösung (Stock: 70,4 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
CGR8-Einfriermedium	45 ml CGR8-Differenzierungsmedium 5 ml DMSO
CGR8-Differenzierungsmedium (Komplettmedium)	500 ml Basal ISCOVE Medium 100 ml FBS 6,5 ml L-Glutamin 6,25 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 0,5 ml β-Mercaptoethanol (Stock: 70,4µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
Serumfreies Medium	500 ml Basal ISCOVE Medium 6,5 ml L-Glutamin 6,25 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 0,5 ml β-Mercaptoethanol (Stock: 70,4 µl β-Mercaptoethanol in 10 ml PBS)

4.1.7 Immunfluoreszenz und Western Blot

Primärer Antikörper	Hersteller
anti-ER α - <i>Kaninchen</i>	Abcam, UK
anti-ER β - <i>Kaninchen</i>	Abcam, UK
anti-GPER - <i>Kaninchen</i>	Abcam, UK
anti-GAPDH - <i>Kaninchen</i>	Abcam, UK
anti-MHC - <i>Maus</i>	Abcam, UK
anti-Phospho-AMPK α (Thr172) - <i>Kaninchen</i>	Cell Signaling Technology, Inc., USA
anti-AMPK - <i>Kaninchen</i>	Cell Signaling Technology, Inc., USA

Sekundärer Antikörper	Hersteller
CY3-gekoppelt anti-Maus IgG - <i>Ziege</i>	Thermo Fisher Scientific, USA
HRP-gekoppelt anti-Kaninchen IgG - <i>Ziege</i>	Santa Cruz Biotechnology, USA
HRP-gekoppelt anti-Biotin - <i>Ziege</i>	Abcam, UK

Chemilumineszent /Fluoreszenzfarbstoff	Hersteller
Immobilon Western HRP Substrat	Chemilumineszent Millipore, USA
Fluo-4, AM	Thermo Fisher Scientific, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride)	Thermo Fisher Scientific, USA
SYBR Green Real-Time PCR Master Mix	Quiagen GmbH, Deutschland

4.1.8 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
Pol2a	for.: 5'-GACAAAAGTGGCTCCTCTGC-3' rev.: 5'-GCTTGCCCTCTACATTCTGC-3'	Sigma-Aldrich GmbH. Deutschland
Mlc2a	for.: 5'-CACCGTCTTCCTCACACTCTT-3' rev.: 5'-AGGCACTCAGGATGGCTTC-3'	Sigma-Aldrich GmbH. Deutschland
Mlc2v	for.: 5'-CCCAGATCCAGGAGTTCAAG-3' rev.: 5'-TTGTCGATGAAGCCGTCTCT-3'	Sigma-Aldrich GmbH. Deutschland

4.1.9 Software

Software	Hersteller
EndNote®	Thomson Reuters, USA
ImageJ®	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Graphpad Prism®	GraphPad Software, USA
LSM510 Software	Carl Zeiss AG, Deutschland
LAS3000 Software	Fujifilm, Japan
Microsoft® Office	Microsoft Corporation
Rotor-Gene Q Software	Qiagen, Niederlande

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Erhaltungskultur embryonaler Stammzellen (ESZ)

In allen Versuchen wurde mit der ESZ-Zelllinie CGR8 gearbeitet. Um die verwahrten Zellen den Experimenten zu zuführen, wurden 10 ml vorgewärmtes (ca. 37°C) CGR8-Komplettmedium (4.1.6) in einem 15 ml Reaktionsgefäß (4.1.2) vorgelegt und eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturflasche (4.1.1) wurde mit 4 ml *Leukemia Inhibiting Factor* (LIF)-Medium (4.1.6) befüllt.

Ein Zellaliquot wurde in das warmem Komplettmedium aufgenommen und für 3 min bei 800 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zell-Pellet in 1 ml Komplettmedium resuspendiert und in die Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellkultur fand bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (4.1.1) statt. Täglich wurden 5ml des Mediums durch frisches LIF-Medium ersetzt.

Bei 80 % Konfluenz wurden die Stammzellen passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit 2,5 ml vorgewärmter 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (4.1.3) enzymatisch dissoziierten. Die enzymatische Proteasereaktion wurde mit 5 ml CGR8-Komplettmedium (4.1.6) nach 4 min gestoppt. Die darauffolgende Zentrifugation und Überführung in weitere Zellkulturflaschen lief ab wie zuvor beschrieben. Alle Vorgänge wurden soweit möglich unter der Sterilbank auf der Wärmeplatte (4.1.1) bei 37 °C durchgeführt.

4.2.1.2 Kultivierung von Embryoid Bodies in der Spinnerflasche

Entsprechend dem in 4.2.1.1 beschriebenen Passagiervorgang wurden die Zellen einer Zellkulturflasche an Tag 0 des Differenzierungszeitstrahls (Abb. 8, 9) dissoziiert und die Suspension (ca. 10 Mio. Zellen) in eine mit 125 ml vorgewärmtem CGR8-Differenzierungsmedium (Komplettmedium) gefüllte Spinnerflasche (SF) (4.1.1) überführt. Die SF wurde vor dem Befüllen mit Sigmacode beschichtet. 24 h später wurde diese SF auf 250 ml Komplettmedium aufgefüllt. Es folgte ein täglicher Mediumwechsel, in dem 125 ml Medium durch frisches Komplettmedium ersetzt wurde. Die SF wurde mit dem Rührsystem (4.1.1) bei 22,5 UpM, 1440° Drehungswinkel, 5 % CO₂, wassergesättigter Luftfeuchtigkeit

und bei 37°C in einem Zellkultur-Inkubator kultiviert. Die *EBs* wuchsen bis Tag 4 des Differenzierungszeitstrahls (4 x 24 h) in der SF.

4.2.1.3 Ausplattierung und Kultur der Embryoid Bodies in Petrischalen

Die Ausplattierung der *EBs* auf Gewebekulturschalen (60mm) (4.1.2) erfolgte an Tag 4 des Differenzierungszeitstrahls. Zunächst wurden Gewebekulturschalen mit 5 ml Komplettmedium vorgelegt und im Inkubator vorgewärmt. Daraufhin wurden ca. 500 *EBs* mit einer großlumigen sterilen serologischen 25 ml Pipette (4.1.2) aus der SF entnommen und auf einer bakteriologischen Petrischale (100mm) (4.1.2) mit ca. 30 ml vorgewärmtem Komplettmedium übertragen. Von dort wurden gezielt 25-30 *EBs* mittels 1000 µl Pasteurpipette mit abgeschnittener Pipettenspitze (4.1.2) auf die vorbereiteten adhärennten Petrischalen übertragen. Dieser gesamte Arbeitsschritt wurde unter der Sterilbank auf der Wärmeplatte durchgeführt. Während des gesamten Vorgangs musste auf besondere Sorgfalt geachtet werden, um die *EBs* keinem großen mechanischen Stress auszusetzen. Die Kultivierung fand im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit statt. Täglichem wurde das Medium gegen 5 ml frisches Komplettmedium ausgetauscht.

4.2.1.4 Behandlung der Embryoid Bodies mit Resveratrol und Signalwegblockern (3.1.6)

Die Kultivierung von Tag 0-4 und Ausplattierung an Tag 4 lief ab wie in 4.2.1.2 bzw. 4.2.1.3 erläutert. Ab Tag 5 des Differenzierungszeitstrahls wurden die adhärennten *EBs* mit Komplettmedium, welches die zu untersuchenden Substanzen enthielt, kultiviert (4.1.6). Zunächst wurde Komplettmedium in dem 25 µM und 50 µM *Res.* enthalten war verwendet. In den anschließenden Experimenten wurden Komplettmedien, welche die Signalwegblocker EX-527, ICI 182 780, Tamoxifen und STO-609 (4.1.6) zusätzlich zu *Res.* enthielten, verwendet. Als Kontrollen fungierten unverändertes Komplettmedium, Komplettmedium inklusive dem Lösungsmittel DMSO und Komplettmedium inklusive der Signalwegblocker EX-527, ICI 182 780, Tamoxifen und STO-609 ohne *Res.* Die Zusammensetzung der Medien mit entsprechenden Endkonzentrationen der Blocker und *Res.* sind nachfolgend aufgeführt.

Medium	Bestandteile
Resveratrol-haltiges Komplettmedium	Res. gelöst in DMSO in CGR8 Differenzierungsmedium <u>Endkonzentration:</u> 25 µM 50 µM
Resveratrol- und EX-527-haltiges Komplettmedium	Res. und EX-527 gelöst in DMSO in CGR8-Differenzierungsmedium <u>Endkonzentration:</u> Res. 25 µM / 50 µM EX-527 10 µM
Resveratrol- und ICI 182 780-haltiges Komplettmedium	Res. und ICI 182 780 gelöst in DMSO in CGR8-Differenzierungsmedium <u>Endkonzentration:</u> Res. 25 µM / 50 µM ICI 182 780 0,3 µM
Resveratrol- und STO-609-haltiges Komplettmedium	Res. und STO-609 gelöst in DMSO in CGR8 Differenzierungsmedium <u>Endkonzentration:</u> Res. 25 µM / 50µM STO-609 25 µM
Resveratrol- und Tamoxifen-haltiges Komplettmedium	Res. und Tamoxifen gelöst in DMSO in CGR8 Differenzierungsmedium <u>Endkonzentration:</u> Res. 50 µM Tamoxifen 1 µM

4.2.1.5 Bestimmung des Kontraktionsverhaltens und der Schlag-Frequenz der EB's

Zur Ermittlung der kardialen Differenzierung wurden die EBs (kultiviert wie in 4.2.1.4 erläutert) täglich mithilfe des Lichtmikroskops Telaval 31 (4.1.1) beobachtet. 30 min nach Mediumwechsel wurden 25 EBs untersucht und der prozentuale Anteil an EBs mit schlagenden Arealen berechnet. Daraufhin wurden von drei repräsentativen EBs die Schlag-Frequenz mit Hilfe einer Stoppuhr und eines Handzählers (4.1.1) gezählt. Die EBs wurden mit dieser Methode bis Tag 10 des Differenzierungszeitstrahles beobachtet.

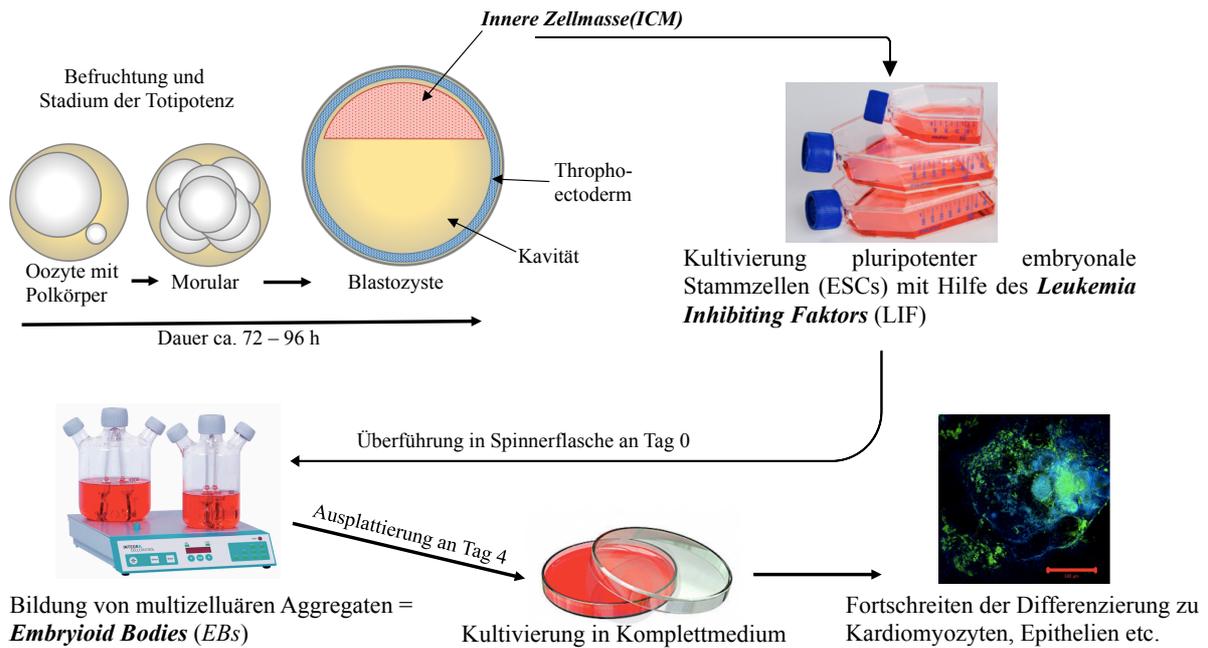


Abb. 8 Gewinnung der embryonalen Stammzellen aus Mausblastozysten und Beginn des Zellkulturzeitstrahls

Dargestellt ist die Gewinnung von ESCs aus der inneren Zellmasse von Blastozysten mit anschließender Kultivierung in LIF-Medium, Spinnerflasche und Petrischale.

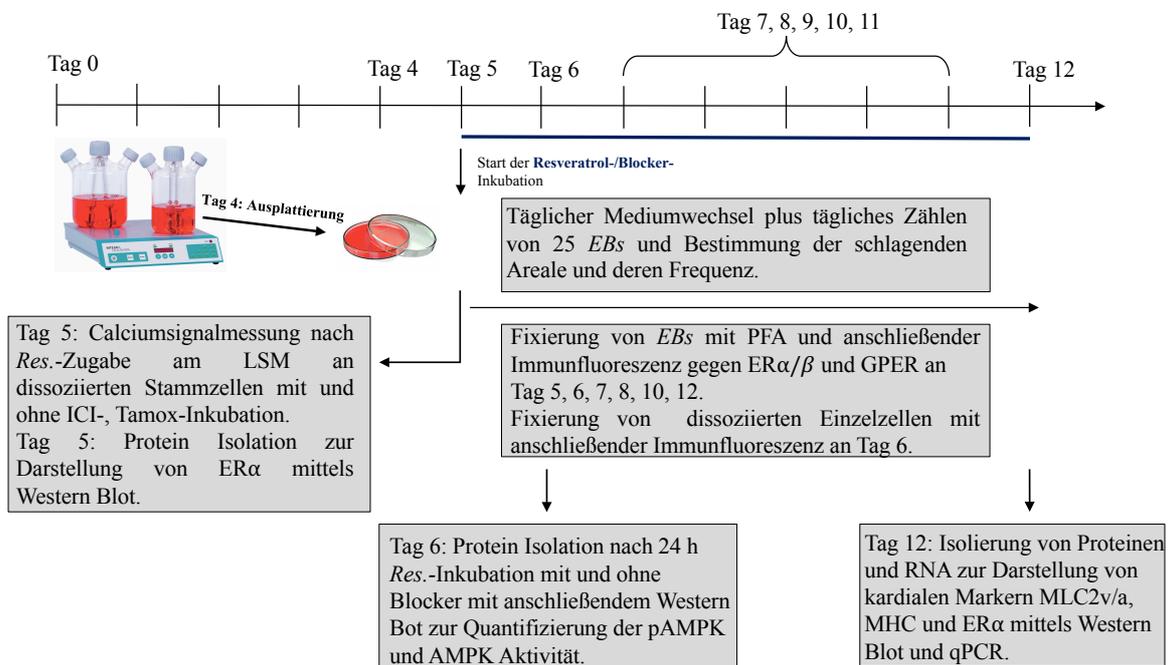


Abb. 9 Zellkulturzeitstrahl in Relation zu den angewandten Methoden

Dargestellt wird der Zellkulturzeitstrahl mit den an den jeweiligen Tagen durchgeführten Experimenten

4.2.2 Ca²⁺-Signal Messung

4.2.2.1 Vorbereitung der Proben

Um die Rolle von Ca²⁺ im *Res.* Signalweg besser zu verstehen, wurden an Tag 5 des Differenzierungszeitstrahls an dissoziierten Einzelzellen Ca²⁺-Signale mithilfe von Fluo4 (4.1.7) am cLSM510meta® (4.1.1) gemessen.

Die Kultivierung der *EBs* in der SF lief ab wie in 4.2.1.2 beschrieben. An Tag 4 des Differenzierungszeitstrahls wurde zunächst eine *24-Well-Platte* (4.1.2) mit Gelatine beschichteten Glasplättchen (4.1.2) mit 0,5 ml Komplettmedium pro Kavität vorbereitet. Die *EBs* wurden analog zu 4.2.1.3 gewonnen und in 15 ml Falcon Röhrchen (4.1.2) überführt, das Medium wurde entfernt und 1 ml Collagenase (2 mg in 1 ml PBS) (4.1.3) hinzugegeben. Die Lösung wurde für 4 min im Inkubator inkubiert, bis diese sich trübte. Daraufhin wurde die Kollagenasereaktion mit 2 ml Komplettmedium gestoppt. Die Lösung wurde durch ein Zellsieb (4.1.2) filtriert und danach bei RT mit 800 UpM für 4 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt, das Zell-Pellet in 1 ml Komplettmedium resuspendiert und die Lösung auf 4 ml mit Komplettmedium aufgefüllt.

Die Zellanzahl pro ml in dieser Zellsuspension wurden mithilfe des Countess II FL Zellzählers (4.1.1) gemessen.

Anschließend wurde ein errechnetes Volumen an Zellsuspension mit jeweils 20.000 Zellen in die einzelnen Kavitäten der *24-Well-Platte* gegeben. Die Kultivierung fand im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für 24 h statt. Dieser gesamte Arbeitsschritt wurde so weit wie möglich unter der Sterilbank auf der Wärmeplatte durchgeführt.

4.2.2.2 Ca²⁺-Messung am cLSM510meta® (4.1.1)

An Tag 5 des Differenzierungszeitstrahls wurde zunächst das Medium der einzelnen Kavitäten entfernt und durch serumfreies Medium mit und ohne ICI 182 780 bzw. Tamoxifen (Konzentration wie in 4.2.1.4 beschrieben) (4.1.5) ersetzt. Nachdem die Zellen am Lichtmikroskop Telaval 31 angeschaut und bewertet wurden, wurden sie für 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator inkubiert. Stammlösungen von *Res.* (gelöst in DMSO) in den Konzentrationen 5 mM und 2,5 mM wurden erstellt. Als Kontrollen wurden ADP (4.1.3) (gelöst in Aqua dest. pH 7,4) und das Lösungsmittel DMSO bereitgestellt.

1,5 µl Fluo4 (Endkonzentration 10 µM) wurde in die einzelnen Kavitäten gegeben und die Zellen für 25 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator inkubiert. Das

Medium wurde daraufhin verworfen, die Zellen mit 0,5 ml warmen Tyrode-Puffer (4.1.4) gewaschen und das Glasplättchen mit den angewachsenen Einzelzellen auf die Untersuchungsschale mit vorgelegten 495 µl warmem Tyrode-Puffer übertragen. Im Fall der vorhergehenden Inkubation mit einem Blocker wurde auch der Tyrode-Puffer mit dem entsprechenden Blocker versehen.

Dieser gesamte Arbeitsschritt wurde so weit wie möglich unter der Sterilbank auf der Wärmeplatte unter Vermeidung von direkter Lichteinstrahlung durchgeführt und für jede einzelne Kavität nacheinander wiederholt.

Am cLSM510meta® wurde zunächst mit Durchlicht nach einem passenden Ausschnitt gesucht und dieser fokussiert. Mittels Argon-Laser wurde, bei einer Wellenlänge von 488 nm (Anregung von Fluo4) für 250 Sek. ein Bild pro Sek. aufgenommen. Nach ca. 20 Sek. wurden 5 µl der zu testenden Substanz hinzugegeben.

4.2.2.3 Auswertung der Ca^{2+} -Messung mit der LSM510 Software und Excel (4.1.9)

Die Auswertung der am cLSM510meta® aufgenommenen Ca^{2+} -Signale geschah mittels LSM510 Software und Microsoft Office Excel. Dafür wurden mittels LSM-Software pro Aufnahme mindestens fünf repräsentative Zellen mit der ROI-Funktion umrandet und die Signalintensitätsänderung in diesem Kreis im Zeitverlauf in Zahlen dargestellt. Die entsprechende Wertetabelle wurde kopiert und in das Programm Excel übertragen. Des Weiteren wurde der prozentuale Anteil an Zellen, die mit einem Ca^{2+} -Signal reagierten, notiert. Für jeden ROI wurden die Ruheintensität, der höchste Intensitätswert (I_{max}), die sich daraus ergebende Amplitude, so wie die Dauer bis I_{max} und die Dauer des Signals bestimmt. Als Anfang und Ende des Signals wurde I_{max}/e festgelegt.

4.2.3 Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot

4.2.3.1 Protein Extraktion mit RIPA Puffer

Zur Darstellung des Einflusses von *Res.* auf die Aktivität der AMP-Kinase mit und ohne Signalwegblocker wurde mittels Western Blot und antikörpervermittelter Chemilumineszenz die aktive Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr 172) quantifizierbar gemacht. Des Weiteren erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Methode die Quantifizierung des kardialen Markers MHC

an Tag 12 und die Überprüfung der Anwesenheit von Estrogenrezeptor alpha (ER α) an Tag 5 und 12 des Differenzierungszeitstrahls.

Die Kultivierung der *EBs* in der SF, die Ausplattierung auf Petrischalen und Behandlung mit den zu untersuchenden Substanzen lief ab wie in 4.2.1.2, 4.2.1.3 und 4.2.1.4 beschrieben.

An Tag 5, Tag 6 bzw. an Tag 12 des Differenzierungszeitstrahls wurden die Petrischalen mit adhären *EBs* aus dem Inkubator entnommen, das Medium verworfen und die Petrischalen auf Eis gelegt. Die *EBs* wurden dreimal mit kaltem PBS (4.1.4) gewaschen und zunächst in PBS belassen. Mithilfe des Zellschabers (4.1.2) wurde die *EBs* einer Petrischale vorsichtig abgetragen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Das PBS wurde verworfen und jeweils 100 μ l frischer Lysepuffer (4.1.4) zugegeben. Die Zelllösung wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren und mithilfe der Ultraschallsonde (4.1.1) (jeweils drei Schallimpulse pro Reaktionsgefäß) homogenisiert und daraufhin für weiter 20 min mittels Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C mit 15000 UpM für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradfordreagenz (4.1.3)

Zunächst wurde eine Standard Konzentrationseichlösungsreihe mit BSA-Fraktion V (4.1.3) in Aqua dest. pH 7,4 angesetzt, in dem eine Stammlösung mit 2 mg/ml auf 1, 0,75, 0,5, 0,25, 0,125 und 0,065 mg/ml verdünnt wurde. Eine *96-Well-Platte* (4.1.2) wurde mit 180 μ l Bradfordreagenz vorgelegt. Die Proteinproben wurden aufgetaut und 2,5 μ l der jeweiligen Proben mit 47,5 μ l Aqua dest. pH7,4 verdünnt (1:20). 20 μ l der Proben aus der Eichlösungsreihe und 20 μ l der verdünnten Proteinproben wurden in die entsprechenden Kavitäten gegeben, wobei auf die Vermeidung jeglicher Luftblasen geachtet wurde. Mittels Tecan Infinite 200 (4.1.1) bei einer Absorption von 595 nm wurde die Signalintensität pro Kavität gemessen. In Relation zur Eichreihe wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben errechnet. Anschließend wurde für jede Probe das entsprechende Volumen mit 60 μ g Proteinen berechnet.

4.2.3.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese

Zunächst wurden die Gelkammern aus mit 70 %igem Ethanol (4.1.3) gereinigten Glasplatten zusammengesetzt und in das Stützsystem des Mini-Protean-Systems (4.1.1) eingespannt. Das Trenngel (4.1.4) wurde im Becherglas (4.1.1) zusammengestellt, homogenisiert und 5 ml in

die Gelkammer gegeben. Der Rest der Kammer wurde mit 70 %igem Ethanol gefüllt. Das Gel verfestigte sich innerhalb von ca. 40 min. Der 70 %igem Ethanol wurde entfernt. Das Sammelgel (4.1.4) wurde zusammengestellt, 1 ml flüssiges Sammelgel auf das Trenngel gegeben und der Taschenkamm ins Sammelgel eingesetzt. Das Sammelgel verfestigte sich innerhalb von ca. 30 min. SDS-Laufpuffer (4.1.4) wurde angesetzt (600 ml für ein bis zwei Gele und 1200 ml für drei bis vier Gele) und kaltgestellt. Der Laufpuffer wurde in den Gelelektrophoresetank (4.1.1) gegeben und die Gele in die entsprechenden Halterungen im Tank überführt.

Die Proteinproben wurden ihrer Proteinkonzentration entsprechend (4.2.3.2) mit SDS-Ladepuffer (4.1.4) (Gesamtvolumen 1:5) und PBS verdünnt, so dass in den jeweiligen Lösungen eine Proteinmenge von 60 µg bei einem Gesamtvolumen von 50 µl vorhanden war. Zudem wurde ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß mit 32 µl biotinylierter Kaleidoskop-Detektionsletter (4.1.3) befüllt. Die Proteinlösungen und Detektionsletter wurden für 8 min bei 95° C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt.

Die Kämmen wurden aus den Gels entfernt und 35 µl (42 µg Protein) der Proteinlösungen bzw. 8 µl des Detektionsletters wurden in die Geltaschen gegeben. Bei konstanter Spannung wurden die Proteinproben bei 70 V zunächst im Sammelgel für ca. 15 min gesammelt. Danach durchliefen die Proteinproben das Trenngel bei 130 V für ca. 1,5 h.

4.2.3.4 Blotting der Proteinbanden auf Nitrozellulosemembran

Der Transferpuffer (4.1.4) wurde angesetzt (1 l für zwei bzw. 2 l für vier Gele) und bei -20° C gekühlt. Die Nitrozellulosemembran und das Filterpapier (4.1.2) wurden sorgfältig zurechtgeschnitten (9x6 cm und 10x7,5 cm) und mit den Western Blot-Schwämmen (4.1.2) in kaltem Transferpuffer eingeweicht. Die Gele wurden vorsichtig aus den Gelkammern befreit für 10 min in kaltem Transferpuffer gelegt. Der *Blottingtank* (4.1.1) wurde mit eiskaltem Transferpuffer gefüllt.

In der Reihenfolge: Schwamm, zwei Filterpapiere, Nitrozellulosemembran, Gel, zwei Filterpapiere, Schwamm wurde ein *Sandwich* in den *Blottingklemmen* (4.1.1) gebildet und in den *Blottingtank* gesteckt. Der *Blottingtank* wurde im Kühlraum (4 °C) an den Power Supply angeschlossen. Die Proteinbanden wurden über Nacht bei 22 V und 400 mA vom Gel auf die Nitrozellulosemembran *geblottet*.

4.2.3.5 Blocken der Membran und Behandlung mit primären und sekundären Antikörpern

1 l TBS-T sowie 100 ml 5 %iger BSA-Lösung (5 % Bovine Serum Albumin – Fraktion V gelöst in 0,01 % TBS-T) (4.1.4) wurden angesetzt. Die Nitrozellulosemembranen wurden vorsichtig aus dem *Sandwich* gelöst und in zwei Hälften geschnitten (Eine Hälfte *Housekeeping*-Protein GAPDH, andere Hälfte das zu untersuchenden Protein). Die Nitrozellulosemembranen wurden dreimal für 5 min in 15 ml TBS-T gewaschen. Danach wurden sie in verschließbaren Boxen (4.1.1) überführt und gleichmäßig mit 5 %iger BSA-Lösung vollständig benetzt. Die Boxen wurden verschlossen und zusätzlich mit einem Paraffin-Film (4.1.2) abgedichtet. Die Nitrozellulosemembranen wurden so für 5 h im Kühlraum bei

4 °C auf dem Labor Schüttler (4.1.1) geblockt.

Die primären Antikörper (4.1.7) wurden wie nachfolgend aufgelistet vorbereitet.

Primärer Antikörper	Tier	Verdünnung	Verdünnung in
Anti-GAPDH	<i>Kaninchen</i>	1:1000	5 % BSA-Lösung
Anti-AMPK	<i>Kaninchen</i>	1:500	5 % BSA-Lösung
Anti-pAMPK (P-Thr172)	<i>Kaninchen</i>	1:500	5 % BSA-Lösung
Anti-MHC	<i>Maus</i>	1:1000	5 % BSA-Lösung
Anti-ER α	<i>Kaninchen</i>	1:500	5 % BSA-Lösung

Verschließbare Boxen wurden mit 4 ml der entsprechenden primären Antikörperlösung befüllt. Die Nitrozellulosemembranen wurden in die korrespondierenden Boxen übertragen. Es wurde auf komplette Benetzung der Nitrozellulosemembranen geachtet. Die Boxen wurden verschlossen und zusätzlich mit dem Paraffin-Film abgedichtet. Die Nitrozellulosemembranen wurden so über Nacht im Kühlraum bei 4 °C auf dem Labor Schüttler mit dem primären Antikörper inkubiert. Die sekundären Antikörper (4.1.7) wurden wie nachfolgend aufgelistet vorbereitet.

Sekundärer Antikörper	Tier	Verdünnung	Verdünnung in
anti- <i>Kaninchen</i> -IgG HRP-gekoppelt	<i>Ziege</i>	1:1000	1x TBS-T
anti- <i>Maus</i> -IgG HRP-gekoppelt	<i>Ziege</i>	1:1000	1x TBS-T
anti-Biotin HRP-gekoppelt	<i>Ziege</i>	1:2000	1x TBS-T

Die Nitrozellulosemembranen wurden mit 15 ml TBS Puffer dreimal für 5 min gewaschen. Verschließbare Boxen wurden mit 4 ml der entsprechenden sekundären Antikörperlösung befüllt. Die Nitrozellulosemembranen wurden in die korrespondierenden Boxen übertragen. Es wurde auf komplette Benetzung der Nitrozellulosemembranen geachtet. Die Boxen wurden verschlossen und zusätzlich mit dem Paraffin-Film abgedichtet. Die Nitrozellulosemembranen wurden so 1 h bei RT auf dem Labor Schüttler mit dem sekundären Antikörper inkubiert und danach analog zu den vorangehenden Waschschrritten gewaschen und im Kühlschrank bis zur Detektion aufbewahrt.

4.2.3.6 Detektion am LAS 3000 High Mode (4.1.1)

Die Nitrozellulosemembranen wurden im Verhältnis 1:1 mit den beiden Detektionsdetergenzien (Immobilon Western Chemilumineszent HRP Substrat) (4.1.7) benetzt und für 3 min im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Nitrozellulosemembranen im LAS 3000 High Mode zentral ausgerichtet. Der Fokus wurde manuell eingestellt. Die Lumineszenzstärke der Proteinbanden wurde zunächst mit der Einstellung *Precision* und danach mit der Einstellung *Increment* gemessen. Die Kontrasteinstellung der gewünschten Bandenintensität wurde manuell optimiert und die Aufnahmen als Bild und Softwaredokument gespeichert.

4.2.3.7 Auswertung mittels ImageJ® und Excel (4.1.9)

Die Aufnahmen des LAS 3000 High Mode wurden in ImageJ® geöffnet und die optimale Kontrasteinstellung ausgesucht. Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden markiert, woraufhin ImageJ® die unterschiedlichen Bandenintensitäten in Abhängigkeit der Grundintensität berechnete. Diese Daten wurden in Excel übertragen und die Bandenintensität des *Housekeeping* Proteins mit der des zu untersuchenden Proteins ins Verhältnis gesetzt. Dies entspricht dem absoluten Aktivitätsniveau der AMPK bzw. der absoluten Expression von MHC in den einzelnen Proben. Zur weiteren Analyse wurden diese Ergebnisse in Relation zur Komplettmedium Kontrolle betrachtet.

4.2.3.8 Stripping der Western Blot Membran

Um die zelluläre Expression der unphosphorylierten AMPK untersuchen zu können, wurden von den Membranen, nach dem diese hinsichtlich der pAMPK untersucht worden waren, die

Antikörperbindungen entfernt und der Western Blot wie in 4.2.3.4 - 4.2.3.7 beschrieben mit Detektion der AMPK wiederholt. Dazu wurde zunächst der Stripping Puffer (4.1.4) auf 50 °C erhitzt. Danach wurden 20 ml des warmen Stripping Puffers auf die Membranen gegeben und diese so für 20 min bei 50 °C im heizbaren Schüttler (4.1.4) inkubiert. Daraufhin wurden die Membranen viermal mit TBS-T für 5 min gewaschen. Danach wurde wie in 4.2.3.4 - 4.2.3.7 beschrieben verfahren.

4.2.4 Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit gewählt, um über eine immunhistochemische Färbung unterschiedliche membranständige Estrogenrezeptoren (ER) (ER α , ER β und GPER) im Verlauf des Differenzierungszeitstrahls nachzuweisen. Zunächst wurden an Tag 4 des Zellkulturzeitstrahls ca. fünf *EB*'s pro Kavität in einer *24-Well-Platte* analog zu 4.2.1.3 ausplattiert und mit Kompletmedium inkubiert. Es folgte täglicher Mediumwechsel. An Tag 5, 6, 7, 8, 10 und 12 des Differenzierungszeitstrahls wurden die angewachsenen *EB*'s von jeweils 4 x 4 Kavitäten für 10 min mit Paraformaldehyd (PFA) (4.1.3) bei RT fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend in PBS-T (0,1% Tween) plus Penicillin/Streptomycin (4.1.3) aufbewahrt. Zusätzlich wurde an den Tagen 6, 7, 8, 10 und 12 die Zellen ausgewählter *EB*'s analog zu 4.2.2.1 mittels Kollagenase dissoziiert und als Einzelzellen ausplattiert.

Um an den fixierten Zellen die Rezeptoren mit Immunfluoreszenz darzustellen erfolgte zunächst die Blockung unspezifischer Antikörperbindungen. Dafür wurden die Zellen mit 1 % BSA und 22,52 mg/ml Glycine in PBS-T (4.1.4) für 30 min inkubiert. Die primären Antikörperlösungen (4.1.7) wurde in einem Verhältnis von 1:100 mit 1 % BSA in PBS-T verdünnt. Es wurden 200 μ l der primären Antikörper-Lösung pro Kavität auf die *EBs* gegeben und diese über Nacht bei 4 °C und bei leichtem Schütteln inkubiert. Die *EBs* wurden anschließend dreimal mit PBS für 5 min gewaschen. Der sekundären Antikörper (4.1.7) wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in 1 % BSA in PBS-T verdünnt. Die *EBs* wurden für 60 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die *EBs* mit PBS für 5 min gewaschen. Zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Zellen für 1 min mit 0,5 μ g/ml DAPI (4.1.7) inkubiert und daraufhin einmal mit PBS für 5 min gewaschen. Die *EBs* wurden mit Hilfe des Laser-Scanning-Mikroskops cLSM510meta® untersucht und die Intensität der emittierten Fluoreszenz des angeregten Cy3-Antikörpers (4.1.7) gemessen. Die Einstellung des Mikroskops sind

nachfolgend aufgelistet. Zusätzlich wurden pro Passage und Fixierungsvorgang zwei Negativ-Kontrollen (ohne Antikörper-Inkubation, nur sekundäre Antikörper-Inkubation) angefertigt und mit den gleichen Parametern untersucht.

	CY3	DAPI
Funktion	Gekoppelte mit dem sekundären Antikörper gegen IgG (Kaninchen), ER α -, ER β -, GPER-Detektion	Markierung von DNA
Anregungsmaximum	550 nm	358 nm
Emissionsmaximum	570 nm	461 nm
Detektion	Langpassfilter LP560	Langpassfilter LP420
Objektiv	5x numerische Aperatur 0,30	5x numerische Aperatur 0,30
Pinhole (max. Halbwertsbreite)	407,3 μ m	407,3 μ m
Auflösung	7 Schnitte a 5 μ m, 512x512	7 Schnitte a 5 μ m, 512x512

4.2.5 Genexpression

4.2.5.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden an Tag 12 des Zellkulturzeitstrahls *EBs*, welche analog zu 4.2.1.3 an Tag 4 ausplattiert worden waren, dreimal in der Petrischale mit PBS gewaschen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 400 UpM. Daraufhin wurde das PBS entfernt und die Proben in 0,5 ml TRIzol® Reagent (4.1.3) gelöst, mehrmals homogenisiert und für 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Zelllösungen entweder zu nächst bei – 80 °C gelagert oder es wurde sofort mit dem nächsten Schritt fortgefahren.

Es folgte die Zugabe von 200 μ l Chloroform (4.1.3). Die Probe wurde zunächst geschüttelt und dann 15 min bei 4 °C und mit 15000 UpM zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 200 μ l Chloroform versetzt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die daraufhin entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 μ L Isopropanol (4.1.3) versetzt, geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden dann 15 min bei 4 °C und 10000 UpM

zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 500 µl 75 % Ethanol gewaschen.

Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 10000 UpM. Das nach dem Verwerfen des Überstandes entstandene Pellet wurde getrocknet und anschließend in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Proben wurde bis zur cDNA Herstellung bei -80 °C gelagert.

4.2.5.2 cDNA-Synthese

Um aus der isolierten RNA cDNA herstellen zu können, wurde zunächst die in der Probe vorhandene RNA-Konzentration am UV/Vis-Spektralphotometer (Nanodrop, 4.1.1) ermittelt. Dies erfolgte bei einer Absorption von 260 nm. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, der Mittelwert bestimmt und dieser als Ausgangskonzentration zur Berechnung der für die c-DNA-Herstellung notwendigen Mengen an Probe verwendet. Dem entsprechend wurden die einzelnen Proben mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl RNA verdünnt. Die Reversetranskription wurde nach den folgenden Schritten durchgeführt.

Schritt	Zugebende Reagenz	Inkubation
DNase-Verdau (2 µl/Probe)	Master-Mix aus: 1 µl DNase I Reaction Puffer(10x) 1 µl DNase I	15 min bei RT
First-strand (3 µl/Probe)	Master-Mix aus: 1 µl EDTA (25mM) 1 µl Randomprimer (250ng) 1 µl dNTP-Mix (10mM)	5 min bei 65 °C Kühlung bei 4 °C
First-strand (7 µl/Probe)	Master-Mix aus: 4 µl 5x First-strand Puffer 2 µl DTT (0,1 M) 1 µl RNase-freies Wasser	2 min bei 37 °C Temp. bei 25 °C halten
M-MLV-RTase (1 µl/Probe)	1 µl M-MLV-Reversetranskriptase	10 min bei 25 °C 50 min bei 37 °C 15 min bei 70 °C

4.2.5.3 Quantitative PCR

Untersucht wurde die mRNA-Expression der kardialen Marker-Gene Mlc2a und Mlc2v mittels qPCR. Als *Housekeeping* Gen wurde Polymerase 2a (Poly2a) verwendet. Zusammenfassend beschrieben erfolgte die PCR nach einem SYBR Green Quantitative PCR Protokoll. Es wurde der folgende Mastermix aus *SYBR Green I Dye qPCR mix* (4.1.7) angesetzt.

Reagenz	Konzentration	Volumen pro 20 μ l Lösung
qPCR mix (<i>SYBR Green I</i>)	1x	10 μ l
Forward primer	0,45 μ M	0,9 μ l
Reverse primer	0,45 μ M	0,9 μ l
DNase-freies Wasser	-	7,2 μ l
cDNA-Probe	-	1 μ l

Die Fluoreszenz gekoppelte qPCR erfolgte nach den folgenden Schritten innerhalb von 39 Zyklen durch den RotorGene Q 5Plex HRM Cyclor (4.1.1).

Schritt	Inkubation
Initiale Denaturierung	2 min bei 94 °C
Denaturierung	15 s bei 94 °C
Annealing, Elongation und Fluoreszenz-Messung	1 min bei 60 °C

4.2.5.4 Auswertung

Die Fluoreszenzstärke von SYBR Green I wurde nach jedem Zyklus automatisch gemessen. Die durch den Cycler ermittelten *Cycle Threshold*-Werte (CT) wurden aus der RotorGene Q Software kopiert und nach Microsoft Excel übertragen. Unter Zuhilfenahme der *gepoolten* Probe und des *Housekeeping*-Gens Poly2a wurde an Hand der folgenden Formeln die mRNA-Expression von Mlc2a und Mlc2v nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode von Livak und Schmittgen (2001) quantifiziert.

$$\Delta CT = CT_{\text{target-gen}} - CT_{\text{housekeeping-gen}}$$

$$\Delta\Delta CT(n) = \Delta CT_{\text{Probe (n)}} - \Delta CT_{\text{Referenz (gepoolte Probe)}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

CT=Cycle Threshold

4.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und Graphpad Prism 7 Software. Die einzelnen Experimente wurden pro Passage (mindestens $n = 3$) dreimal wiederholt und aus deren Ergebnissen für jede Passage ein Mittelwert gebildet, diese Werte bildeten die Grundlage für die statistische Auswertung. Die Mittelwerte der unterschiedlichen Passagen (mindestens $n = 3$) wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Unter der Voraussetzung einer Normalverteilung wurde aus diesen passagebezogenen Werten Mittelwerte gebildet und mittels ungepaartem T-Test mit Welsch Korrektur (bei Vorliegen von unterschiedlichen Varianzen) miteinander verglichen. Bei nicht Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte die Analyse mittels Mann-Whitney-Test. Das Signifikanz Niveau wurde bei einem p-Wert $<0,05$ festgelegt.

In den Abbildungen sind die Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) abgebildet. Im Text sind, sofern nicht anders beschrieben, die MW \pm SD angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Zellkultur

5.1.1 Schlaganalyse der ausplattierten *Embryoid Bodies*

Um den Differenzierungsgrad der unterschiedlich kultivierten *EBs* zu ermitteln, wurden ab Tag 6 des Differenzierungszeitstrahls die *EBs* täglich auf ihr Schlagverhalten hin untersucht. Abb. 10 zeigt, dass die im Kompletmedium kultivierte Kontrollgruppe ab Tag 7 anfängt, schlagende Areale vorzuweisen. Der Anteil der *EBs* mit schlagenden Arealen nimmt über die nächsten vier Tage zu und erreicht dann ein Plateau. Zu diesem Zeitpunkt konnten bei durchschnittlich 72,0 % aller *EBs* schlagenden Areale beobachtet werden (Abb.10). Dieser Zeitraum ist für die nachfolgenden Versuche mit *Res.* und den Signalwegblockern relevant. Darüber hinaus wurden die schlagenden *EBs* auch auf ihre Schlagfrequenz hin untersucht. Es zeigte sich unter allen Inkubationsbedingungen eine Schlagfrequenz, welche im Verlauf des Zeitstrahls leicht anstieg, von ca. 70-80 Schläge pro Minute (Anhang Abb. 37). Unter Inkubation mit 50 μM *Res.* konnte man bereits an Tag 6 (22,0 %) und auch an Tag 7 und 8 einen signifikant ($p = 0,0002, 0,006, 0,03$) größeren Anteil an schlagenden *EBs* ausmachen. An Tag 10 schlugen nahe zu 100 % der untersuchten *EBs*.

Durch die zusätzliche Inkubation mit Signalwegblockern wurde im Weiteren versucht, diesen Effekt von *Res.* auf die *EBs* zu verändern. In Abb. 10 ist zu erkennen, dass durch die zusätzliche Inkubation mit STO-607 bzw. ICI 182 780 der Effekt von *Res.* an Tag 6 bis 8 signifikant verändert wurde (alle $p < 0,05$). Die Zellen ähneln in ihrem Verhalten nun der Kompletmedium-Kontrolle. Es konnten keine schlagenden Areale an Tag 6 beobachtet werden und auch der durchschnittliche Anteil an schlagenden Arealen war zu keinem Zeitpunkt der Beobachtung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht (Abb. 10). Die zusätzliche Inkubation mit EX-527 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den *Res.*-Effekt.

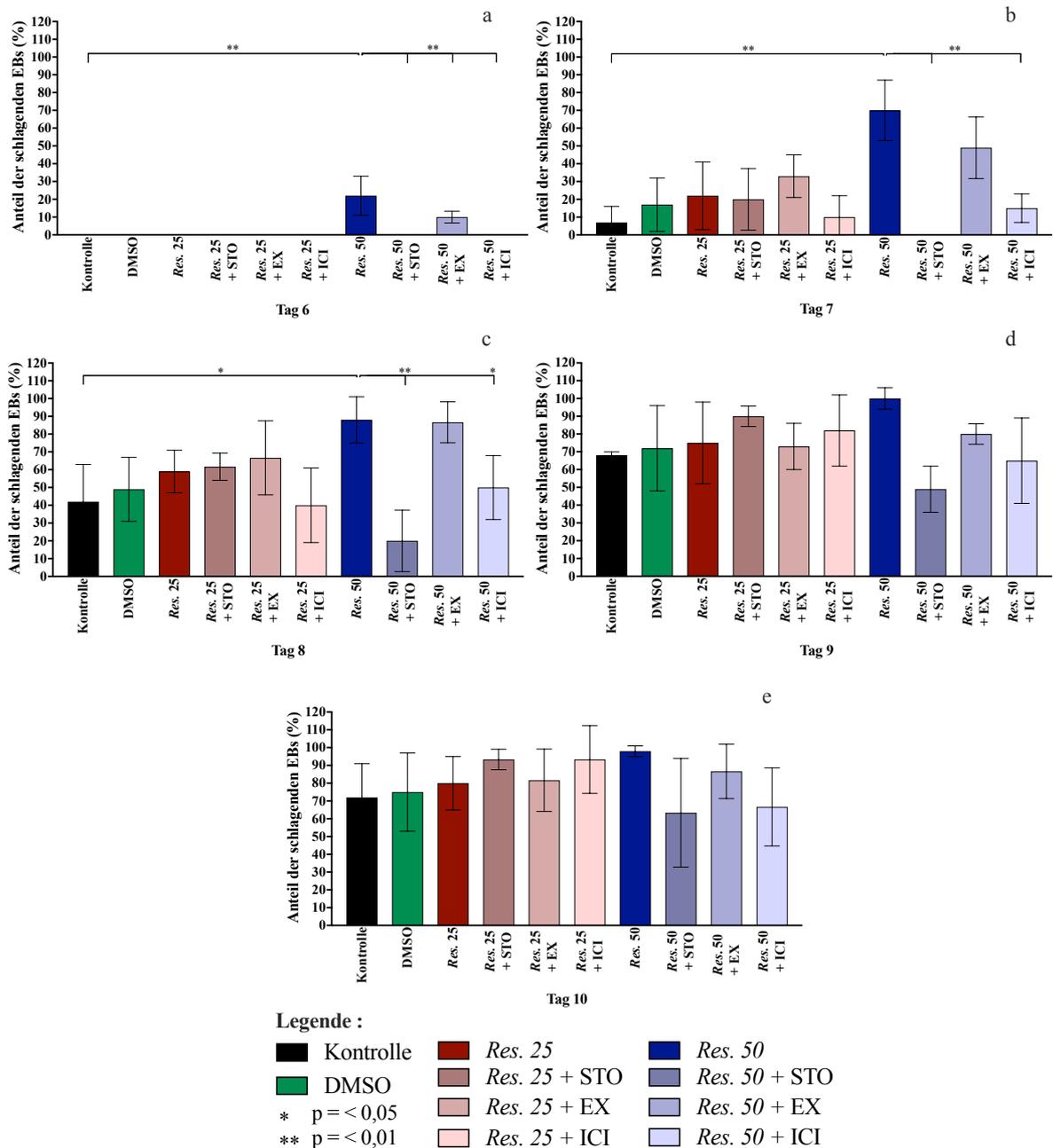


Abb. 10 Schlaganalyse der ausplattierten EBs

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der schlagenden EBs. Es wurden 25 EBs aus jeweils n = 3 Passagen beobachtet und auf das Vorhandensein von schlagenden Arealen überprüft. Gegenübergestellt werden EBs inkubiert mit Zellmedium, der Lösungsmittelkontrolle DMSO, Resveratrol (Res.) 25 µM, Res. 50 µM und Res. 25 bzw. 50 µM plus STO-607 (STO), EX-527 (EX), ICI 182 780 (ICI). Dargestellt sind die MW ± SD aus den drei Passagen mit den korrespondierenden SD an den Tagen 6 (a), 7 (b), 8 (c), 9 (d) und 10 (e) des Differenzierungszeitstrahls.

5.2 Estrogen-Rezeptor Analyse

Um den Zusammenhang zwischen dem *Res.*-Effekt auf Stammzellen und ER besser zu verstehen, wurden die *EBs* mit Hilfe von Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein von ER im Zeitverlauf untersucht. Da vor allem mER im Rahmen dieser Arbeit von Interesse waren wurden Antikörper gegen die drei bekannten Arten von mER eingesetzt: mER α , mER β und GPER. An Tag 5, 6, 7, 8, 10 und 12 des Differenzierungszeitstrahls wurden *EBs* fixiert und gegen diese drei Rezeptor Arten gefärbt. An den gefärbten *EBs* zeigte sich ab Tag 5 ein deutliches Fluoreszenz-Signal aller drei ER-Arten. Diese Fluoreszenz-Signale nahmen ab Tag 6 kontinuierlich ab. Das Fluoreszenz-Signal von ER α war bis Tag 10 am deutlichsten zu erkennen (Abb. 12)

Abb. 11 zeigt Aufnahmen von an Tag 6 dissoziierten Einzelzellen, an denen die Rezeptoren deutlich außerhalb der mit DAPI angefärbten Zellkerne, membranständig sichtbar sind.

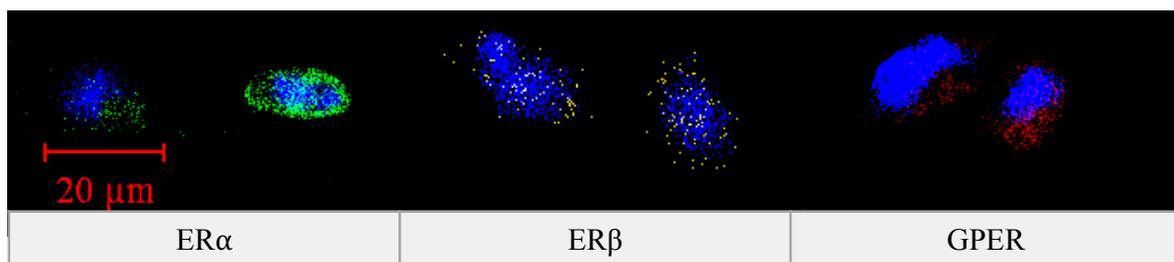


Abb. 11 Immunfluoreszenz gegen ER α , ER β , GPER an nicht permeabilisierten Einzelzellen

Gezeigt sind repräsentative Bilder von an Tag 5 aus *EB's* dissoziierten und an Tag 6 mit PFA fixierten nicht permeabilisierten Einzelzellen. Es erfolgte eine gezielte Immunfluoreszenz-Färbung gegen ER α (grün), ER β (gelb) und GPER (rot). Die sekundäre Färbung erfolgte mit CY3-gekoppelten Antikörpern. Darüber hinaus wurde eine Nucleinsäure-Färbung zur Darstellung der Zellkerne mittels DAPI (blau) verwendet.

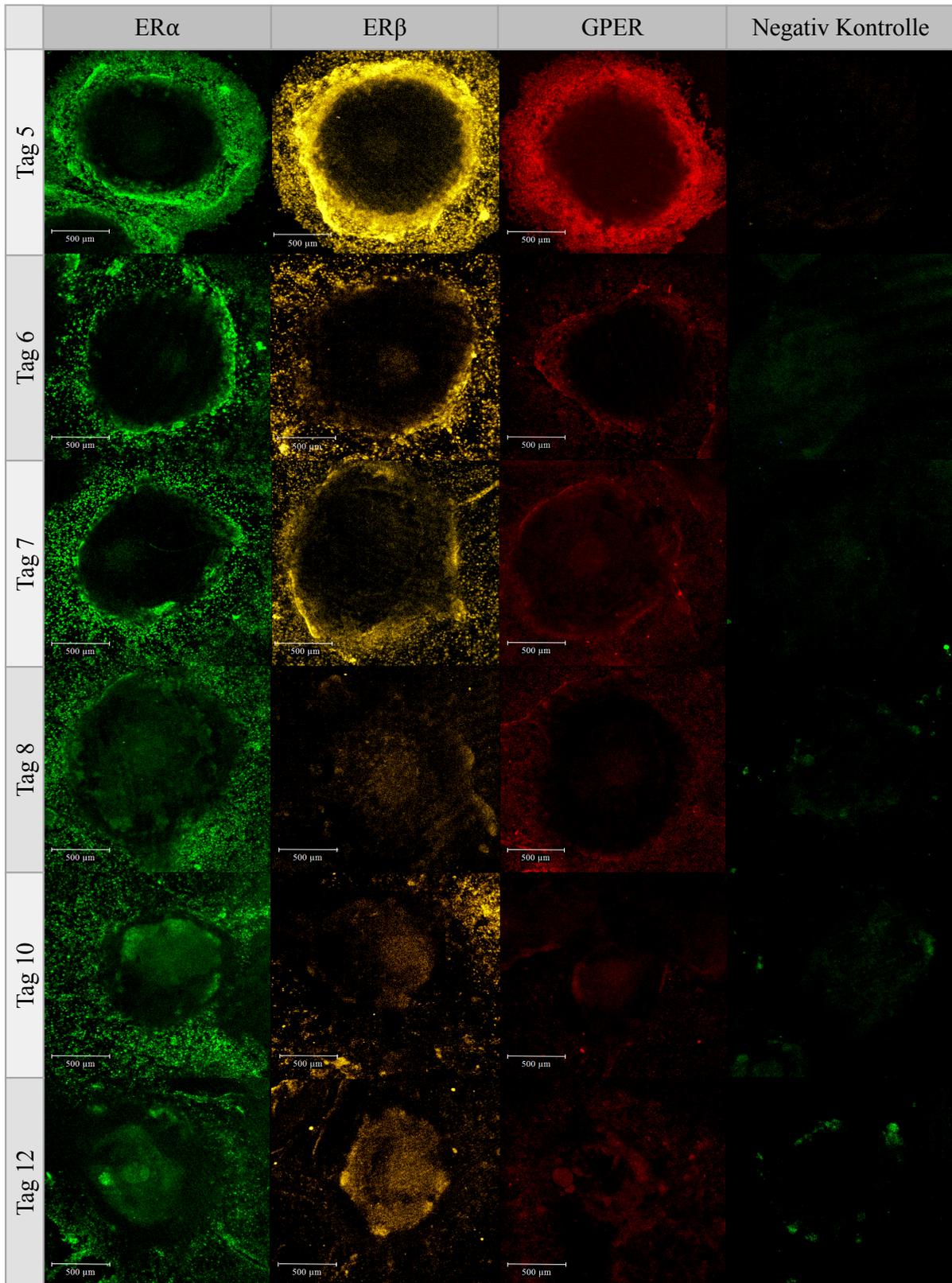


Abb. 12 Immunfluoreszenz gegen ER an ausplattierten *EB*'s im Zeitverlauf

Gezeigt sind repräsentative Bilder von an Tag 4 ausplattierten und an Tag 5, 6, 7, 8, 10 und 12 mit PFA fixierten *EB*s, diese wurden mit spezifischer Antikörperfärbung gegen ER α (grün), ER β (gelb) und GPER (rot) gefärbt. Die sekundäre Färbung erfolgte mit CY3-gekoppelten Antikörpern. Ebenso ist eine repräsentative negativ Kontrolle – nur Färbung mit dem sekundären Antikörper – pro Färbung aufgeführt.

5.3 Ca²⁺-Signal Analyse

Um die Wirkung von *Res.* auf intrazelluläre Ca²⁺-Ströme und deren Rolle im *Res.*-Signalwegnetzwerk besser zu verstehen, wurden an Tag 5 des Differenzierungszeitstrahls Ca²⁺-Signale nach der Zugabe von *Res.* am cLSM510meta® an dissoziierten *EB*-Zellen gemessen. Die Ca²⁺-Signale wurden hinsichtlich maximaler Signalamplitude (I_{\max}), der Zeit bis I_{\max} und der Signaldauer untersucht.

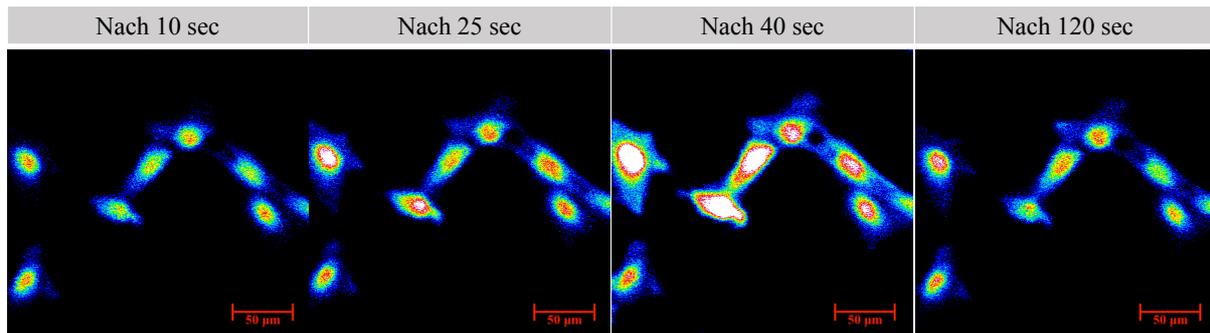


Abb. 13 Ca²⁺-Signale in dissoziierten *EB*-Zellen 10, 25, 40 und 120 Sek. nach *Res.*-Zugabe

Abgebildet sind repräsentative Bilder von dissoziierten *EB*-Zellen, an denen mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie Ca²⁺-Signale darstellbar sind. Man sieht den Beginn der intrazellulären Ca²⁺-Erhöhung ca. 25 Sek. nach der Zugabe von *Res.*, die maximale Signalintensität nach ca. 40 Sek. und die nahezu vollständige Rückbildung des Signals nach 120 Sek..

Im Folgenden sind zunächst die jeweils typischen Veränderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration nach Zugabe von 25 bzw. 50 µM *Res.* im Zeitverlauf dargestellt (Abb. 14, 15). Als Kontrolle diente die Ca²⁺-Signal-Spur nach alleiniger Zugabe von 5 µl DMSO, welches als Lösungsmittel für alle eingesetzten Substanzen diente. So konnte ein deutliches, von der *Res.*-Konzentration abhängiges Ca²⁺-Signal beobachtet werden, das sich aus einem frühen steilen Anstieg und einer darauffolgenden Plateauphase zusammensetzt. Bei Zugabe von *Res.* 50 µM reagierten 69,4% ± 16,5% der Zellen mit einem Ca²⁺-Signal bei Zugabe von *Res.* 25 µM reagierten 12,8% ± 14,1% der Zellen (Abb. 20). Die durchschnittlichen maximalen Signalintensitäten des Ca²⁺-Signals (I_{\max}) lagen bei: DMSO = 185,42 Fluoreszenz-Zählungen; 50µM *Res.* = 1613,46 Fluoreszenz-Zählungen; 25µM *Res.* = 326,84 Fluoreszenz-Zählungen (DMSO vs. 50µM *Res.*: Unterschied = 1428,04 (95% KI: 1225-1717); 50µM *Res.* vs 25 µM *Res.*: Unterschied = 1286,62 (95% KI: 1059-1574)) (Abb. 21). Da die Zellen besonders deutlich nach der Zugabe von 50 µM *Res.* reagierten, wurde im weiteren Verlauf diese Konzentration für die Versuche mit den Signalwegblockern verwendet (Abb. 16, 17).

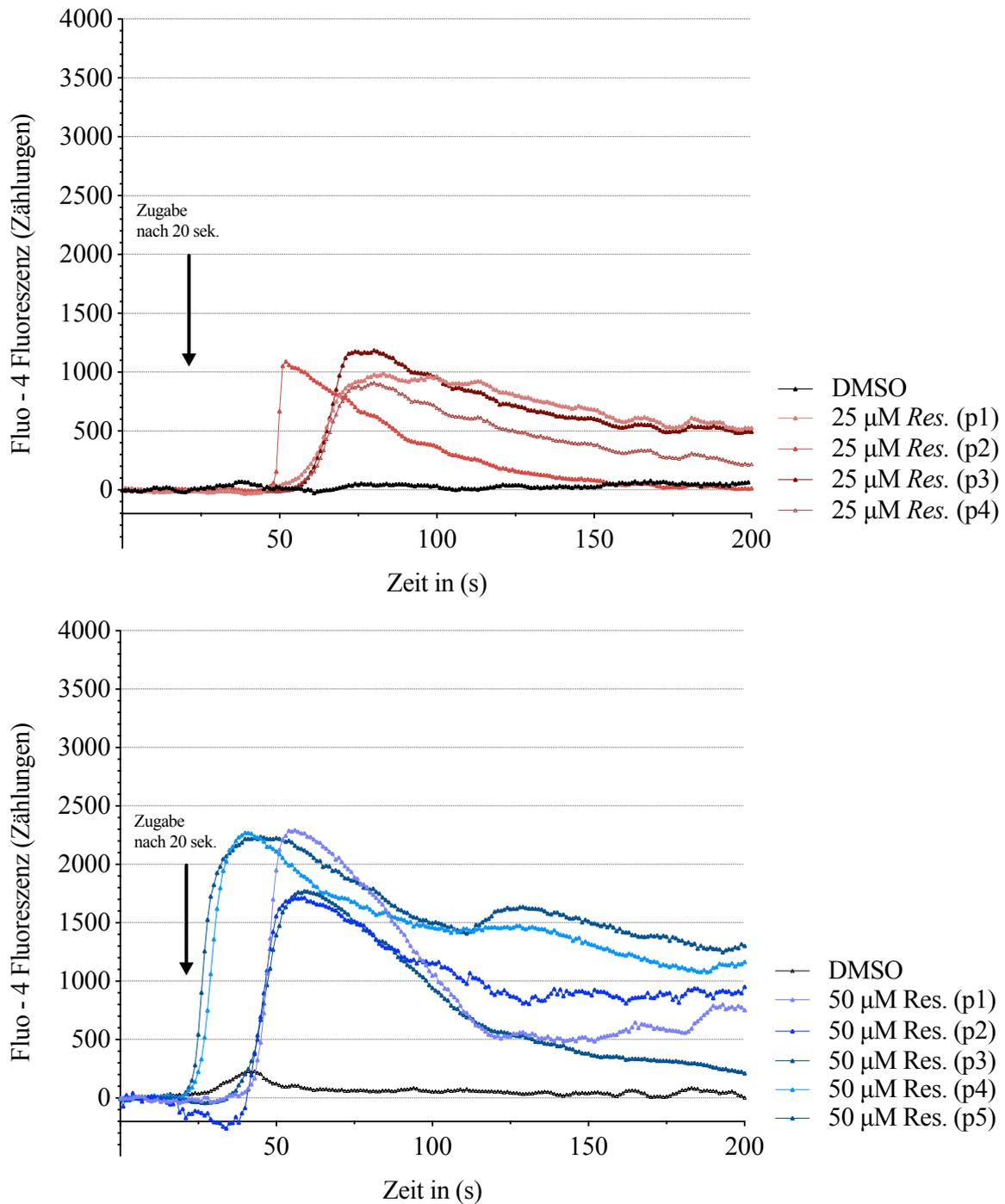


Abb. 14 Ca^{2+} -Signale gemessen an dissoziierten *EBs* nach Zugabe von *Res*.

Dargestellt sind repräsentative Ca^{2+} -Signal-Spuren von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen nach der Zugabe von 25 μM *Res*. (rot) bzw. der Zugabe von 50 μM *Res*. (blau) aus $n = 4$ bzw. $n = 5$ Passagen. Zusätzlich ist jeweils eine Ca^{2+} -Signal-Spur nach alleiniger Zugabe des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle dargestellt (schwarz).

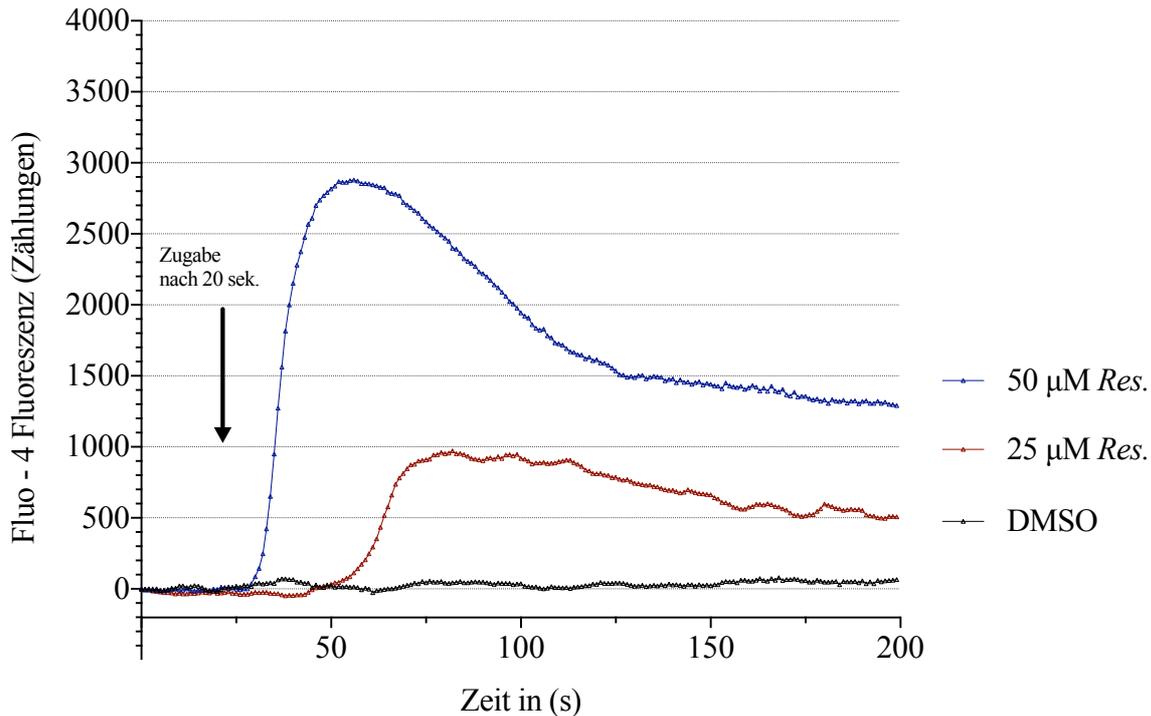


Abb. 15 Ca²⁺-Signale gemessen an dissoziierten EBs nach Zugabe von Res.

Dargestellt ist eine repräsentative Ca²⁺-Signal-Spur von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen nach der Zugabe von 50 µM Res. (blau) verglichen mit der Zugabe von 25 µM Res. (rot). Zusätzlich ist die Ca²⁺-Signal-Spur nach alleiniger Zugabe des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle dargestellt (schwarz).

Ein Teil der im Rahmen dieser Arbeit aufgestellten Vermutungen bezüglich des Res.-Signalwegnetzwerkes ist, dass Res. agonistisch an mER wirkt und so intrazelluläre Signalwege aktiviert. Diese Signalwege können unter anderem den Einstrom von Ca²⁺-Ionen ins Zytoplasma der Zellen bewirken. Um diesen Zusammenhang zu testen, wurden dissoziierte Einzelzellen vor der Zugabe von Res. für zwei Stunden mit den ER-Modulatoren ICI 182 780 und Tamoxifen inkubiert und anschließend wurden Ca²⁺-Signale gemessen. Es zeigte sich, dass das Res.-Ca²⁺-Signal durch die vorangehende Inkubation mit dem Signalwegblocker ICI 182 780 signifikant verändert werden konnte (Abb. 16, 20, 21, 22). Nach vorangehender Inkubation mit ICI 182 780 reagierten nach Zugabe von Res. 50 µM 27,5% ± 14,1% der Zellen (Abb. 20). Die durchschnittliche Intensität von I_{max} wurde durch Ko-Inkubation mit ICI 182 780 von 1613,46 auf 472,03 Fluoreszenz-Zählungen vermindert, dies entspricht einer Verminderung der Intensität von 1141,43 (95% KI: 959-1474)(Abb. 21). Die Zeit bis I_{max} verlängerte sich durch die Inkubation mit diesem Blocker um 154,3 Sek. (95% KI: 134,2-174.5 s) von 33,0 Sek. auf 187,3 Sek. (Abb. 22). Auch die durchschnittliche gemessene Länge der Signale, mit dem definierten Signal Start- und Endpunkt bei I_{max}/e, zeigte eine signifikante Veränderung (Res. = 98,2 Sek. vs. Res. + ICI = 53,6 Sek.). Das Signal

zeigte sich durch die ICI 182 780-Inkubation um 44,6 Sek. verkürzt (95% KI: 27,37-61,9 Sek.) (Abb. 23). (alles $p = < 0,0001$)

Die zusätzliche Inkubation mit Tamoxifen veränderte das Signal nur hinsichtlich der Zeitdauer bis I_{\max} . Es zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Zeit bis I_{\max} um 97,07 Sek. (95%KI: 74,23 Sek. – 119,9 Sek.) ($p = < 0,0001$) (Abb. 17, 20, 22, 23). Außerdem wurde untersucht, ob die alleinige Zugabe von ICI 182 780 und Tamoxifen eine Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt. Hier bei zeigte sich, dass es bei der Zugabe von Tamoxifen zu einer deutlichen Ausbildung eines Ca^{2+} -Signals kam. Durch die Zugabe von ICI 182 780 kam es zu keiner bedeutenden Ca^{2+} -Signal-Aktivität (I_{\max} : Tamox = 1752,10; ICI = 260,10). (Abb. 18, 20)

Die Lösungsmittelkontrolle mit DMSO zeigte durchweg keine bedeutende Ca^{2+} -Signal-Aktivität (Abb.16 - Abb. 20). Durch die Zugabe von $10\mu\text{M}$ ADP konnte ein ähnliches Ca^{2+} -Signal unter allen Inkubationsbedingungen gezeigt werden und fungiert somit als positiv Kontrolle (Abb. 19).

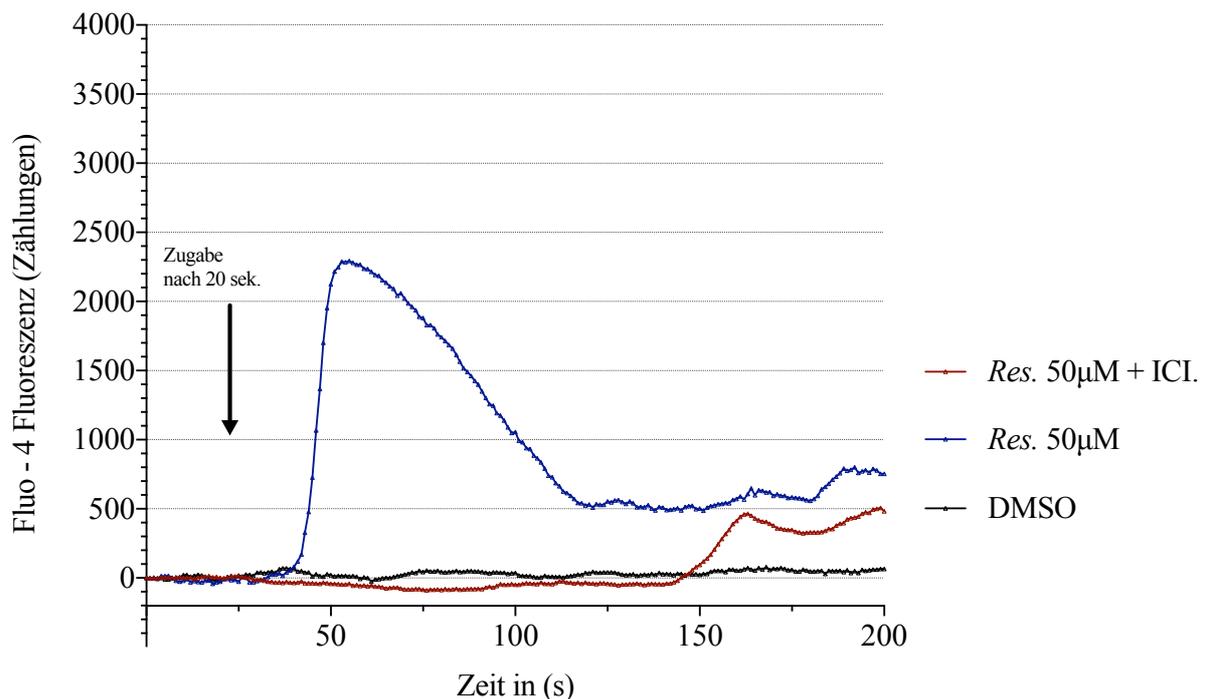


Abb. 16 Ca^{2+} -Signale gemessen an dissoziierten EBs (Res. 50 vs. Res. 50 + ICI 182 780)

Dargestellt ist eine repräsentative Ca^{2+} -Signal-Spur von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen, die zuvor mit ICI 182 780 inkubiert worden waren, nach der Zugabe von $50\mu\text{M}$ Res. (rot) verglichen mit der alleinigen Zugabe von $50\mu\text{M}$ Res. ohne ICI-Inkubation (blau). Ein Anteil von 95 % der betrachteten Zellen aus $n = 3$ Passagen reagierte nach ICI-Inkubation und der Zugabe von Res. auf diese Art und Weise. Zusätzlich ist die Ca^{2+} -Signal-Spur nach alleiniger Zugabe des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle dargestellt (schwarz).

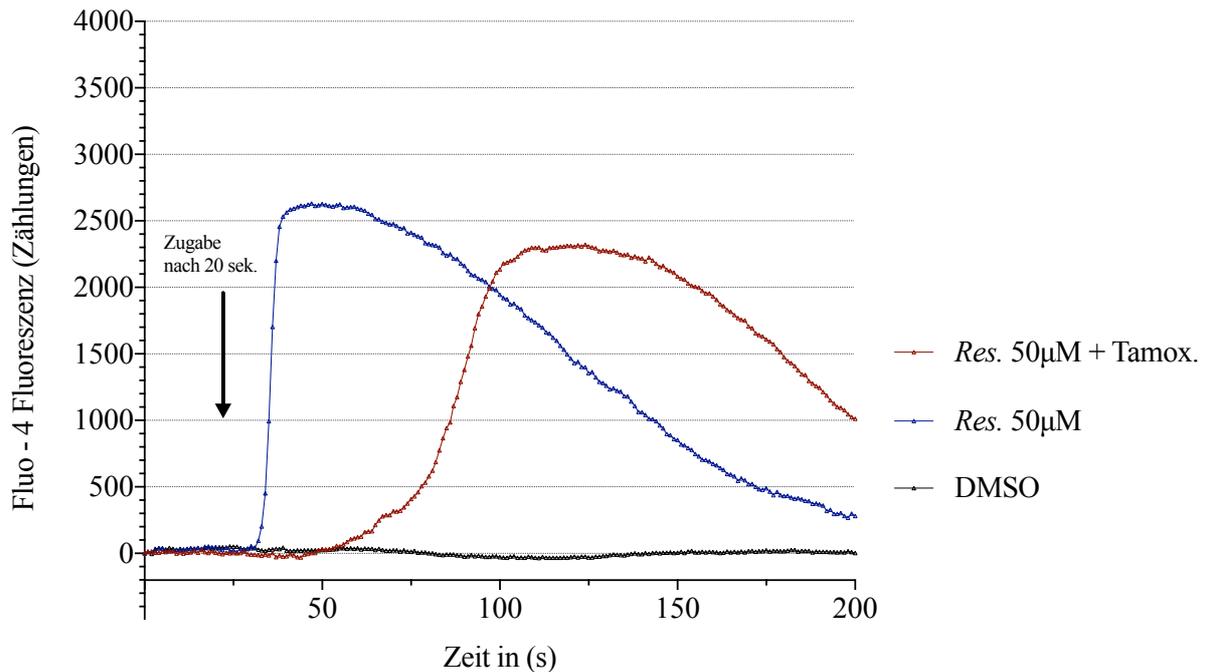


Abb. 17 Ca^{2+} -Signale gemessen an dissoziierten EBs (*Res. 50* vs. *Res. 50 + Tamoxifen*)

Dargestellt ist eine repräsentative Ca^{2+} -Signal-Spur von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen, die zuvor mit Tamoxifen inkubiert worden waren, nach der Zugabe von 50 μM *Res.* (rot) verglichen mit der alleinigen Zugabe von 50 μM *Res.* ohne Tamox-Inkubation (blau). Ein Anteil von 60 % der betrachteten Zellen aus $n = 3$ Passagen reagierte nach Tamox-Inkubation und der Zugabe von *Res.* auf diese Art und Weise. Zusätzlich ist die Ca^{2+} -Signal-Spur nach alleiniger Zugabe des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle dargestellt (schwarz).

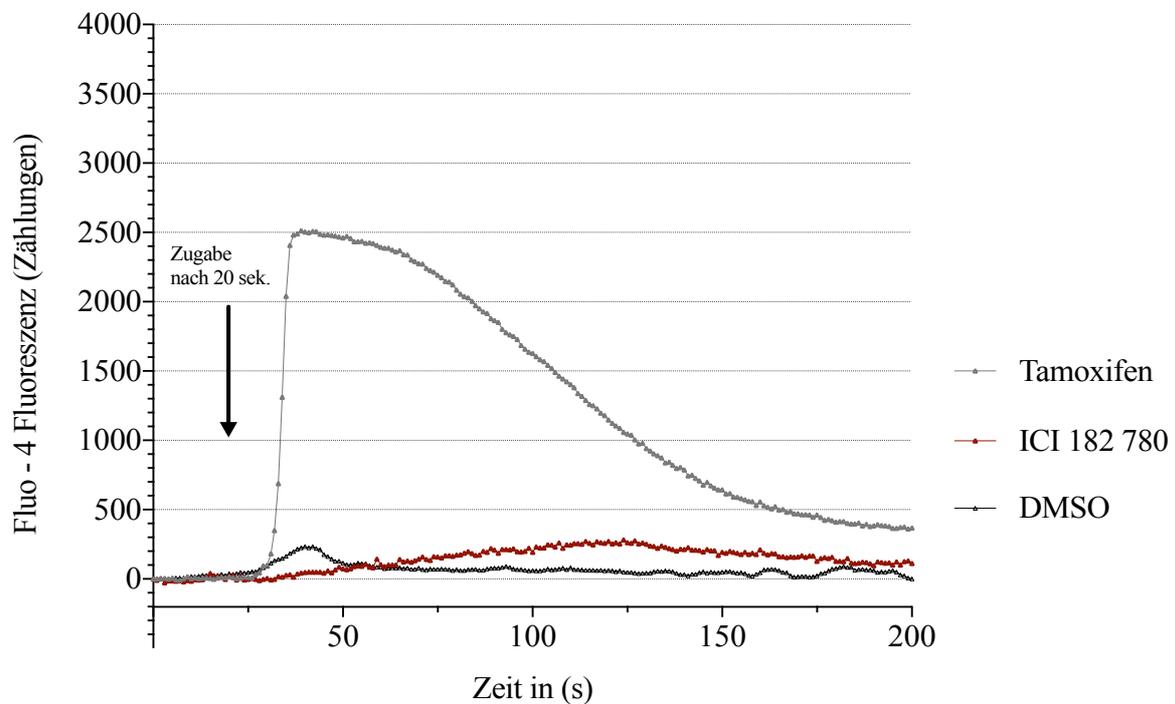


Abb. 18 Ca^{2+} -Signale gemessen an dissoziierten EBs (*ICI 182 780* vs. *Tamoxifen*)

Dargestellt ist eine repräsentative Ca^{2+} -Signal-Spur von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen nach der Zugabe von 1 μM Tamoxifen (grau) verglichen mit der Zugabe von 0,3 μM ICI 182 780 (rot). Ein Anteil von 40 % der betrachteten Zellen aus $n=3$ Passagen reagierte nach der Zugabe von Tamoxifen auf diese Art und Weise. Zusätzlich ist die Ca^{2+} -Signal-Spur nach alleiniger Zugabe des Lösungsmittels DMSO als Kontrolle dargestellt (schwarz).

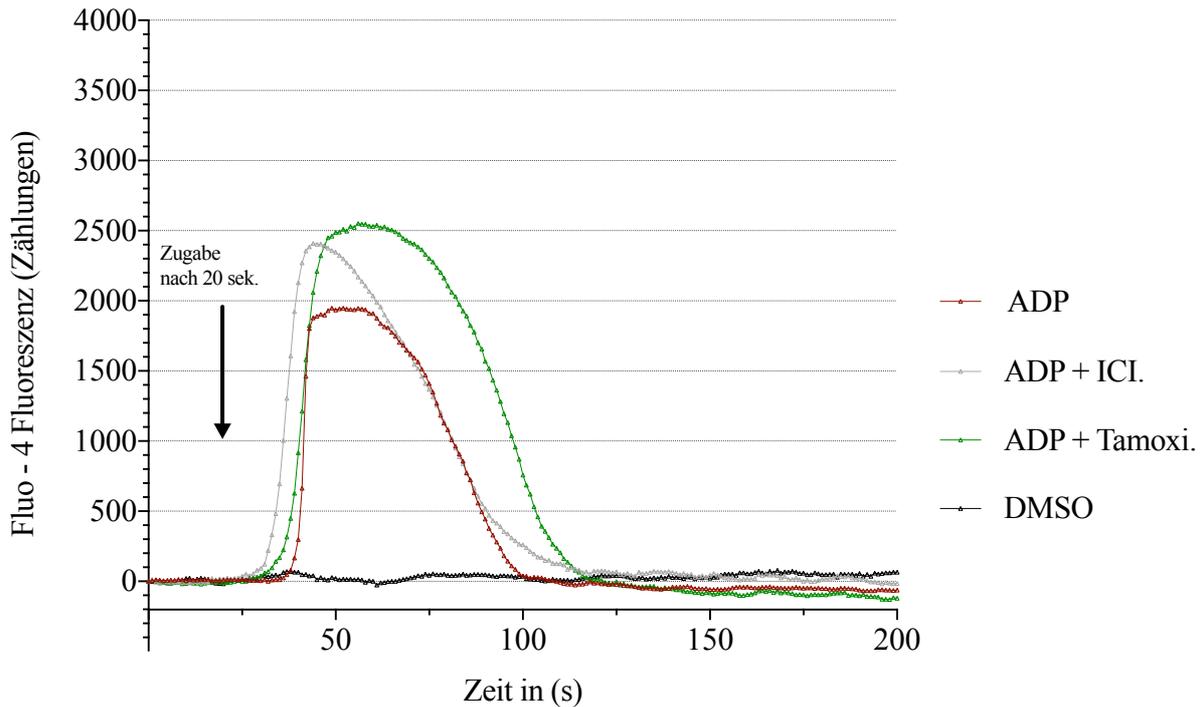


Abb. 19 Positiv Kontrolle mit 10 μM ADP

Dargestellt ist eine repräsentative Ca^{2+} -Signal-Spur von an Tag 5 dissoziierten CGR8 Stammzellen nach der Zugabe von von 10 μM ADP, welches als Positiv-Kontrolle für die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen diente. Die Positiv-Kontrolle wurde sowohl ohne vorherige Inkubation, als auch an zuvor mit ICI 182 780 und mit Tamoxifen inkubierten Zellen durchgeführt.

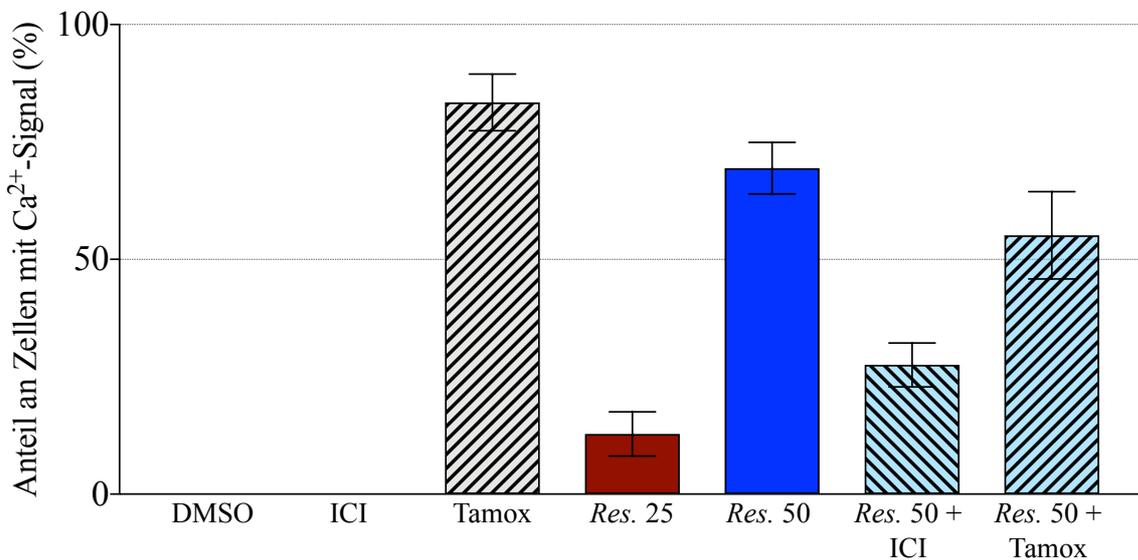


Abb. 20 Anteil an Zellen mit Ca^{2+} -Signal

Dargestellt ist der durchschnittliche Anteil an Zellen die mit einem Ca^{2+} -Signale reagieren nach Zugabe von DMSO, ICI 182 780, Tamoxifen, 25 μM und 50 μM Res. (mit und ohne vorangehender ICI-/ Tamox-Inkubation). Die Werte stellen die MW \pm SEM aus n = 3 bzw. n = 5 Passagen dar.

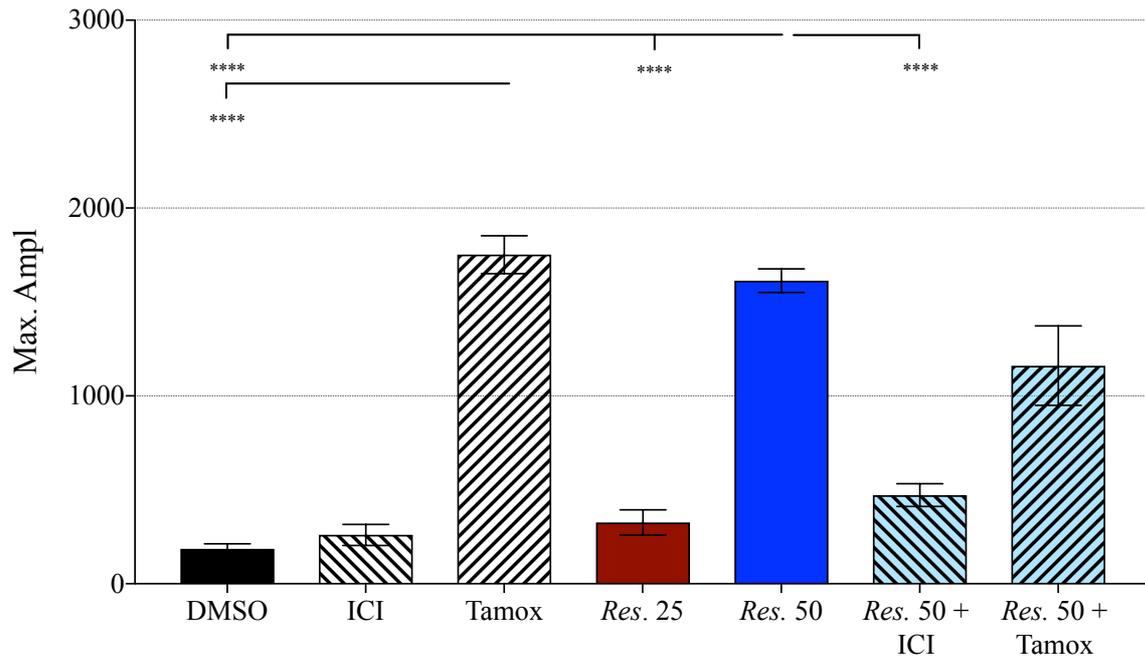


Abb. 21 Vergleich der maximalen Signalamplituden

Dargestellt sind die durchschnittlichen maximalen Signalamplituden ($I_{max} - I_{t0}$) der Ca^{2+} -Signale nach Zugabe von DMSO, ICI 182 780, Tamoxifen, 25 μM und 50 μM Res. (mit und ohne vorangehender ICI-/ Tamox-Inkubation). Die Werte stellen die MW \pm SEM aus n = 3 bzw. n = 5 Passagen dar.

**** p < 0,0001

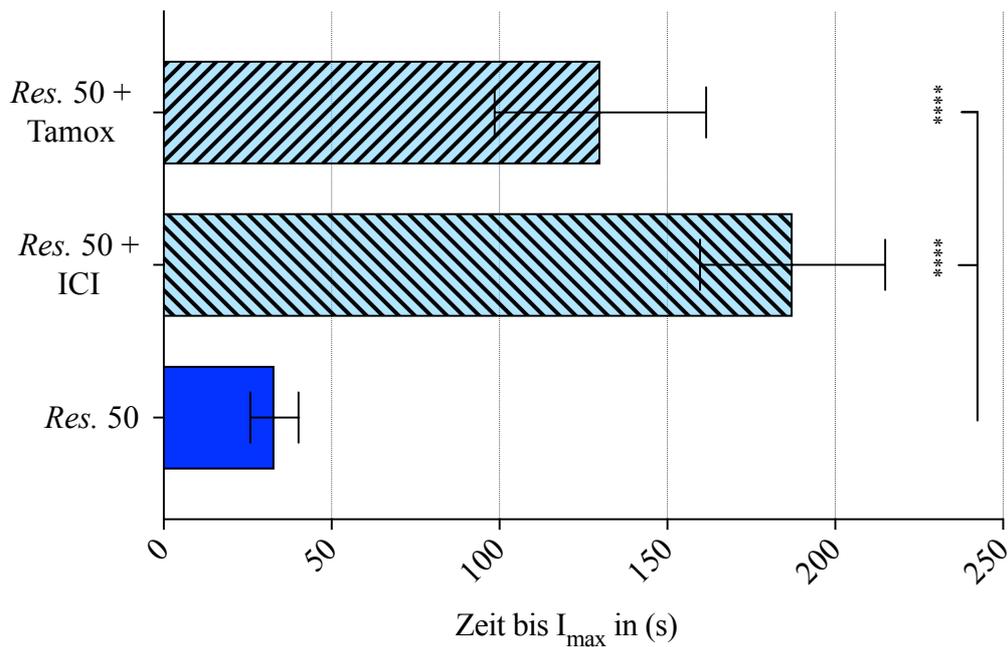


Abb. 22 Vergleich der Zeit bis zur maximalen Signalintensität

Dargestellt ist die durchschnittliche Zeitdauer nach Zugabe von Res. bis zur maximalen Signalintensität. Verglichen werden die Werte mit und ohne vorangehende Inkubation mit ICI 182 780 bzw. Tamoxifen.

Die Werte stellen die MW \pm SD aus n = 3 bzw. n = 5 Passagen dar.

**** p < 0,0001

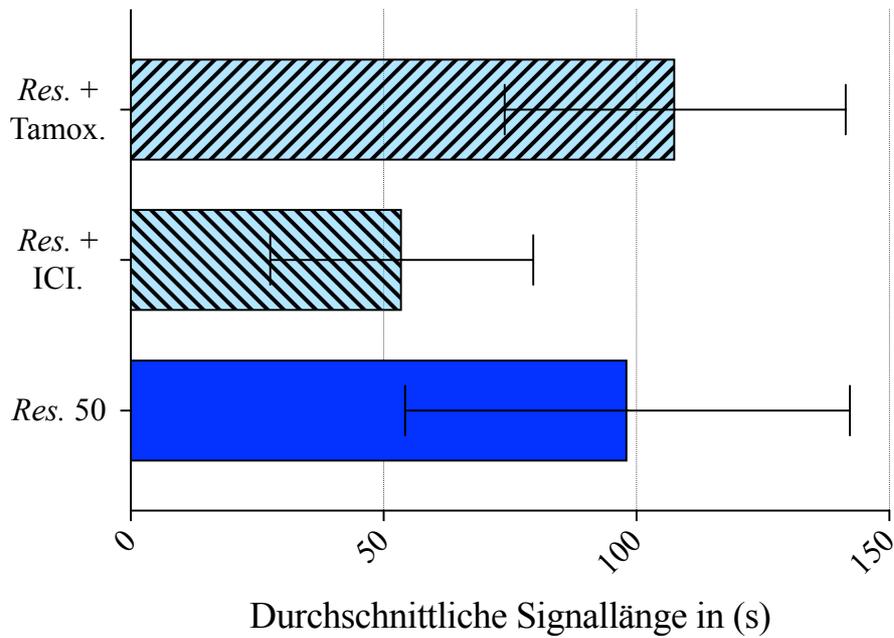


Abb. 23 Vergleich der durchschnittlichen Signallänge

Dargestellt ist die durchschnittliche Zeitdauer der Ca²⁺-Signale nach Zugabe von Res. (Anfang und Ende des Signals wurden bei I_{max}/e festgelegt.) Verglichen werden die Werte mit und ohne vorangehende Inkubation mit ICI 182 780 bzw. Tamoxifen.

Die Werte stellen die MW ± SD aus n = 3 bzw. n = 5 Passagen dar.

**** p = <0,0001

5.4 Aktivitätsanalyse der AMPK

5.4.1 Inkubation mit *Resveratrol*

Durch die Phosphorylierung der α -Untereinheit der AMPK wird diese aktiviert. Um darzustellen, dass *Res.* diesen Prozess fördert und welcher Signalweg hierbei eine Rolle spielt, wurden von ausplattierten *EBs* 24 h nach Beginn der *Res.*- und Signalwegblocker-Inkubation Proteine isoliert und die pAMPK mittels Western Blot dargestellt. Nach erfolgreicher Darstellung der pAMPK wurden die Blot-Membranen von jeglichen Antikörperbindungen *gestrippt* und anschließend die Expression der unphosphorylierten/inaktiven AMPK untersucht.

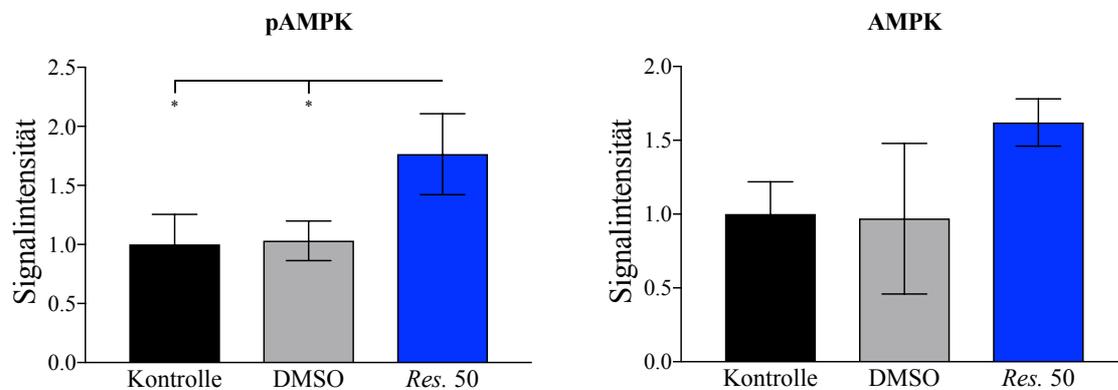


Abb. 24 Aktivitätsanalyse der pAMPK und AMPK

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24 h mit *Res.* 50 μ M und der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolation mit anschließendem spezifischem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr172). Daraufhin wurde die Western Blot-Membran gestrippt und es folgte die spezifische Darstellung der AMPK. Dargestellt sind die MW \pm SD aus n = 4 Passagen, gebildet aus den relativen Werten der Signalintensität der Western Blot-Bande von pAMPK (*links*) und AMPK (*rechts*). Die einzelnen Werte ergeben sich durch den Bezug der jeweiligen Protein-Bande auf die Signalintensität der korrespondierenden Kontrollprobe. Die Werte wurden durch die Relation mit dem *Housekeeping* Protein GAPDH vergleichbar gemacht.

Die AMPK zeigte nach 24 h Inkubation mit 50 μ M *Res.* eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber der Komplettmediumkontrolle (Abb. 24). Auch in Bezug auf die Inkubation mit reinem Lösungsmittel erhöhte sich die Intensität der pAMPK (+ 0,73 \pm 0,22 (p = 0,046)). Darüber hinaus war auch die gesamt Expression der AMPK, Summe aus AMPK und pAMPK, signifikant unter der Inkubation mit *Res.* gegenüber den Kontrollgruppen erhöht (Abb. 25).

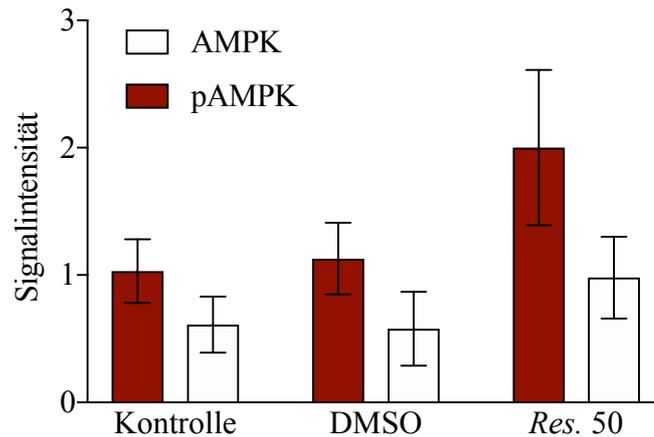


Abb. 25 Absolute Signalintensität

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24 h mit *Res.* und der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolierung mit anschließendem spezifischem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr172). Daraufhin wurde die Western Blot-Membran gestriipt und es folgte die spezifische Darstellung der AMPK.

Dargestellt sind die MW \pm SD aus $n = 4$, gebildet aus den absoluten Werten der Signalintensität der Western Blot-Banden von pAMPK (rot) und AMPK (weiß). Die Werte wurden durch die Relation mit dem *Housekeeping* Protein GAPDH vergleichbar gemacht.

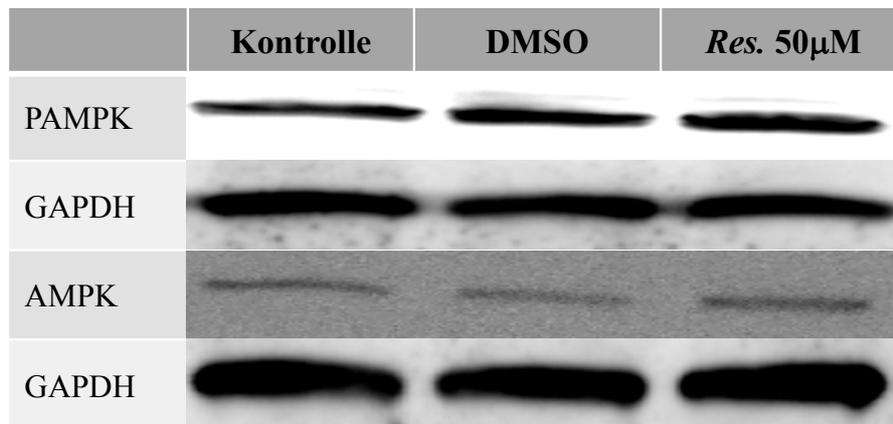


Abb. 26 Western Blot gegen pAMPK, AMPK und GAPDH

Abgebildet sind Proteinbanden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 62 kDa (pAMPK) und 37 kDa (GAPDH) entstammen aus Proben, die an Tag 5 aus *EBs* isoliert und mithilfe der Western Blot-Methode und spezifischen Antikörpern dargestellt worden sind. Nach der Analyse der pAMPK wurde die Western Blot-Membran gestriipt und anschließend die Proteinbande der AMPK (Molekulargewicht 63 kDa) mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. Die GAPDH Bande spiegelt die Expression dieses *Housekeeping*-Proteins wider und wurde für die Vergleichbarkeit der Banden genutzt.

5.4.2 Inkubation mit *Resveratrol* und Signalwegblockern

Zur Entschlüsselung des Signalweges, der zu einer Aktivitätserhöhung der AMPK nach 24 h Inkubation mit *Res.* geführt hatte, wurden dieselben Analysen wie in 5.4.1 dargestellt erneut mit zusätzlicher Inkubation mit den Signalwegblockern STO 607, EX 527 und ICI 182 780 durchgeführt.

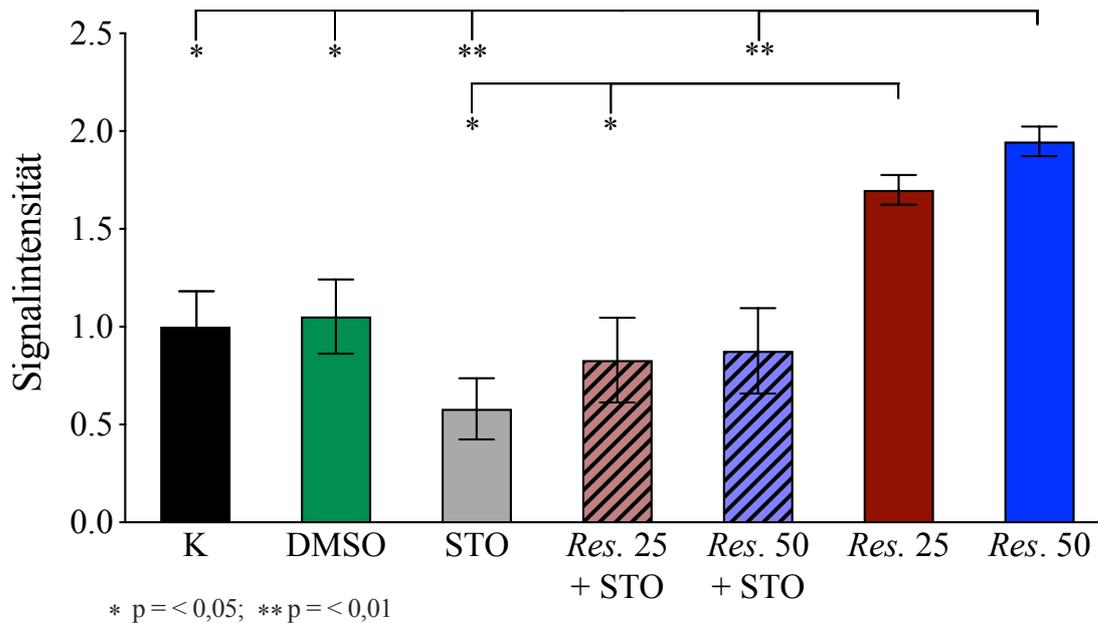


Abb. 27 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h *Res.*- und STO-607- Inkubation

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24 h mit *Resveratrol* (*Res.*), STO-607 (STO) und der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMPK (pAMPK P-Thr172).

Dargestellt sind die MW \pm SEM der prozentualen Aktivität der pAMPK-Bande im Verhältnis zur Komplettmedium-Kontrolle aus n = 4 unabhängigen Passagen.

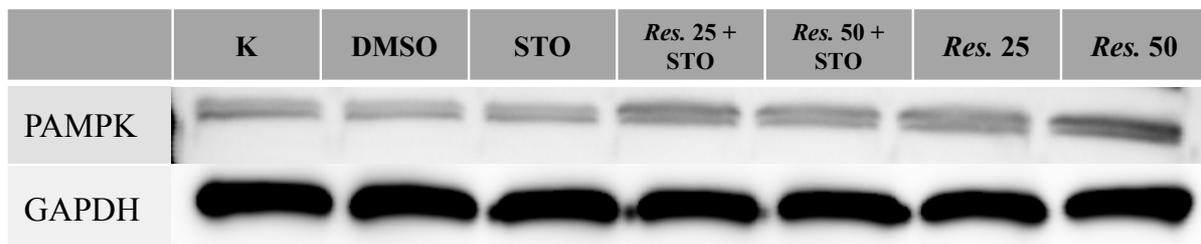


Abb. 28 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH

Abgebildet sind Proteinbanden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 62 kDa (pAMPK) und 37 kDa (GAPDH) entstammen aus Proben, die an Tag 5 aus *EBs* isoliert worden sind und mithilfe der Western Blot-Methode und spezifischen Antikörpern dargestellt worden sind. Die GAPDH-Bande spiegelt die Expression dieses *Housekeeping*-Proteins wider und wurde für die Vergleichbarkeit der Banden genutzt.

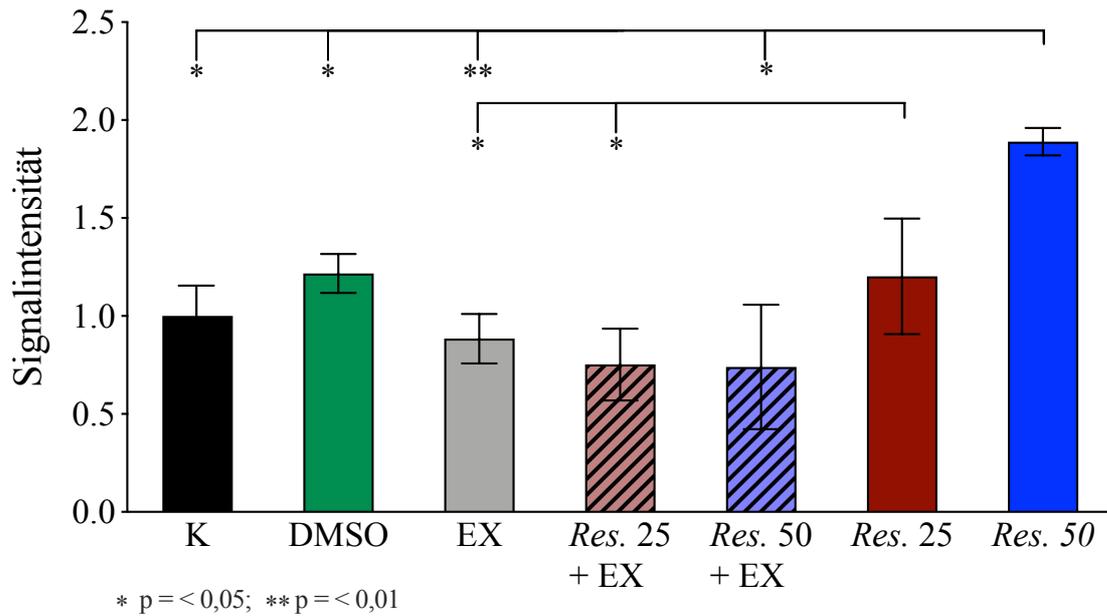


Abb. 29 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h Res.- und EX-527-Inkubation

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24 h mit *Res.*, EX-527 und der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr172).

Dargestellt sind die MW \pm SEM der prozentualen Aktivität der pAMPK-Bande im Verhältnis zur Komplettmedium-Kontrolle aus n = 4 unabhängigen Passagen.

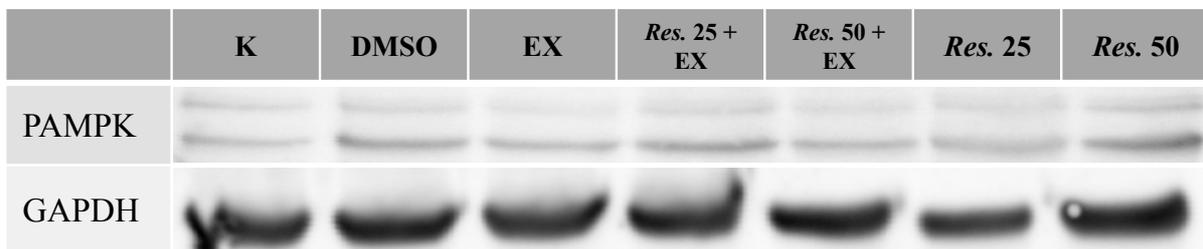


Abb. 30 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH

Abgebildet sind Proteinbanden Banden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 62 kDa (pAMPK) und 37 kDa (GAPDH) entstammen aus Proben, die an Tag 5 aus *EBs* isoliert worden sind und mithilfe der Western Blot-Methode und spezifischen Antikörpern dargestellt worden sind. Die GAPDH-Bande spiegelt die Expression dieses *Housekeeping*-Proteins wider und wurde für die Vergleichbarkeit der Banden genutzt.

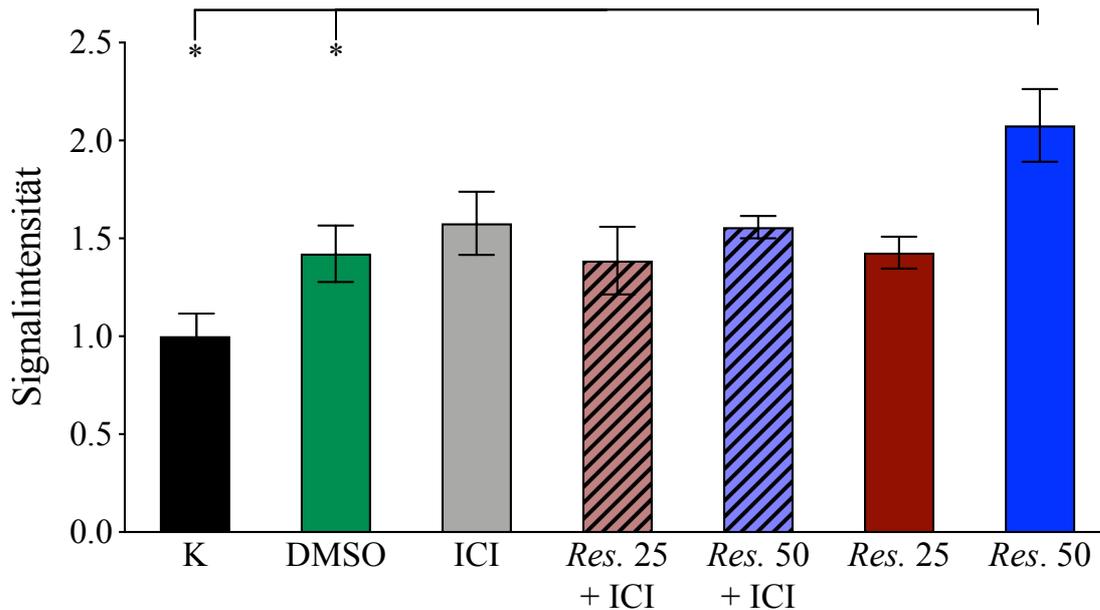


Abb. 31 pAMPK-Kinase Aktivität nach 24 h Res.- und ICI 182 780 - Inkubation

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24h mit Res., ICI 182 780 und der Lösungsmittelkontrolle behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr172).

Dargestellt sind die MW \pm SEM der prozentualen Aktivität der pAMPK-Bande im Verhältnis zur Komplettmedium-Kontrolle aus n = 5 unabhängigen Passagen.

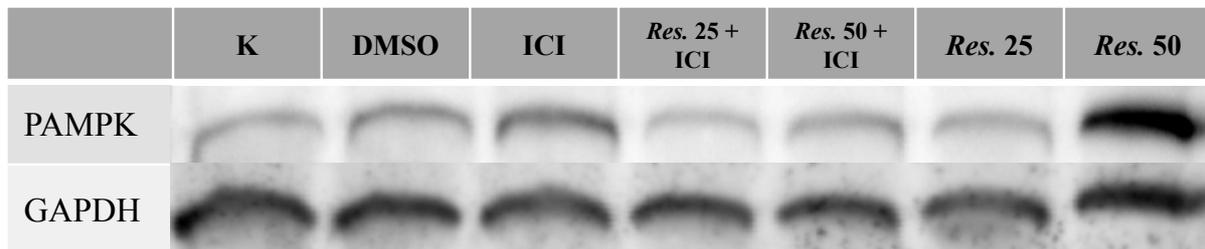


Abb. 32 Western Blot gegen pAMPK und GAPDH

Abgebildet sind Proteinbanden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 62 kDa (pAMPK) und 37 kDa (GAPDH) entstammen aus Proben, die an Tag 5 aus *EBs* isoliert worden sind und mithilfe der Western Blot-Methode und spezifischen Antikörpern dargestellt worden sind. Die GAPDH-Bande spiegelt die Expression dieses *Housekeeping*-Proteins wider und wurde für die Vergleichbarkeit der Banden genutzt.

Durch die zusätzliche Inkubation der Zellen mit STO-607, ICI 182 780 und EX-527 wurde die Aktivitätssteigerung der AMPK durch 50 μ M Res. signifikant vermindert (*Res. 50* vs. *Res. 50* + STO-607: $-1,071 \pm 0,20$ ($p = 0,0033$); *Res. 50* vs. *Res. 50* + EX-527: $-1,150 \pm 0,33$ ($p = 0,02$); *Res. 50* vs. *Res. 50* + ICI 182 780: $-0,5200 \pm 0,19$ ($p = 0,04$)) (Abb. 27, 29, 31).

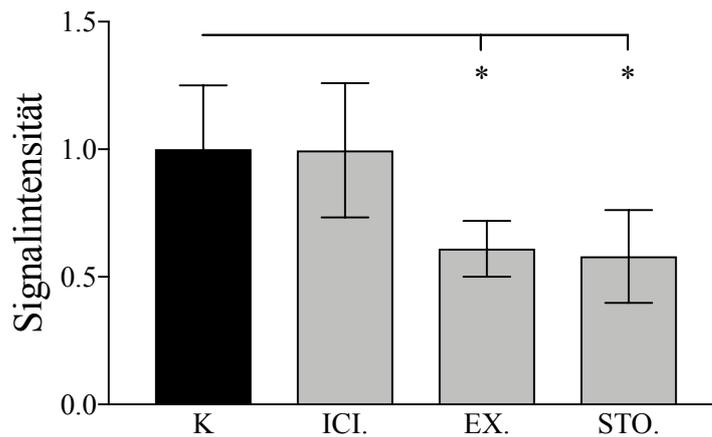


Abb. 33 pAMP-Kinase Aktivität nach 24 h Signalwegblocker-Inkubation

Die *EBs* wurden an Tag 4 ausplattiert und ab Tag 5 für 24 h mit STO-607, EX-527 und ICI 182 780 behandelt. Daraufhin folgte eine Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot gegen die aktivierte Form der AMP-Kinase (pAMPK P-Thr172).

Dargestellt sind die MW ± SD der prozentualen Aktivität der pAMPK-Bande im Verhältnis zur Komplettmedium-Kontrolle aus n = 3 (STO-607, EX-527 und ICI 182 780) unabhängigen Passagen

Durch alleinige Inkubation der Zellen mit den Signalwegblockern EX-527 und STO-607 ließ sich eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant verminderte Signalintensität der pAMPK-Bande nachweisen (beides $p = < 0,5$) (Abb. 33).

5.5 Quantifizierung kardialer Marker

5.5.1 qPCR

Zur Darstellung des Effektes von *Res.* auf die Kardiomyogenese wurden die *EB* Zellen an Tag 12 des Differenzierungszeitstrahls auf objektive kardiale Marker hin untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von ausgewählten Signalwegblocker auf diesen Effekt geprüft. Zum einen wurde zur qPCR Analyse von ventrikulären und atrialen Myosin Leichtketten (MLC2v und MLC2a) RNA isoliert. Darüber hinaus wurden an Tag 12 Proteine zur Western Blot Darstellung der schweren Myosin Kette (MHC) isoliert.

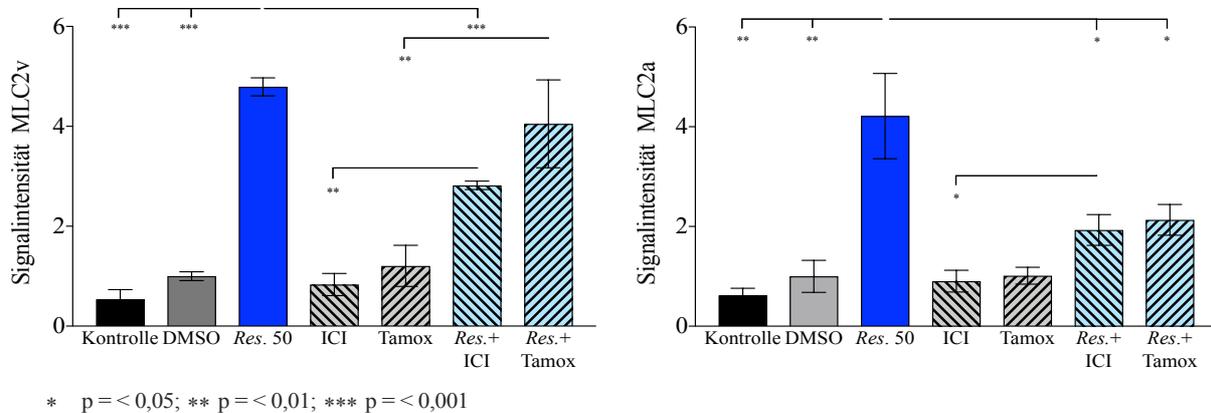


Abb. 34 mRNA Expression der kardialen Marker MLC2v und MLC2a

Die *EBs* wurden ab Tag 5-12 mit *Resveratrol* (*Res.*) 50 μ M und den Estrogenrezeptor-Modulatoren ICI 182 780 (ICI) und Tamoxifen (Tamox) inkubiert. An Tag 12 folgte die RNA-Isolation mit anschließender Herstellung von cDNA und der spezifischen Amplifikation der Gene für MLC2v (*links*) und MLC2a (*rechts*) mittels PCR. Dargestellt sind MW aus n = 3 Passagen \pm SEM. Die einzelnen Werte ergeben sich durch den Bezug der jeweiligen DNA-Amplifikation mit einer *gepoolten* Probe. Die Werte wurden mithilfe des *Housekeeping* Gens Poly2a vergleichbar gemacht.

Mithilfe der qPCR Analyse konnte eine signifikante erhöhte RNA-Expression der MLC2v und MLC2a durch die Inkubation mit *Res.* 50 μ M gegenüber der Lösungsmittelkontrolle dargestellt werden. Die Expression von MLC2v wurde um 3,79 (95%KI: 3,14 – 4,44) und die von MLC2a um 3,22 (95%KI: 3,21 – 0,91) erhöht (beides p = < 0,01).

Diese Expressionssteigerung konnte durch die parallele Inkubation mit dem ER Antagonisten ICI 182 780 signifikant vermindert werden (MLC2v: *Res.* 50 vs. *Res.* 50 + ICI: - 1,97 (95%KI: -2,63 - -1,32); MLC2a: *Res.* 50 vs. *Res.* 50 + ICI: -2,29 (95%KI: -5,52 - -0,95)) (beides p = < 0,05). Die Inkubation mit Tamoxifen führte nur zur einer signifikanten Verminderung der *Res.* vermittelten Expressionssteigerung von MLC2a nicht aber von MLC2v. (Abb. 34)

5.5.2 Western Blot

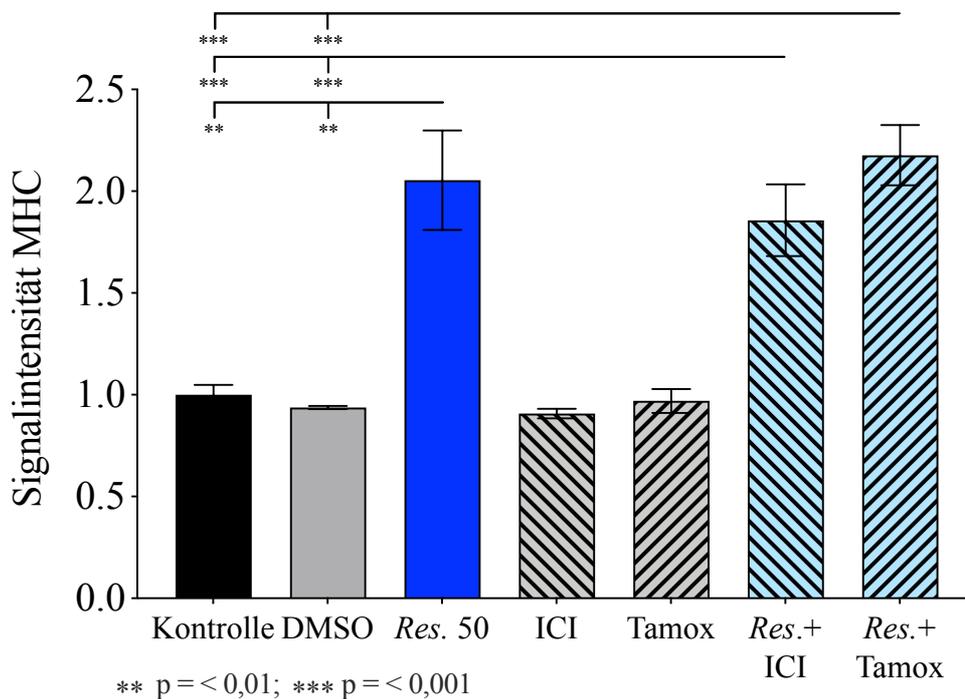


Abb. 35 Protein Expression des kardialen Markers MHC

Die EBs wurden ab Tag 5-12 mit Res. 50 μ M und den Estrogenrezeptor-Modulatoren ICI 182 780 (ICI) und Tamoxifen (Tamox) inkubiert. An Tag 12 folgte die Proteinisolierung mit anschließendem Western Blot gegen den kardialen Marker MHC. Dargestellt sind MW aus n = 3 Passagen \pm SEM. Die einzelnen Werte ergeben sich durch den Bezug der jeweiligen Protein-Bande auf die Signalintensität der korrespondierenden Kontrollprobe. Die Werte wurden mithilfe des *Housekeeping*-Proteins GAPDH vergleichbar gemacht.

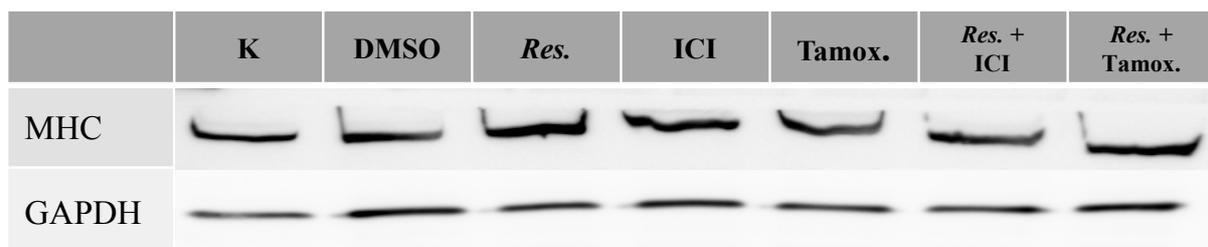


Abb. 36 Western Blot gegen MHC und GAPDH

Abgebildet sind Proteinbanden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 223 kDa (MHC) und 37 kDa (GAPDH) entstammen aus Proben, die an Tag 5 aus EBs isoliert worden sind und mithilfe der Western Blot-Methode und spezifischen Antikörpern dargestellt worden sind. Die GAPDH-Bande spiegelt die Expression dieses *Housekeeping*-Proteins wider und wurde für die Vergleichbarkeit der Banden genutzt.

Anhand der Western Blot Banden ließ sich eine signifikant erhöhte MHC Protein-Synthese unter der Inkubation mit Res. 50 μ M beobachten. Es ließ sich eine Steigerung um $1,05 \pm 0,25$ darstellen ($p = 0,002$). Diese Steigerung der Protein-Synthese wurde durch die parallele Inkubation mit den ER-Modulatoren ICI 182 780 und Tamoxifen nicht signifikant vermindert. (Abb. 36)

6 Diskussion

6.1 Zellkultur und Schlaganalyse der ausplattierten Embryoid Bodies

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESCs) zu Kardiomyozyten ist einer der ersten Prozesse der Organogenese (Dzeja et al. 2011). Um diesen am *Embryoid Body(EB)*-Modell sichtbaren Prozess in Gänze beobachten zu können, wurden *EBs*, die zuvor vier Tage in einer Spinnerflasche kultiviert wurden, auf Zellkulturschalen ausplattiert und dort ab Tag 5 mit den entsprechenden Medien behandelt. Während dieser Phase der Zellkultur war es von immenser Wichtigkeit, auf ein sehr genaues und vorsichtiges Arbeiten zu achten, da schon kleinste Veränderungen in der Temperatur und das Einwirken von Scherkräften Auswirkungen auf die Entwicklung der *EBs* hatten. Im Modell der ausplattierten, adhärenen *EBs* war der Prozess der kardialen Differenzierung durch sich kontrahierende Areale anschaulich zu beobachten. Physiologischer Weise setzt dieser Prozess ungefähr an Tag 8 des Differenzierungszeitstrahls ein (Chen et al. 2010).

Durch die Bestimmung der Anzahl von schlagenden *EBs* und deren Frequenz in Relation zum Differenzierungszeitstrahl unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen konnte der Effekt von *Resveratrol (Res.)* auf die Kardiomyogenese untersucht werden.

Res. beeinflusst undifferenzierte und differenzierte Zellen in unterschiedlicher Weise (Hayakawa et al. 2013) und kann z.B. phänotypischen Veränderungen in Alterungsprozessen bewirken (Park et al. 2012). Vor allem protektive Effekte von *Res.* wurde bereits eingehend untersucht. Es wirkt schützend gegen unterschiedlichste Stressoren wie überschießende Inflammation, vermehrte Radikalbildung und die Toxizität von Zytostatika (Al Dera 2017, McCubrey et al. 2017, Zhang et al. 2019). Zudem ist *Res.* als Aktivator der AMPK bekannt (Park et al. 2012), welche kardiale Differenzierungsprozesse, vermittelt durch Translokation ihrer aktivierten Form in den Zellkern (Dzeja et al. 2011), und kardiales Remodeling positiv beeinflusst (Cieslik et al. 2011, Feng et al. 2018). Diese bereits bekannten Effekte von *Res.* machen es zu einem sehr interessanten Stoff im Kontext der kardialen Differenzierung aus ESCs.

Mit der Methode der Schlaganalyse sollte so der erste Eindruck gewonnen werden, wie sich ESCs der CGR8-Zelllinie unter der Inkubation mit *Res.* verhalten. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Res.* in Konzentrationen zwischen 10 und 75 μM die Überlebensdauer schlagender Areale verlängert, zu einer Generierung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) in der frühen Phasen der *EB*-Entwicklung führt und in höheren Konzentrationen toxisch auf ESCs wirken kann (Mühlbrandt 2018). Neben diesen Effekten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Res.* in einer Konzentration von 50 μM auch schon auf den Beginn der kardialen Differenzierung einen Einfluss hat (Abb.10). So kam es bei *EBs* die ab Tag 5 mit *Res.* behandelt wurden schon ab Tag 6 zur Ausbildung einzelner schlagender Areale. Die mit *Res.* behandelten *EBs* waren auch im weiteren Verlauf in ihrer Entwicklung denen der Kontrollgruppen um ca. 24 h voraus. *Res.* in der niedrigeren Konzentration von 25 μM zeigte diesen Effekt nicht in solch einer ausgeprägten Form (Abb. 10). Daher hat man sich in den darauffolgenden Experimenten primär auf *Res.* in einer Konzentration von 50 μM fokussiert.

Zur Aufschlüsselung des *Res.*-Signalwegnetzwerks wurden in vorliegender Arbeit unter Zuhilfenahme von Signalwegblockern unterschiedliche potentielle Signalwegkomponenten inhibiert. Zu diesen Komponenten zählte die CamKK β , eine direkt mit der AMPK in Verbindung stehende Kinase (Park et al. 2012). Diese wurde durch STO-607 inhibiert. Ebenfalls inhibiert wurde SIRT1 ein Enzym der Histondeacetylase Familie, welches über eine NAD⁺-abhängige Deacetylasereaktion weitere Enzyme aktivieren kann. Zu diesen gehört auch LKB1, eine Kinase die direkt mit der AMPK in Verbindung steht. (Price et al. 2012) SIRT1 wurde durch EX-527 blockiert. Aufgrund seiner morphologischen Ähnlichkeit mit Estrogenen und der nachgewiesenen Interaktion von *Res.* mit Estrogenrezeptoren (ER) (Gehm et al. 1997), wurde außerdem der unspezifische ER-Blocker ICI 182 780 eingesetzt. Dieser inhibiert zum einen nER aber auch mER, welche an schnellen intrazellulären Signalwegen beteiligt sind (Revankar et al. 2005, Luo und Kim 2016).

Durch die Inhibierung der CamKK β durch STO-607 und Inhibierung von ER durch ICI 182 780 bei gleichzeitiger Gabe von *Res.* kam es in beiden Fällen zu keiner vorzeitigen und verstärkten Ausbildung schlagender Areale (Abb. 10). Durch die Inhibierung von SIRT1 mittels EX-527 konnten solche Veränderungen nicht beobachtet werden (Abb. 10). Die Inkubation der *EBs* mit *Res.* und den Signalwegblockern hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Frequenz der schlagenden EBs (Abb. 37).

Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass *Res.* in gewissen Konzentrationen schon im frühen Stadium der Ausdifferenzierung Einfluss auf ESCs und die Kardiomyogenese nimmt. Dies bedeutet, dass durch die Inkubation von *Res.* Signalwege angestoßen werden, die die Transkriptionsprozesse innerhalb einer Stammzelle verändern bzw. die physiologischen Prozesse verstärken oder beschleunigen. Dieser Einfluss scheint zum einen abhängig von der CamKK β und der damit in Verbindung stehenden AMPK zu sein, aber wird zum anderen

auch durch die Blockierung von ER verändert. Ob diese beiden Signalwegkomponenten unabhängig voneinander fungieren oder in einem Netzwerk verbunden sind, wurde in den weiterführenden Untersuchungen betrachtet. Somit traten ins besondere die AMPK und ER in den Fokus der folgenden Experimente.

6.2 Estrogen Rezeptor Analyse

Ein Teil dieser Arbeit stellt die Identifizierung von Signalwegen dar, über welche *Res.* Einfluss auf ESCs nehmen kann. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass *Res.* aufgrund seiner chemischen und strukturellen Eigenschaften mit der Bindungsstelle von ER in Kontakt treten und über diese agonistisch wirken kann. ER sind unterteilbar in nukleäre und zwei unterschiedliche Arten von membranständigen Rezeptoren (Levin 2002). Diese sind zum einen die den nukleären Rezeptoren strukturell ähnlichen mER α/β und zum anderen der mit G-Protein assoziierten Rezeptor GPER. Die Gemeinsamkeit dieser membranständigen Rezeptoren ist, dass sie nicht wie nukleäre Rezeptoren mit der DNA direkt in Kontakt treten, sondern über die Abstoßung schneller Signalweg auf Zellen einwirken. Untersuchungen unterschiedlicher Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass im Zusammenhang von kardialer Differenzierung und Reparaturvorgängen über mER ein positiver Effekt auf Kardiomyozyten ausgeübt wird (Su et al. 2015, Hong et al. 2004). Des Weiteren ist bekannt, dass *Res.* in Zellen das Entstehen eines intrazellulären Ca²⁺-Signals bewirkt (Holm et al. 2013). Die Zusammensetzung dieses polymorphen Signals ist aber noch nicht in Gänze verstanden.

Da die Aktivierung von mER Signalwegkaskaden wie PLC und DAG/IP₃, die u.a. zur Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum führen, anstößt, wurde im Rahmen dieser Arbeit wurde die Vermutung aufgestellt, dass *Res.* mit mER interagiert und solche Signalprozesse in ESCs anstößt (Dominguez et al. 2007).

Um zunächst die Bedeutung von mER in ESCs zu verstehen, wurden die Rezeptoren ER α , ER β und GPER mittels Immunfluoreszenz im Zeitverlauf der Tage 5 – 12 des Differenzierungszeitstrahls dargestellt. Es wurde dabei darauf geachtet, die Zellmembran durch eine vorsichtige Fixierung der Zellen mit PFA weitestgehend unversehrt zu erhalten. So konnte die Expression aller drei Rezeptor Klassen auf den *EB*-Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine besonders intensive Ausprägung des ER α mit einem Expressionsmaximum an Tag 5 und Tag 6 (Abb. 12). Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen des Western Blots, welcher die Expression von ER α in *EBs* an den Tagen 5 und

12 vergleicht (Anhang Abb. 39). Auch in diesem Fall zeigt sich, eine signifikant stärkere Ausprägung des Rezeptors an Tag 5.

Zusammengenommen ergibt sich, dass mER in den für die Kardiomyogenese entscheidenden Tagen im *EB*-Modell exprimiert werden. Besonders ER α scheint so in der Lage zu sein, Einfluss auf frühe Differenzierungsprozesse zu nehmen und den *Res.*-Effekt zu vermitteln. Die Rezeptoren erscheinen vor allem an Tag 5 und 6 des Differenzierungszeitstrahls verstärkt exprimiert zu werden. In Verbindung mit den Ergebnissen früherer Arbeiten, die zeigten, dass *Res.* vor allem in diesem Zeitraum die Generierung von ROS in *EBs* induziert, lässt sich eine mögliche Verbindung dieser zwei Signalwegkomponenten mutmaßen (Mühlbrandt 2018). Die Assoziation zwischen mER und ROS könnte sich dadurch erklären lassen, dass es durch die Aktivierung von mER und folgenden Signalkaskaden zu einer Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen innerhalb der Zellen kommt (Revankar et al. 2005). ROS-Generierung als *Second Messenger* ist eng verbunden mit der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. So konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel essentiell für die Aktivierung von ROS-bildenden Enzyme, wie z.B. der NADPH-Oxydase ist (Agnes Görlach 2015). Dieses Zusammenspiel könnte auch die zytotoxische Wirkung von *Res.* in höheren Dosierungen erklären (Mühlbrandt 2018). Eine Anhäufung von ROS, welche den Bedarf für eine Signalvermittlung übersteigt, hat vor allem einen zytotoxischen Effekt (Agnes Görlach 2015). In geringeren Mengen könnte dieses Zusammenspiel zwischen Ca²⁺-Signalen und ROS aber entscheidend sein für den fördernden Effekt von *Res.* auf die frühen Kardiomyogenese in ESCs (Bartsch C 2011).

Auf welche Weise *Res.* Ca²⁺-Signale, die weiter Signalwege aktivieren können, induziert und in welchem Zusammenhang diese mit ER stehen, sollte durch Ca²⁺-Messungen an dissoziierten Einzelzellen im nächsten Schritt erörtert werden.

6.3 Ca²⁺-Signal Messung

Das Netzwerk aus Signalwegen, welches die Wirkung von *Res.* auf Zellen vermittelt, ist in großen Teilen noch nicht verstanden (Park et al. 2012). Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass Ca²⁺-Ausschüttung aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern hierbei eine Rolle spielt (Park et al. 2012, Chang et al. 2015). Es sind unterschiedliche Mechanismen, wie es zu dieser Ausschüttung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Retikulum und anderen Ca²⁺-Speichern kommt, beschrieben. Es wurde gezeigt, dass *Res.* durch die Hemmung von Phosphodiesterasen einen Abbau von cAMP verhindert und so zu einer Akkumulation von cAMP führt. Dies bewirkt über einen Epac1, Rap, PLC ϵ , CamKII vermittelten Signalweg eine Ca²⁺-Ausschüttung aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch Ryr2-Kanäle (Park et al. 2012). Ein anderer beschriebener Signalweg ist die Ca²⁺-Ausschüttung anhand des PLC, DAG/IP₃, PKC, IP₃R-Signalweges dar (Chang et al. 2015). Die Vermittlung von Ca²⁺-Signalen durch PLC, DAG/IP₃, PKC, IP₃R erinnert an einen durch membranständige Estrogenrezeptoren (mER) aktivierten Signalweg (Revankar et al. 2005). Deshalb wurde als Teil dieser Arbeit das *Res.*-Ca²⁺-Signal auch auf diesen Aspekt hin untersucht. Dies wurde per live Messung von Fluoreszenz-Signalen mittels konfokalen Laser Scanning Mikroskope (cLSM) an Einzelzellen nach kontrollierter Zugabe von *Res.* an Tag 5 des Differenzierungszeitstrahls durchgeführt.

Dass eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Ausschüttung einen Effekt auf die Aktivierung der AMP-Kinase via CamKK β hat, konnte bereits gezeigt werden (Park et al. 2012, Feng et al. 2018). Genauso konnte in vorangehenden Arbeiten gezeigt werden, dass intrazelluläre Ca²⁺-Ausschüttung zur ROS-Bildung führen kann und einen aktivierenden Effekt auf die kardiale Differenzierung von Stammzellen hat (Mazrouei et al. 2015, Bartsch C 2011). Neben der Aktivierung der AMPK durch CamKK β wird dies bisher ins Besondere dem Calcineurin-NFATc3-Etv2-Signalweg zugeschrieben (Wang et al. 2017). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Res.* konzentrationsabhängig zu einer Ausschüttung von Ca²⁺ führt (Abb.16). Da dies wie zuvor beschrieben zu einer erhöhten kardialen Differenzierung in ESCs beitragen kann, sind Ca²⁺-Signale ein plausibler Teil des *Res.* Signalwegnetzwerkes, welches die gezeigten Effekte im *EB*-Modell vermittelt.

Um den Einfluss von mER auf die Ca²⁺-Ausschüttungen zu untersuchen, wurden die ER-Modulatoren ICI 182 780 und Tamoxifen eingesetzt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass das *Res.*-Ca²⁺-Signal vor allem durch eine vorangehende Inkubation mit dem puren ER-Antagonisten ICI 182 780 verändert werden kann (Abb. 17). Anstelle der ansonsten schnell

auftretenden Ca^{2+} -Ausschüttung mit anschließender Plateauphase, kam es unter ER Blockade erst signifikant später zur maximalen Ca^{2+} -Ausschüttung (I_{max}). Auch die maximale Amplitude des durch *Res.* ausgelösten Ca^{2+} Signals zeigte sich durch die Inhibierung von ER durch ICI 182 780 signifikant verringert (Abb. 19, Abb. 20). Durch die vorangehende Inkubation mit dem Estrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen wurde die Intensität des Ca^{2+} -Signals nicht signifikant verändert, aber die Zeit bis zu I_{max} verlängert (Abb. 18 - Abb.20). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Tamoxifen und nicht die Zugabe von ICI 182 780 zu einem eigenständigen Ca^{2+} -Signal führte. Dies spricht dafür, dass, wie bereits an anderen Zellen gezeigt wurde, Tamoxifen alleine als ein partieller Agonist am mER fungiert. Beim Vorliegen eines potenteren Agonisten hat es jedoch antagonistische Eigenschaften hat.

Die Morphologie der Kurve des *Res.*- Ca^{2+} -Signals mit schnellem Anstieg und langer Plateauphase lässt bereits das Zusammenspiel mehrerer Mechanismen, die zur Entstehung dieses Signals beitragen, vermuteten (Chang et al. 2015). Die durch ER-Blocker provozierten Ergebnisse scheinen zu bestätigen, dass ein Teil der Ca^{2+} -Ausschüttung abhängig von mER ist. Es lässt sich annehmen, dass der erste Teil des *Res.*- Ca^{2+} -Signals über einen durch mER vermittelten PLC, DAG/IP₃, PKC, IP₃R-Signalweg abläuft und die Plateauphase Resultat des sich akkumulierenden cAMPs nach PDE-Hemmung ist. Diese Signalachse könnte den Ausgangspunkt für weitreichende Signalwegkaskaden innerhalb der Zelle sein und eine Begründung für die Vielzahl von biologischen Effekten von *Res.* sein. Darüber hinaus könnte ein Teil des Ca^{2+} -Signals auch aus extrazellulärem oder mitochondrialem Einstrom resultieren (Chang et al. 2015) und zu der Komplexität des Ca^{2+} -Signals beitragen.

Um den Zusammenhang zwischen *Res.* und mER in Zukunft weiter zu untersuchen, ist eine genaue Immunfärbung von Rezeptoren nach vorangegangener Ca^{2+} -Signal-Messung denkbar. Auch die gezielte Unterdrückung des Ca^{2+} -Einstroms aus unterschiedlichen Zellorganellen sollte in Zukunft genauer untersucht werden.

6.4 Quantifizierung der pAMP-Kinase Aktivität

Die Adenosinmonophosphat aktivierte Kinase (AMPK) ist neben ihrer Schlüsselrolle in zahlreichen Stoffwechselsituationen (Baek et al. 2017) ein wichtiges Regulationsenzym in Regenerations-, Alterungs- und Differenzierungsprozessen (Dzeja et al. 2011, Yang et al. 2016a, Cieslik et al. 2011, Feng et al. 2018). Sie wird mittels Phosphorylierung durch CamKK β und LKB1 an Threonin 172 (THR172) aktiviert (Russo et al. 2013). *Res.* ist ein Aktivator der AMPK (Park et al. 2012). Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 23). Aufgrund ihres Stellenwertes in kardialen Entwicklungsprozessen und ihrem positiven Einfluss auf das Überleben von Stammzellen (Dzeja et al. 2011, Khorraminejad-Shirazi et al. 2019) liegt die Vermutung nahe, dass *Res.* seine Kardiomyogenese fördernde Wirkung zum Teil via AMPK realisiert. Diese Vermutung konnte bereits durch die Schlaganalyse ausplattierter *EBs* bekräftigt werden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *Res.* auf die AMPK mittels Western Blot und anschließender Immundetektion quantitativ untersucht. Dafür wurde zunächst die Intensität der Proteinbande der an THR172 phosphorylierten pAMPK mit der des *Housekeepig*-Proteins GAPDH verglichen. Anschließend wurden die Antikörper-Bindungen der Western Blot Membran mittels Stripping-Puffer entfernt und die Darstellung der unphosphorylierten AMPK durchgeführt. Durch die Messungen der pAMPK (aktiviert) und der unphosphorylierten (inaktiven) AMPK konnten diese ins Verhältnis gesetzt werden. So konnte gezeigt werden, dass es nach 24 h Inkubation mit *Res.* in einer Konzentration von 50 μ M zu einer signifikanten Erhöhung des pAMPK Signals kam. Auch die Gesamt-AMPK (Summe aus pAMPK und AMPK) stellte sich erhöht dar (Abb. 23, Abb. 24, Anhang Abb. 39). Das Verhältnis aus AMPK und pAMPK blieb nach den 24 h Inkubation gleich (Anhang Abb. 39). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Inkubation mit 50 μ M *Res.* in CGR8 Zellen zum einen eine gesteigerte Aktivierung der AMPK mittels Phosphorylierung bewirkt, zum anderen es aber auch zu einer gesteigerten Expression der Kinase kommt. Dieses Plus an AMPK und pAMPK hat zur Folge, dass den Zellen durch *Res.*-Inkubation mehr aktivierte Kinasen zu Verfügung stehen, die weitere Signalwege aktivieren können. Da die AMPK aber neben ihrer Kinaseaktivität auch als Sensor der zellulären Homöostase dient, ermöglicht das erhöhte Gesamtniveau der AMPK mit erhöhter Genauigkeit auf ein metabolisches Ungleichgewicht reagieren zu können und so mögliche parakrine oder hormonelle Signale besser zu erkennen (Dzeja et al. 2011, Herzig und Shaw 2017).

Die Erhöhung der Gesamt-AMPK kann auf eine Autoinduktion der AMPK-Gene durch gesteigerte AMPK-Aktivität, eine gesteigerte Differenzierung und verminderte Apoptose der behandelten Zellen zurückgeführt werden (Niesler et al. 2007).

Die vermehrte Phosphorylierung der AMPK ist Folge einer Aktivitätssteigerung der Kinasen CamKK β und LKB1. Der Stellenwert dieser Kinasen im *Res.* Signalwegnetzwerk wurde in den folgenden Experimenten mit Signalwegblockern versucht zu ermittelt. Darüber hinaus sollte durch die gezielte Inhibierung unterschiedlicher Signalwege untersucht werden, ob *Res.* konzentrationsabhängig eine gesteigerte Aktivierung der AMPK auf unterschiedlichen Wegen bewirkt.

Hohe Konzentrationen von *Res.* (50 μ M) führen zu intrazellulärer Ca²⁺-Ausschüttung (Abb. 16) (Madreiter-Sokolowski et al. 2016). Eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration aktiviert neben anderen Signalwegen auch die CamKK β (Park et al. 2012). Dies legt die Vermutung nahe, dass hohe Konzentrationen an *Res.* hauptsächlich über diesen Weg die AMPK aktivieren. Es konnte hier gezeigt werden, dass durch die Blockierung der CamKK β mittels STO-607 *Res.* in hohen Konzentrationen (50 μ M) nicht mehr in der Lage war die AMPK vermehrt zu aktivieren (Abb. 26). Dieser Effekt konnte nicht bei niedrigen Konzentration von *Res.* (25 μ M) dargestellt werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass *Res.* in hohen Konzentration hauptsächlich über einen Ca²⁺-abhängigen Weg die AMPK aktiviert. Auch für die intrinsische Aktivität der AMPK scheint CamKK β eine entscheidende Rolle zu spielen, da es alleine durch die Inkubation mit STO-607 zu einer Abnahme des pAMPK Signals kam (Abb. 32).

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass das *Res.* Ca²⁺-Signal durch die Blockierung von mER abgeändert werden kann, so dass auch die Aktivierung der AMPK durch *Res.* hinsichtlich ihrer Verbindung mit ER überprüft wurde. Es konnte dargestellt werden, dass durch die unspezifische ER Blockierung durch den Antagonisten ICI 182 780 *Res.* in hohen Konzentrationen nicht mehr in der Lage war, die AMPK vermehrt zu aktivieren (Abb. 30). Diese Ergebnisse deuten erneut daraufhin, dass mER durch die Aktivierung intrazellulärer Ca²⁺-Ausschüttung eine wesentliche Rolle in der Vermittlung des *Res.*-Effektes auf die AMPK und die Zelle im Gesamten spielt.

Niedrige Konzentrationen an *Res.* führen zur Aktivierung von SIRT1, was wiederum zur aktivierenden NAD⁺ abhängigen Deacetylierung von LKB1 führen kann (Price et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass es zu einer aktivierenden Interaktion zwischen SIRT1 und *Res.* kommt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Blockierung dieser Interaktion zwischen SIRT1 und *Res.* (25 μ M) durch EX-527 zu einer signifikanten Abnahme

der AMPK Aktivierung kommt (Abb. 28). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass niedrig konzentriertes *Res.* hauptsächlich über SIRT1 und LKB1 die AMPK aktiviert. Durch die Blockierung von SIRT1 durch EX-527 konnte aber nicht nur der Effekt von 25 μM *Res.* signifikant vermindert werden, darüber hinaus kam es auch zu einer signifikanten Abnahme des Effektes von 50 μM *Res.* (Abb. 28). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass SIRT1 Teil einer Unterstützungs- bzw. Verstärkerschleife mit positiver Rückkopplung auf die AMPK-Aktivität ist. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die erhöhte Bereitstellung von NAD^+ , die durch eine Umstellung des Stoffwechsels durch die aktivierte AMPK bedingt ist, vermittelt (Canto et al. 2009, Wu et al. 2019). Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass LKB1 einen Teil eines konsekutiv durch SIRT1 und NAD^+ aktivierten Kinasekomplexes, welcher die Basisaktivität der AMPK sicher stellt, bildet (Canto und Auwerx 2010). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den Messungen mit ausschließlicher EX-527 Inkubation. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme des pAMPK-Levels unter alleiniger EX-527 Inkubation (Abb. 34).

Die Untersuchungen der pAMPK und AMPK mit und ohne Signalwegblocker helfen bei dem Verständnis des durch *Res.* aktivierten Signalwegenetzwerks. Diese Untersuchung lässt aber nur spekulative Überlegungen zu, wie die aktivierte AMPK ESCs im Kontext der Kardiomyogenese beeinflusst. Eine Möglichkeit ist, dass es durch eine erhöhte AMPK-Aktivierung zu einer vermehrten Produktion von NO kommt (Kroller-Schon et al. 2018, Bartsch et al. 2011). Dieses Zusammenspiel wurde bereits in vorangehenden Arbeiten gezeigt. Darüber hinaus ist NO ein Schlüsselbotenstoff in der Initiierung der Kardiomyogenese in ESCs (Padmasekar M 2011, Bartsch et al. 2011). Diese Verbindung macht die AMPK-Aktivierung zu einem wichtigen Ausgangspunkt in der Einflussnahme von *Res.* auf die kardiale Differenzierung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die *Res.* als eindeutigen AMPK- und ER-Aktivator identifiziert, sind auch im Kontext anderer Forschungsbereiche, die sich mit metabolischen und onkologischen Themen auseinandersetzen, relevant. Die Erkenntnisse über eine Verbindung zwischen hormonellen Rezeptoren und der AMPK bietet gegebenenfalls die Möglichkeit, in diesem Bereichen neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

6.5 Analyse der kardialen Marker

Ein Ziel dieser Arbeit war neben der Identifizierung von Signalwegen, die durch *Res.* aktiviert werden, die Einschätzung dieser im Kontext der Kardiomyogenese. Anhand der Schlaganalyse der *EBs* konnte ein signifikanter Effekt von *Res.* in einer Konzentration von 50 μM auf das Schlagverhalten von *EBs* dargestellt werden. In den vorangehenden Analysen der AMPK und von Ca^{2+} -Signalen, konnte bereits gezeigt werden, dass gewisse durch *Res.* ausgelöste zelluläre Signale durch die Zugabe von ER-Modulatoren verändert werden konnten. Diese hatten auch einen Einfluss auf das beobachtete Schlagverhalten der *EBs* unter *Res.* Inkubation. ER stellen somit einen potentiell entscheidenden Interaktionspartner für *Res.* in der Vermittlung von fördernden Effekte auf die Kardiomyogenese dar. Um dies zu objektivieren, wurde die Analyse kardialer Strukturproteine mittels PCR und Western Blot gewählt. Zum einen wurde mittels PCR die Expression der atrialen und ventrikulären Myosin leichte Kette untersucht. Mittels Western Blot und anschließender Immundetektion wurde darüber hinaus die Menge der schweren Myosin-Untereinheit unter unterschiedliche Inkubationsbedingungen quantifiziert. Myosin stellt mit Aktin, Troponin und Tropomyosin die funktionelle Einheit des Kontraktionsapparates von Herzmuskelzellen dar. Ihre Interaktion sichert die dauerhafte rhythmische Kontraktion von Herzmuskelzellen (Lüllmann-Rauch 2009). Aufgrund ihrer ubiquitären Expression in kardialen Zellen sind diese Proteine ein spezifischer und genauer Marker für kardiale Differenzierung (Lüllmann-Rauch 2009).

Ab Tag 8 bis 10 des Differenzierungszeitstrahls konnte man das Auftreten von schlagende Areale in den *EBs* beobachten. In den darauffolgenden Tagen kam es in der Regel zu einer Größenzunahme dieser schlagenden Areale. Dies spiegelt die gesteigerte Expression und Funktionalität des Kontraktionsapparates wieder. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheiten wurde Tag 12 des Differenzierungszeitstrahls gewählt, um RNA und Proteine aus den Zellen der *EBs* zu isolieren. So war es möglich, eine gesteigerte Expression kardialer Proteine durch *Res.*-Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle (DMSO) auf RNA- und Proteinebene mittels qPCR und Western Blot darzustellen (Abb. 35, Abb. 36). Dies zeigt parallel zu den Ergebnissen der Schlaganalyse ausplattierter *EBs*, dass *Res.* in einer Konzentration von 50 μM die Kardiomyogenese in ESCs steigert.

Res. führte zu einer gleichmäßigen Erhöhung atrialer und ventrikulärer Strukturproteine. Dies deutet auf einen ausgeglichenen Effekt von *Res.* auf die gesamte Kardiomyogenese und einen Einfluss auf frühe Differenzierungsprozesse hin. Ein Großteil des kardialen Wachstums nach abgeschlossener Ausdifferenzierung stellt die Hypertrophie der Herzventrikel dar, welche mit

einer gesteigerten Expression von hauptsächlich ventrikulären Strukturproteinen einher geht (Sadler 2003).

Auf RNA-Ebene konnte eine signifikante Verminderung dieser Überexpression durch die Ko-Inkubation von *Res.* und ER-Modulatoren gezeigt werden. Besonders der reine Antagonist ICI 182 780 zeigte diesen Effekt. Trotz Ko-Inkubation zeigte sich verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle aber immer noch eine signifikant gesteigerte Expression des ventrikulären Myosins (Abb.33). Die alleinige Inkubation mit ICI 182 780 oder Tamoxifen führte zu keiner signifikanten Expressionssteigerung. Diese Ergebnisse deuten zunächst daraufhin, dass *Res.* zu mindestens in einem gewissen Maß durch die Aktivierung von ER eine gesteigerte Transkription kardialer Gene bewirkt. In Verbindung mit den Ergebnissen der Ca^{2+} -Signal-Messung und den Untersuchungen der AMPK ist die Schlussfolgerung denkbar, dass dies das Resultat der Aktivierung von mER ist. Die mit mERs zusammenhängenden Signalwege können via PLC, IP₃, IP₃R über die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen zu einer Aktivierung der AMPK führen. Die AMPK ist über die Freisetzung von NO, Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und die Einstellung des Stoffwechsels in der Lage, die kardiale Differenzierung von ESCs zu beeinflussen (Bekhte et al. 2016, Hu et al. 2016, Feng et al. 2018). Ca^{2+} -Signale können auch in Interaktion mit Ca^{2+} -bindenden Proteinen und durch über die Generierung von ROS die Differenzierung von ESCs beeinflussen und die frühe Kardiomyogenese fördern (Liu et al. 2017, Su et al. 2015). Des Weiteren ist auch durch die Modulierung des PI3K/Akt/mTOR Signalweges durch *Res.* eine Beeinflussung der sich differenzierenden Zellen möglich (Dominguez et al. 2007, Bekhte MM 2011). Diese Interaktion wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Guan et al. 2019). Auch mER sind in der Lage in den PI3K/Akt Signalweg einzugreifen, so dass eine Verbindung zwischen *Res.*, mER und PI3K/Akt vorstellbar ist (Araki und Miyoshi 2018, Dominguez et al. 2007). Darüber hinaus ist auch die Interaktion von *Res.* mit intrazellulär gelegenen ER, die durch Aktivierung eigenständig mit der DNA in Kontakt treten und spezifische Transkriptionen fördern, denkbar (Levin 2009).

Zusätzlich lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass der Effekt von *Res.* vor allem auf ventrikulärer Ebene nicht vollständig durch die pharmakologische ER-Antagonisierung aufzuheben ist. Dies kann daher rühren, dass die Rezeptormodulatoren die Interaktion von *Res.* mit den entsprechenden Rezeptoren nicht vollständig verhindert. Da eine pharmakologische, kompetitive Rezeptor-Blockung dahingehend limitiert ist, sind weitergehende Untersuchungen mit dem kompletten *Knockdown* der spezifischen ER erstrebenswert. Insbesondere deuten aber auch die hier vorliegenden Ergebnisse daraufhin,

dass die Wirkung von *Res.* auf die Zelle vielgestaltig ist und wahrscheinlich nicht auf einen entscheidenden Signalweg zu reduzieren ist. Es sind auch noch z.B. die Interaktion von *Res.* mit Sirtuinen, die Hemmung der PDE und eine ER-unabhängige Aktivierung der AMPK in Betracht zu ziehen.

Darüber hinaus ist es denkbar, da ICI 182 780 vor allem die gesteigerte Expression atrialer Myosin Ketten unterdrückte, dass *Res.* durch die Interaktion mit ER vornehmlich den Beginn der Kardiomyogenese fördert. Langzeiteffekte von *Res.* wie beispielsweise eine kontrollierte Hypertrophie und Stabilisierung ventrikulärer Herzzellen werden möglicherweise über andere Signalwege vermittelt. Dies würde sich mit den Erkenntnissen der ER-Immunfärbung, die zeigten, dass mER vor allem in den ersten Tagen des Differenzierungszeitstrahls exprimiert werden, decken.

Auch die Ergebnisse des Western Blots zeigten, dass *Res.* auf Proteinebene die Expression von Myosin steigert (Abb. 34). Diese Analyse erfolgte an Hand der schweren Untereinheit des Enzyms, da sich aufgrund des geringen molekularen Gewichts und der damit verbundenen Schwierigkeit in der Auftrennung mittels Agarosegel die Quantifizierung der leichten Myosin Ketten als impraktikabel darstellte. Die Expressionssteigerung von Myosin durch *Res.* konnte durch die Ko-Inkubation mittels ICI 182 780 oder Tamoxifen im Western Blot nicht vermindert werden. Diese Ergebnisse lassen in der Verbindung mit den Ergebnissen der PCR mehrere Schlüsse zu. Zum einen ist es denkbar, dass *Res.* die Transkription kardialer Gene durch Interaktion mit ER steigert und die darauffolgende Translation in eine Aminosäure-Struktur unabhängig von ER gefördert wird. Zum anderen ist es auch möglich, dass, wie bereits oben erörtert, die Steigerung der vorhandenen Strukturproteine durch *Res.* ein Ausdruck kardialer Zell-Hypertrophie und -Stabilisierung ist, die unabhängig von ER ablaufen. Auch ist es denkbar, dass die zwar gesenkte aber im Verhältnis zur Lösungsmittelkontrolle immer noch gesteigerte, Transkription kardialer Gene ausreichend ist, um in der Zelle vermehrt kardiale Strukturproteine anzuhäufen. Darüber hinaus ist zu diskutieren wie stark *Res.* verglichen mit echten Estrogenen mit ER interagieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit schreiben ER einen gewissen Stellenwert in der kardialen Differenzierung von ESCs zu. Deshalb ist es von großem Interesse, zukünftig die Effekte von hochpotenten Estrogenen auf ESCs im Rahmen der Kardiomyogenese zu testen. Besonderer Fokus sollte dabei auf den mER α/β und GPER liegen, um genauer zu entschlüsseln, über welchen Rezeptor Kardiomyogenese fördernde Effekte induziert werden können .

Neben den Effekten von *Res.* sind auch die Ergebnisse der alleinigen Inkubation mit ER-Modulatoren beachtenswert. Vor allem Tamoxifen wirkt auf das Wachstum verschiedener Gewebearten unterschiedlich. Zwar wirkt es hemmend auf das Wachstum von Brustgewebe, fördert aber das Knochenwachstum und die Hypertrophie von Endometriumszellen. Diese Eigenschaften führen zu einem Teil der bekannten Nebenwirkungen von Tamoxifen, wenn es zur Therapie hormonsensibler Mammakarzinome eingesetzt wird. Zu diesen Nebenwirkung gehört z.B. die Dysplasie und Ausbildung von Karzinomen aus hypertrophierten Endometriumszellen (Lutz Hein 2014). Im Kontext unterschiedlicher Gewebeeffekte von Tamoxifen lässt sich das Fehlen einer gesteigerten Expression kardialer Marker auf RNA- und Proteine-Ebene in den hier vorliegenden Ergebnissen so deuten, dass der partielle Agonismus von Tamoxifen an ER ausreicht, um kardiale Differenzierung und Wachstum zu fördern (Abb. 33 – Abb.35).

7 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die weiterführende Untersuchung des Effektes von *Resveratrol* (*Res.*) auf die kardiale Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ESCs) der CGR8-Zelllinie im dreidimensionalen *Embryoid Body*(*EB*)-Modell und die Entschlüsselung eines zugrundeliegenden Signalwegnetzwerkes. Es konnten bereits gezeigt werden, dass *Res.* einen positiven Einfluss auf das Überleben von ESCs hat, kardiale Differenzierung stabilisiert und die Bildung von ROS induziert (Mühlbrandt 2018). Im Rahmen dieser Arbeit konnte darüber hinaus dargestellt werden, dass *Res.* in einer Konzentration von 50 μM auch den Beginn der kardialen Differenzierung fördert. Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte demonstriert werden, dass unter *Res.*-Inkubation die Ausbildung von sich kontrahierenden Arealen im *EB*-Modell 24 h früher beginnt. Ebenso konnte mittels qPCR und Western Blot die vermehrte Expression kardialer Marker in diesen *EBs* dargestellt werden.

Diese Erkenntnisse und die Ergebnisse der Experimente mit gezielter Signalweginhibierung lassen schlussfolgern, dass *Res.* das Potential hat, auf unterschiedliche Art und Weise Einfluss auf die Kardiomyogenese zu nehmen. Es zeigte sich, dass in diesem Signalwegnetzwerk vor allem membranständigen Estrogenrezeptoren (mER) an den Tagen 5 und 6 des Differenzierungszeitstrahls eine Schlüsselrolle zugeteilt werden kann. Das Unterbinden der Interaktion zwischen mER und *Res.* durch ER-Modulatoren führt zur Verminderung des positiven Effektes von *Res.* auf die Kardiomyogenese. Die Inkubation mit dem ER-Antagonisten ICI 182 780 blockierte außerdem die Ausbildung der durch *Res.* ausgelösten Ca^{2+} -Signale und inhibierte so ein entscheidendes Signal innerhalb des *Res.* Signalwegnetzwerkes.

Western Blot-Untersuchungen der Adenosinmonophosphat aktivierten Kinase (AMPK) legen nahe, dass durch die Initiierung von Ca^{2+} -Signalen via mER *Res.* die Phosphorylierung der AMPK in ESCs gesteigert wird. Diese Aktivierung der AMPK scheint aber auch zum Teil von SIRT 1 abhängig zu sein. Verbunden mit bereits etabliertem Wissen über *Res.* und Kardiomyogenese fördernden Prozessen ergibt sich das in Abb. 37 dargestellte Signalwegnetzwerk, über das *Res.* Einfluss auf Differenzierungsprozesse nimmt. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich auch schlussfolgern, dass hormonelle und metabolische Einflüsse in der Betrachtung von ESCs auf ihrem Weg zu ausdifferenzierten Zellen wichtig sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Res.* in der Lage ist, über multiple Signalwege auf eine Zelle einzuwirken und so eine Vielzahl von physiologischen Prozessen zu unterstützen und zu verstärken. In Abhängigkeit der Ausgangssituation einer Zelle und der angewendeten

Res.-Konzentration resultiert dies in unterschiedlichen induzierten Effekten. Weiterführend bedeutet dies, dass *Res.* die Prozesse der Stammzellausreifung unterstützen, stabilisieren und dadurch berechenbarer machen kann. Dies könnte das Arbeiten mit Stammzellen verbessern und sich für zukünftige Experimente als grundlegend erweisen.

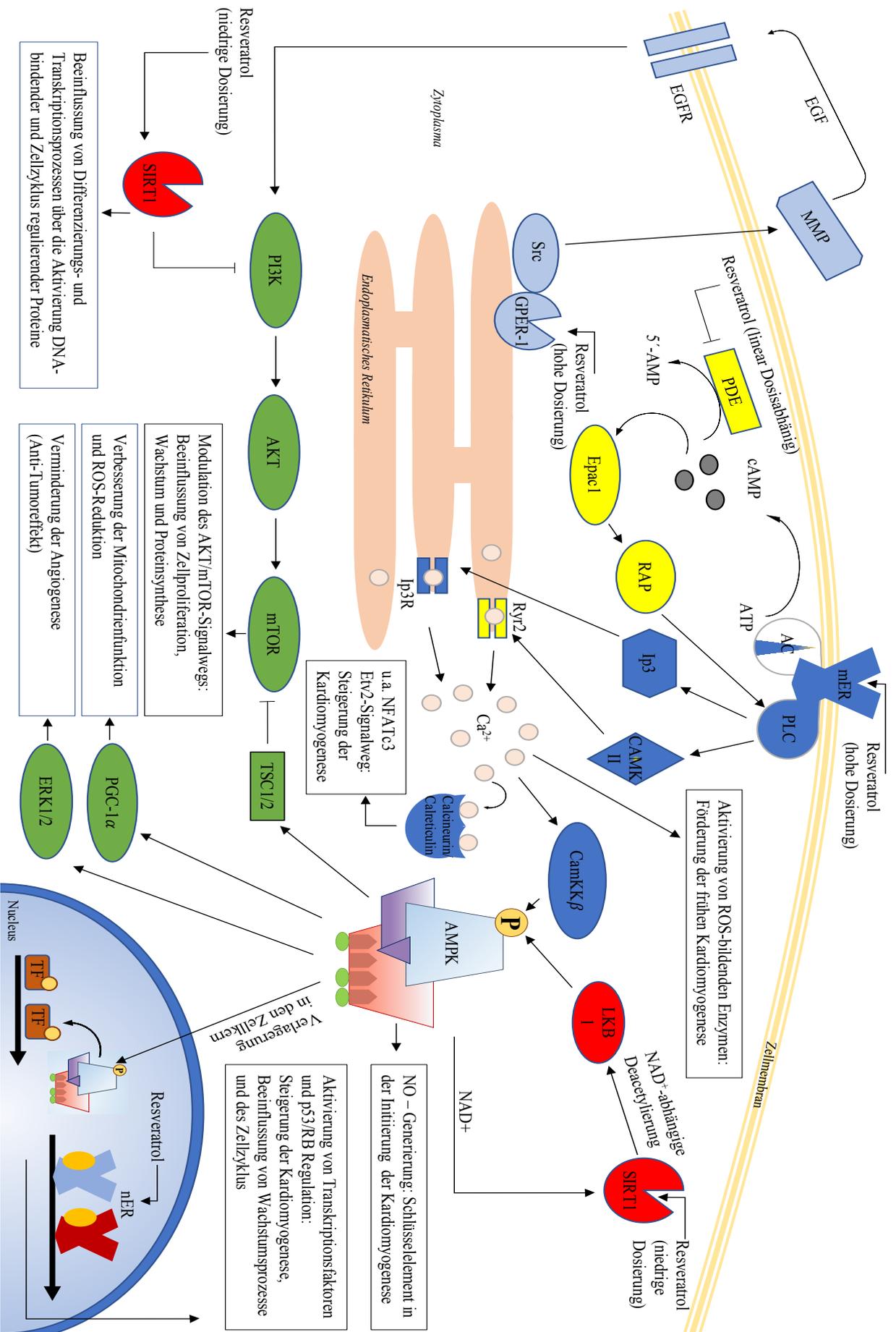


Abb. 37 Geschlossenes Resveratrol Signalwegnetzwerk

8 Anhang

8.1 Schlagfrequenz Analyse ausplattierter *EBs*.

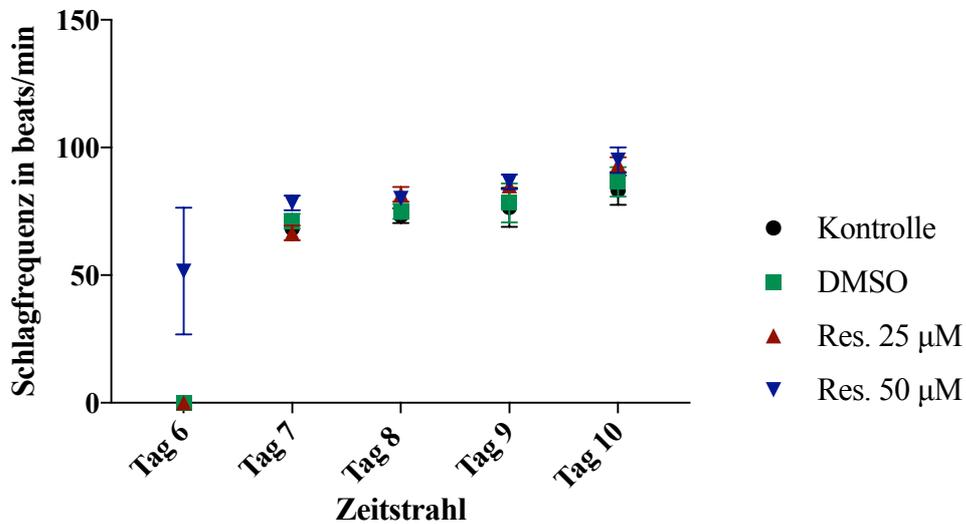


Abb. 38 Schlagfrequenz Analyse ausplattierter *EBs*

Dargestellt ist die durchschnittliche Schlagfrequenz der schlagenden *EBs*. Es wurden 25 *EBs* aus jeweils $n = 3$ Passagen beobachtet und auf das Vorhandensein von schlagenden Arealen überprüft und von jeweils drei repräsentativen *EBs* die Schlagfrequenz ermittelt. Gegenübergestellt werden *EBs* inkubiert mit Zellmedium, der Lösungsmittelkontrolle DMSO, *Res.* 25 µM, *Res.* 50 µM. Dargestellt sind die MW aus den drei Passagen mit \pm SD an den Tagen 6, 7, 8, 9 und 10 des Differenzierungszeitstrahls.

8.2 Aktivitätsanalyse der AMPK

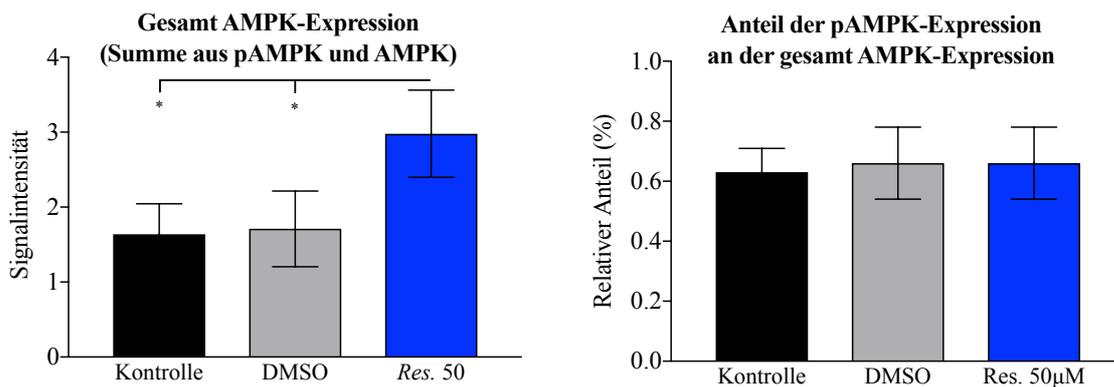


Abb. 39 Expressionsverhältnis der AMPK und pAMPK

Dargestellt ist zum einen der Anteil der pAMPK am gesamten der AMPK Expression (*links*) und zum anderen die absolute Gesamtexpression der AMPK (*rechts*). Verglichen werden die Werte aus *EBs* inkubiert für 24 h mit 50 µM *Res.* mit den jeweiligen Kontrollen.

8.3 Estrogenrezeptor Analyse

Im Zusammenhang mit der Analyse der ER mittels Immunfluoreszenz wurde außerdem ein Western Blot gegen ER α durchgeführt. Hierfür wurden aus unterschiedlichen Zellpassagen an Tag 5 und Tag 12 des Zellkulturzeitstrahls Proteine isoliert und ein spezifischer Western Blot durchgeführt.

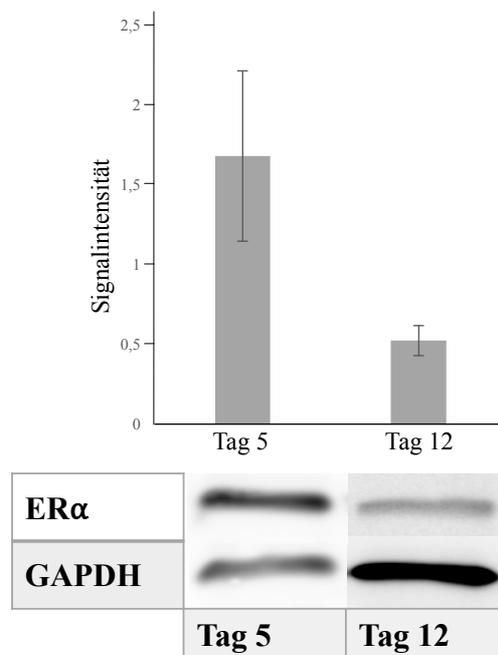


Abb. 40 Western Blot gegen ER α

An Tag 5 und 12 erfolgte die Proteinisolation mit anschließendem Western Blot gegen ER α . Dargestellt sind Mittelwerte aus $n = 3$ Passagen und die korrespondierenden Standardabweichungen. Die einzelnen Werte ergeben sich durch den Bezug der jeweiligen Protein-Bande auf die Signalintensität der korrespondierenden Kontrollprobe. Die Werte wurden mithilfe des *Housekeeping*-Proteins GAPDH vergleichbar gemacht. Zu dem abgebildet sind die Proteinbanden analysiert mit der Software ImageJ. Die Proteinbanden mit dem spezifischen Molekulargewicht von 68 kDa (ER α) und 37 kDa (GAPDH) stammen aus Proben, die an Tag 5 und 12 aus *EBs* isoliert und mithilfe der Western Blot-Methode dargestellt worden sind.

9 Quellenverzeichnis

- Agnes Görlach KB, Sona Hudecova, Olga Krizanova. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.*
- Al Dera H. 2017. Neuroprotective effect of resveratrol against late cerebral ischemia reperfusion induced oxidative stress damage involves upregulation of osteopontin and inhibition of interleukin-1beta. *J Physiol Pharmacol*, 68 (1):47-56.
- Andre E, De Pauw A, Verdoy R, Brusa D, Bouzin C, Timmermans A, Bertrand L, Balligand JL. 2019. Changes of Metabolic Phenotype of Cardiac Progenitor Cells During Differentiation: Neutral Effect of Stimulation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase. *Stem Cells Dev.*
- Araki K, Miyoshi Y. 2018. Mechanism of resistance to endocrine therapy in breast cancer: the important role of PI3K/Akt/mTOR in estrogen receptor-positive, HER2-negative breast cancer. *Breast Cancer*, 25 (4):392-401.
- Babaie Y, Herwig R, Greber B, Brink TC, Wruck W, Groth D, Lehrach H, Burdon T, Adjaye J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25 (2):500-510.
- Baek JH, Kim NJ, Song JK, Chun KH. 2017. Kahweol Inhibits Lipid Accumulation and Induces Glucose-Uptake Through Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK). *BMB Rep.*
- Bartsch C, Bekhite MM, Wolheim A, Richter M, Ruhe C, Wissuwa B, Marciniak A, Müller J, Heller R, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. 2011. NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic acid treatment. *Free Radic Biol Med*, 51 (2):432-443.
- Bartsch C BM, Wohlheim A, Richter M, Ruhe C, Wissuwa B, Marciniak A, Müller J, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. 2011. NADPH oxidase and eNOS control cardiomyogenesis in mouse embryonic stem cells on ascorbic treatment. *Free Radic Biol Med.*
- Bekhite MM, Finkensieper A, Abou-Zaid FA, El-Shourbagy IK, El-Fiky NK, Omar KM, Sauer H, Wartenberg M. 2016. Differential effects of high and low strength magnetic fields on mouse embryonic development and vasculogenesis of embryonic stem cells. *Reprod Toxicol*, 65:46-58.

- Bekhite MM FA, Bina S, Müller J, Wetzker R, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg. 2011. VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci*.
- Canto C, Auwerx J. 2010. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci*, 67 (20):3407-3423.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458 (7241):1056-1060.
- Cao D, Wang M, Qiu X, Liu D, Jiang H, Yang N, Xu RM. 2015. Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes Dev*, 29 (12):1316-1325.
- Castaldo L, Narvaez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Minno GD, Ritieni A. 2019. Red Wine Consumption and Cardiovascular Health. *Molecules*, 24 (19).
- Chang HC, Guarente L. 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 25 (3):138-145.
- Chang HJ, Chou CT, Chang HT, Liang WZ, Hung TY, Li YD, Fang YC, Kuo CC, Kuo DH, Shieh P, Jan CR. 2015. Mechanisms of resveratrol-induced changes in cytosolic free calcium ion concentrations and cell viability in OC2 human oral cancer cells. *Hum Exp Toxicol*, 34 (3):289-299.
- Chen FP, Chien MH. 2019. Effects of phytoestrogens on the activity and growth of primary breast cancer cells ex vivo. *J Obstet Gynaecol Res*, 45 (7):1352-1362.
- Chen K, Bai H, Arzigian M, Gao YX, Bao J, Wu WS, Shen WF, Wu L, Wang ZZ. 2010. Endothelial cells regulate cardiomyocyte development from embryonic stem cells. *J Cell Biochem*, 111 (1):29-39.
- Cheng CK, Luo JY, Lau CW, Chen ZY, Tian XY, Huang Y. 2019. Pharmacological Basis and New Insights of Resveratrol Action in the Cardiovascular System. *Br J Pharmacol*.
- Chiang MC, Nicol CJ, Cheng YC. 2017. Resveratrol activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against amyloid-beta-induced inflammation and oxidative stress. *Neurochem Int*.
- Choi Y, Yoon DS, Lee KM, Choi SM, Lee MH, Park KH, Han SH, Lee JW. 2019. Enhancement of Mesenchymal Stem Cell-Driven Bone Regeneration by Resveratrol-Mediated SOX2 Regulation. *Aging Dis*, 10 (4):818-833.

- Cieslik KA, Trial J, Entman ML. 2011. Defective myofibroblast formation from mesenchymal stem cells in the aging murine heart rescue by activation of the AMPK pathway. *Am J Pathol*, 179 (4):1792-1806.
- David R, Jarsch VB, Schwarz F, Nathan P, Gegg M, Lickert H, Franz WM. 2011. Induction of MesP1 by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res*, 92 (1):115-122.
- Dominguez R, Liu R, Baudry M. 2007. 17-Beta-estradiol-mediated activation of extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt and N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation in cortical synaptoneuroosomes. *J Neurochem*, 101 (1):232-240.
- Duncan MT, DeLuca TA, Kuo HY, Yi M, Mrksich M, Miller WM. 2016. SIRT1 is a critical regulator of K562 cell growth, survival, and differentiation. *Exp Cell Res*, 344 (1):40-52.
- Dzeja PP, Chung S, Faustino RS, Behfar A, Terzic A. 2011. Developmental enhancement of adenylate kinase-AMPK metabolic signaling axis supports stem cell cardiac differentiation. *PLoS One*, 6 (4):e19300.
- Feng Y, Zhang Y, Xiao H. 2018. AMPK and cardiac remodelling. *Sci China Life Sci*, 61 (1):14-23.
- Folmes CD, Dzeja PP, Nelson TJ, Terzic A. 2012. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*, 11 (5):596-606.
- Fu X, Zhao JX, Zhu MJ, Foretz M, Viollet B, Dodson MV, Du M. 2013. AMP-activated protein kinase alpha1 but not alpha2 catalytic subunit potentiates myogenin expression and myogenesis. *Mol Cell Biol*, 33 (22):4517-4525.
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL. 1997. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (25):14138-14143.
- Genead R, Danielsson C, Wardell E, Kjaeldgaard A, Westgren M, Sundstrom E, Franco-Cereceda A, Sylven C, Grinnemo KH. 2010. Early first trimester human embryonic cardiac Islet-1 progenitor cells and cardiomyocytes: Immunohistochemical and electrophysiological characterization. *Stem Cell Res*, 4 (1):69-76.
- Grahame Hardie D. 2016. Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B*, 6 (1):1-19.

- Guan K, Rohwedel J, Wobus AM. 1999. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology*, 30 (1-3):211-226.
- Guan P, Sun ZM, Wang N, Zhou J, Luo LF, Zhao YS, Ji ES. 2019. Resveratrol prevents chronic intermittent hypoxia-induced cardiac hypertrophy by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Life Sci*, 233:116748.
- Hayakawa N, Shiozaki M, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Matsuura N, Gotow T. 2013. Resveratrol affects undifferentiated and differentiated PC12 cells differently, particularly with respect to possible differences in mitochondrial and autophagic functions. *Eur J Cell Biol*, 92 (1):30-43.
- Heo J, Lim J, Lee S, Jeong J, Kang H, Kim Y, Kang JW, Yu HY, Jeong EM, Kim K, Kucia M, Waigel SJ, Zacharias W, Chen Y, Kim IG, Ratajczak MZ, Shin DM. 2017. Sirt1 Regulates DNA Methylation and Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells by Antagonizing Dnmt3l. *Cell Rep*, 18 (8):1930-1945.
- Herzig S, Shaw RJ. 2017. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Holm A, Hellstrand P, Olde B, Svensson D, Leeb-Lundberg LM, Nilsson BO. 2013. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER1/GPR30) agonist G-1 regulates vascular smooth muscle cell Ca(2)(+) handling. *J Vasc Res*, 50 (5):421-429.
- Hong SH, Nah HY, Lee YJ, Lee JW, Park JH, Kim SJ, Lee JB, Yoon HS, Kim CH. 2004. Expression of estrogen receptor-alpha and -beta, glucocorticoid receptor, and progesterone receptor genes in human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Mol Cells*, 18 (3):320-325.
- Hu C, Fan L, Cen P, Chen E, Jiang Z, Li L. 2016. Energy Metabolism Plays a Critical Role in Stem Cell Maintenance and Differentiation. *Int J Mol Sci*, 17 (2):253.
- Huang YH, Sharifpanah F, Becker S, Wartenberg M, Sauer H. 2016. Impact of Arachidonic Acid and the Leukotriene Signaling Pathway on Vasculogenesis of Mouse Embryonic Stem Cells. *Cells Tissues Organs*, 201 (5):319-332.
- Imran KM, Yoon D, Kim YS. 2018. A pivotal role of AMPK signaling in medicarpin-mediated formation of brown and beige. *Biofactors*, 44 (2):168-179.
- Jang J, Huh YJ, Cho HJ, Lee B, Park J, Hwang DY, Kim DW. 2017. SIRT1 Enhances the Survival of Human Embryonic Stem Cells by Promoting DNA Repair. *Stem Cell Reports*, 9 (2):629-641.

- Karimzadeh F, Opas M. 2017. Calreticulin Is Required for TGF-beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition during Cardiogenesis in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 8 (5):1299-1311.
- Khorraminejad-Shirazi M, Farahmandnia M, Kardeh B, Estedlal A, Kardeh S, Monabati A. 2017. Aging and stem cell therapy: AMPK as an applicable pharmacological target for rejuvenation of aged stem cells and achieving higher efficacy in stem cell therapy. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*.
- Khorraminejad-Shirazi M, Dorvash M, Estedlal A, Hoveidaei AH, Mazloomrezaei M, Mosaddeghi P. 2019. Aging: A cell source limiting factor in tissue engineering. *World J Stem Cells*, 11 (10):787-802.
- Koganti S. 2015. Cardioprotective role of G-Protein Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER1). *Mol Membr Biol*, 32 (2):35-38.
- Kondratyuk TP, Park EJ, Marler LE, Ahn S, Yuan Y, Choi Y, Yu R, van Breemen RB, Sun B, Hoshino J, Cushman M, Jermihov KC, Mesecar AD, Grubbs CJ, Pezzuto JM. 2011. Resveratrol derivatives as promising chemopreventive agents with improved potency and selectivity. *Mol Nutr Food Res*, 55 (8):1249-1265.
- Korsholm AS, Kjaer TN, Ornstrup MJ, Pedersen SB. 2017. Comprehensive Metabolomic Analysis in Blood, Urine, Fat, and Muscle in Men with Metabolic Syndrome: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial on the Effects of Resveratrol after Four Months' Treatment. *Int J Mol Sci*, 18 (3).
- Kroller-Schon S, Daiber A, Schulz E. 2018. Modulation of Vascular Function by AMPK: Assessment of NO Bioavailability and Surrogates of Oxidative Stress. *Methods Mol Biol*, 1732:495-506.
- Levin ER. 2002. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids*, 67 (6):471-475.
- Levin ER. 2009. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 20 (10):477-482.
- Li P, Song X, Zhang D, Guo N, Wu C, Chen K, Liu Y, Yuan L, Chen X, Huang X. 2019. Resveratrol improves left ventricular remodeling in chronic kidney disease via Sirt1-mediated regulation of FoxO1 activity and MnSOD expression. *Biofactors*.
- Li Y, Huang J, Yan Y, Liang J, Liang Q, Lu Y, Zhao L, Li H. 2018. Preventative effects of resveratrol and estradiol on streptozotocin-induced diabetes in ovariectomized mice and the related mechanisms. *PLoS One*, 13 (10):e0204499.

- Lieben Louis X, Meikle Z, Chan L, DeGagne G, Cummer R, Meikle S, Krishnan S, Yu L, Netticadan T, Wigle JT. 2019. Divergent Effects of Resveratrol on Rat Cardiac Fibroblasts and Cardiomyocytes. *Molecules*, 24 (14).
- Liu L, Jin X, Hu CF, Li R, Zhou Z, Shen CX. 2017. Exosomes Derived from Mesenchymal Stem Cells Rescue Myocardial Ischaemia/Reperfusion Injury by Inducing Cardiomyocyte Autophagy Via AMPK and Akt Pathways. *Cell Physiol Biochem*, 43 (1):52-68.
- Long N, Long B, Mana A, Le D, Nguyen L, Chokr S, Sinchak K. 2017. Tamoxifen and ICI 182,780 activate hypothalamic G protein-coupled estrogen receptor 1 to rapidly facilitate lordosis in female rats. *Horm Behav*, 89:98-103.
- Louis XL, Raj P, Chan L, Zieroth S, Netticadan T, Wigle JT. 2019. Are the cardioprotective effects of the phytoestrogen resveratrol sex-dependent? (1). *Can J Physiol Pharmacol*, 97 (6):503-514.
- Lüllmann-Rauch R. 2009. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart Deutschland: Georg Thieme Verlag KG.
- Luo T, Kim JK. 2016. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview. *Can J Cardiol*, 32 (8):1017-1025.
- Lutz Hein HL, Klaus Mohr. 2014. Taschenatlas Pharmakologie. Georg Thieme Verlag
- Madreiter-Sokolowski CT, Gottschalk B, Parichatikanond W, Eroglu E, Klec C, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF. 2016. Resveratrol Specifically Kills Cancer Cells by a Devastating Increase in the Ca²⁺ Coupling Between the Greatly Tethered Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *Cell Physiol Biochem*, 39 (4):1404-1420.
- Maiese K. 2015. SIRT1 and stem cells: In the forefront with cardiovascular disease, neurodegeneration and cancer. *World J Stem Cells*, 7 (2):235-242.
- Majumdar S, Rinaldi JC, Malhotra NR, Xie L, Hu DP, Gauntner TD, Grewal HS, Hu WY, Kim SH, Katzenellenbogen JA, Kasper S, Prins GS. 2019. Differential Actions of Estrogen Receptor alpha and beta via Nongenomic Signaling in Human Prostate Stem and Progenitor Cells. *Endocrinology*, 160 (11):2692-2708.
- Martello G, Smith A. 2014. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30:647-675.
- Mascheck L, Sharifpanah F, Tsang SY, Wartenberg M, Sauer H. 2015. Stimulation of cardiomyogenesis from mouse embryonic stem cells by nuclear translocation of cardiotrophin-1. *Int J Cardiol*, 193:23-33.

- Mazrouei S, Sharifpanah F, Bekhite MM, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M. 2015. Cardiomyogenesis of embryonic stem cells upon purinergic receptor activation by ADP and ATP. *Purinergic Signal*, 11 (4):491-506.
- McCubrey JA, Lertpiriyapong K, Steelman LS, Abrams SL, Yang LV, Murata RM, Rosalen PL, Scalisi A, Neri LM, Cocco L, Ratti S, Martelli AM, Laidler P, Dulinska-Litewka J, Rakus D, Gizak A, Lombardi P, Nicoletti F, Candido S, Libra M, Montalto G, Cervello M. 2017. Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging (Albany NY)*, 9 (6):1477-1536.
- Meyer MR, Prossnitz ER, Barton M. 2011. The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function. *Vascul Pharmacol*, 55 (1-3):17-25.
- Mühlbrandt E. 2018. Transkript Dissertation: Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Resveratrol auf die Differenzierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Niesler CU, Myburgh KH, Moore F. 2007. The changing AMPK expression profile in differentiating mouse skeletal muscle myoblast cells helps confer increasing resistance to apoptosis. *Exp Physiol*, 92 (1):207-217.
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH. 2012. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*, 92 (3):1479-1514.
- Ozawa H, Miyagawa S, Fukushima S, Itoh E, Harada A, Saito A, Ueno T, Toda K, Kuratani T, Sawa Y. 2016. Sirtuin1 Regulates the Stem Cell Therapeutic Effects on Regenerative Capability for Treating Severe Heart Failure in a Juvenile Animal Model. *Ann Thorac Surg*, 102 (3):803-812.
- Padmasekar M SF, Finkensieper A, Wartenberg M, Sauer H. 2011. Stimulation of cardiomyogenesis of embryonic stem cell by nitric oxide downstream of AMP-activated kinase and mTOR signaling pathways. *Stem Cell Dev*.
- Park SJ, Ahmad F, Philp A, Baar K, Williams T, Luo H, Ke H, Rehmann H, Taussig R, Brown AL, Kim MK, Beaven MA, Burgin AB, Manganiello V, Chung JH. 2012. Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting cAMP phosphodiesterases. *Cell*, 148 (3):421-433.
- Price NL, Gomes AP, Ling AJ, Duarte FV, Martin-Montalvo A, North BJ, Agarwal B, Ye L, Ramadori G, Teodoro JS, Hubbard BP, Varela AT, Davis JG, Varamini B, Hafner A,

- Moaddel R, Rolo AP, Coppari R, Palmeira CM, de Cabo R, Baur JA, Sinclair DA. 2012. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*, 15 (5):675-690.
- Rahman S, Islam R. 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell Commun Signal*, 9:11.
- Ratajczak MZ, Bujko K, Wojakowski W. 2016. Stem cells and clinical practice: new advances and challenges at the time of emerging problems with induced pluripotent stem cell therapies. *Pol Arch Med Wewn*, 126 (11):879-890.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307 (5715):1625-1630.
- Revankar CM, Bologna CG, Pepermans RA, Sharma G, Petrie WK, Alcon SN, Field AS, Ramesh C, Parker MA, Savchuk NP, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. 2019. A Selective Ligand for Estrogen Receptor Proteins Discriminates Rapid and Genomic Signaling. *Cell Chem Biol*.
- Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280 (26):24731-24737.
- Russo GL, Russo M, Ungaro P. 2013. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *Biochem Pharmacol*, 86 (3):339-350.
- Sadler TW. 2003. *Medizinische Embryologie*. Georg Thieme Verlag.
- Safaeinejad Z, Nabiuni M, Peymani M, Ghaedi K, Nasr-Esfahani MH, Baharvand H. 2017. Resveratrol promotes human embryonic stem cells self-renewal by targeting SIRT1-ERK signaling pathway. *Eur J Cell Biol*, 96 (7):665-672.
- Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, Fokou PVT, Martins N, Sharifi-Rad J. 2018. Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, 6 (3).
- Savran M, Asci H, Ozmen O, Erzurumlu Y, Savas HB, Sonmez Y, Sahin Y. 2019. Melatonin protects the heart and endothelium against high fructose corn syrup consumption-induced cardiovascular toxicity via SIRT-1 signaling. *Hum Exp Toxicol*, 38 (10):1212-1223.
- Sharifpanah F, Behr S, Wartenberg M, Sauer H. 2016. Mechanical strain stimulates vasculogenesis and expression of angiogenesis guidance molecules of embryonic stem cells through elevation of intracellular calcium, reactive oxygen species and nitric oxide generation. *Biochim Biophys Acta*, 1863 (12):3096-3105.

- Sims CA, Baur JA. 2017. The grapes and wrath: using resveratrol to treat the pathophysiology of hemorrhagic shock. *Ann N Y Acad Sci*, 1403 (1):70-81.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336 (6200):688-690.
- Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, Najafi A, Mehdinejadi S, Sargolzaei Aval F. 2017. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*, 55 (1):6-23.
- Su F, Zhang W, Liu J. 2015. Membrane estrogen receptor alpha is an important modulator of bone marrow C-Kit⁺ cells mediated cardiac repair after myocardial infarction. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (5):4284-4295.
- Wang S, Song P, Zou MH. 2012. AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*, 122 (12):555-573.
- Wang YJ, Huang J, Liu W, Kou X, Tang H, Wang H, Yu X, Gao S, Ouyang K, Yang HT. 2017. IP3R-mediated Ca²⁺ signals govern hematopoietic and cardiac divergence of Flk1⁺ cells via the calcineurin-NFATc3-Etv2 pathway. *J Mol Cell Biol*.
- Wartenberg M GJ, Hescheler J, Sauer H. 1998. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab Invest*:78.
- 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 (1):212-219.
- Wu SY, Liang J, Yang BC, Leung PS. 2019. SIRT1 Activation Promotes beta-Cell Regeneration by Activating Endocrine Progenitor Cells via AMPK Signaling-Mediated Fatty Acid Oxidation. *Stem Cells*, 37 (11):1416-1428.
- Yang H, Sun W, Quan N, Wang L, Chu D, Cates C, Liu Q, Zheng Y, Li J. 2016a. Cardioprotective actions of Notch1 against myocardial infarction via LKB1-dependent AMPK signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, 108:47-57.
- Yang P, Chen X, Kaushal S, Reece EA, Yang P. 2016b. High glucose suppresses embryonic stem cell differentiation into cardiomyocytes : High glucose inhibits ES cell cardiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 7 (1):187.
- Zhang L, Zhu K, Zeng H, Zhang J, Pu Y, Wang Z, Zhang T, Wang B. 2019. Resveratrol solid lipid nanoparticles to trigger credible inhibition of doxorubicin cardiotoxicity. *Int J Nanomedicine*, 14:6061-6071.
- Zivadinovic D, Watson CS. 2005. Membrane estrogen receptor-alpha levels predict estrogen-induced ERK1/2 activation in MCF-7 cells. *Breast Cancer Res*, 7 (1):R130-144.

10 Appendix

10.1 Danksagung

Hiermit möchte mich bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. An erster Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei Frau Prof. Dr. Maria Wartenberg, die mir die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit anzufertigen und mir stets mit einem offen Ohr zur Seite stand, bedanken. Ich bedanke mich für die besonnenen Ratschläge, Anregungen und unermüdliche Unterstützung, die mein Wissen und meine Fertigkeiten auch über diese Arbeit hinaus bereichert haben.

Des Weiteren möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für *Molecular Cardiology and Stem Cell Research* Jena bedanken. Insbesondere danke ich Frau Martina Voigt und Herr Dr. Mohamed Bekhite, die mich bei den durchgeführten Experimenten mit ihrer langjähriger Erfahrung immer mit Rat und Tat unterstützt haben. Ich bedanke mich für alle Bemühungen, Einweisungen und die interessanten Gespräche. Es war eine lehrreiche und angenehme Zeit. Ich bedanke mich dafür, dass ihr mich so herzlich im Labor aufgenommen habt und mir das Gefühl gegeben habt, stets willkommen zu sein.

Gesonderter Dank gilt meinen Eltern und Schwestern für ihre Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich keine anderen als die angegebenen Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Prof. Dr. Maria Wartenberg
- Dr. Dr. Mohamed Bekhite ELSaied
- Martina Voigt
- Erik Mühlbrandt
- Dr. med Luisa Mona Kraus

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Matthias Jahnen München den 03.06.2020