

**Analyse der Herzregeneration nach mechanischer
Schädigung
des Ventrikels des adulten Molches
*Notophthalmus viridescens***

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Julia Kruse

geb. am: 21.12.1976 in: Köln

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
3. Prof. Dr. Doris Wedlich

Halle (Saale), den 06.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014292

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014292>]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Julia Kruse, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Promotion eingereicht.

Julia Kruse

Bad Nauheim, den 23.01.08

Inhaltsverzeichnis

	1. Einleitung	7
1.1	Was versteht man unter Regeneration?.....	7
1.2.	Phylogenetische Verteilung der Regenerationsfähigkeit.....	8
1.3	Modellorganismen für die Untersuchung der Herzregeneration bei Wirbeltieren.....	12
1.3.1	Der Molch.....	12
1.3.1.1	Die Anatomie des Herzens von Amphibien.....	13
1.3.1.2	Herzregeneration im Molch.....	14
1.3.1.3	<i>In vitro</i> Analyse der proliferativen Eigenschaften von Kardiomyozyten des Molches.....	15
1.3.2	Herzregeneration im Zebrafisch.....	16
1.4	Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten verschiedener Spezies und Altersstufen.....	20
1.5	Grundprinzipien der myokardialen Infarktrepaur beim Säugetier.....	22
1.5.1	Herzregeneration im Säugetier.....	23
1.6	Embryonale Herzentwicklung.....	24
1.6.1	Positiv wirkende Signalmoleküle des Endoderms: BMPs und FGFs.....	25
1.6.2	Positive und negative Signalmoleküle des Mesoderms und des Ektoderms.....	27
1.7	Therapeutische Ansätze zur Unterstützung der Herzregeneration.....	28
1.7.1	Transplantation von autologen skelettalen Myoblasten (Satellitenzellen).....	28
1.7.2	Transplantation von multipotenten adulten Stammzellen.....	29
1.7.3.	Der Einsatz von Zytokinen zur gezielten Mobilisierung von endogenen Vorläuferzellen.....	30
1.7.4	Mesenchymale Stammzellen (MSC).....	31
1.7.5	Myokardiale Vorläuferzellen.....	32
1.7.6	Embryonale Stammzellen (ES-Zellen).....	33
1.7.7	Tissue engineering (Gewebezüchtung).....	34
1.7.8	Probleme verschiedener Methoden und Strategien für deren klinischen Einsatz	35

1.8	Ziele der Doktorarbeit.....	36
2. Material und Methoden		
2.1	Material	37
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	37
2.1.2	Enzyme.....	38
2.1.3	Bakterienstämme.....	38
2.1.4	Verwendete Vektoren.....	38
2.1.5	DNA-Größenstandards.....	39
2.1.6	Verwendete Kits.....	39
2.1.7	Lösungen und Medien.....	39
2.1.8	Liste der verwendeten Primärantikörper für Westernblots.....	41
2.1.9	Liste der verwendeten Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	42
2.1.10	Liste der verwendeten Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen und Westernblots.....	43
2.1.11	Liste der verwendeten Tertiärantikörper.....	43
2.1.12	Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	44
2.2	Methoden	45
2.2.1	Sterilisation von Lösungen und Geräten.....	45
2.2.2.	Extraktion von Nukleinsäuren aus Geweben.....	45
2.2.2.1	Isolation von mRNA aus Gesamt-RNS.....	45
2.2.3	Transformation von <i>E. Coli</i> -Zellen mit Plasmiden.....	46
2.2.4.	DNS-Sequenzierung.....	46
2.2.5	Amplifikation von DNS-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase- Kettenreaktion.....	47
2.2.5.1	RT-PCR.....	47
2.2.6	cDNS-Subtraktion.....	47
2.2.7	Konstruktion einer cDNS-Bibliothek.....	49
2.2.8	Transfer von DNS auf Polyamidmembranen (Southern-Blotting).....	49
2.2.9	Markierung von Nukleinsäuren.....	50
2.2.9.1	Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten.....	50
2.2.9.2	<i>In vitro</i> Transkription zur Synthese von RNS-Proben.....	50

2.2.9.3	Fluoreszenzmarkierungen von RNS-Proben für die Chiphybridisierungen.....	52
2.2.10	Hybridisierungstechniken.....	55
2.2.10.1	Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren oder Koloniefilter.....	55
2.2.10.2	Hybridisierung der cDNS-Microarrays.....	55
2.2.10.3	<i>In situ</i> Hybridisierung auf Gewebeschnitten.....	56
2.2.11	Haltungsbedingungen der Molche.....	58
2.2.12	Operative Eingriffe am Molch.....	58
2.2.13	Einbettung von Gewebe.....	59
2.2.13.1	Plastikeinbettungen für die Anfertigungen semidünner (2 µm) Ultramikrotomschnitte.....	59
2.2.13.2	Einbettungen in Paraffin.....	60
2.2.13.3	Einbettungen in Gefriermedium.....	61
2.2.14	Antikörperfärbungen auf Gefrierschnitten.....	61
2.2.15	Proteinpräparationen und Western Blots.....	62
2.2.16	Isolation primärer Kardiomyozyten aus adulten Molchherzen.....	63
2.2.16.1	Behandlung der Kardiomyozytenkulturen mit dem Inhibitor U0126....	64
2.2.17	Mikroskopie und Fotodokumentation.....	64
	3. Ergebnisse	65
3.1	Die mechanische Schädigung des Ventrikels führt zu makroskopisch erkennbaren Läsionen.....	65
3.2	Histologische Untersuchung der Herzregeneration anhand semidünner, transversaler Plastikschnitte.....	66
3.2.1	Analyse der Mitosehäufigkeit im Verlauf der kardialen Regeneration..	69
3.3	Herstellung einer cDNS-Bibliothek als Hilfsmittel zur Untersuchung der Herzregeneration im Molch auf der transkriptionalen Ebene.....	71
3.3.1	Herstellung von Macro-und Microarrays.....	73
3.3.2	Hybridisierung der cDNS-Microarrays mit verschiedenen Gewebeproben.....	74
3.3.2.1	Deregulation verschiedener Gene während der ersten drei Wochen der Herzregeneration.....	76
3.3.3	cDNS-Subtraktion.....	80

3.3.3.1	Hybridisierung der Koloniefilter mit radioaktiv markierten subtrahierten cDNS-Sonden.....	80
3.3.3.2	Expressionsanalyse der Filterklone mittels RT-PCR auf cDNS aus verschiedenen Geweben des Molches.....	83
3.4	<i>In situ</i> Hybridisierungen auf Paraffinschnitten von geschädigten und scheinoperierten Herzen.....	84
3.4.1	<i>In situ</i> Hybridisierungen mit <i>in situ</i> Proben von verschiedenen Subtraktionsklonen auf Paraffinschnitten.....	84
3.4.2	Untersuchung der Expression ausgewählter Gene in geschädigten Molchherzen mittels <i>in situ</i> Hybridisierungen.....	89
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten.....	93
3.5.1	Reduktion der Expression von Sarkomerproteinen während der Herzregeneration im Molch.....	93
3.5.2	Die Neubildung des Myokards nach Schädigung des Ventrikels wird von Proteinen der Extrazellulären Matrix unterstützt.....	95
3.5.3	Zunahme der Expression von glattmuskelspezifischen Proteinen und von Thymosin β 4 im Verlauf der Herzregeneration.....	98
3.5.4	Expression des regenerationsassoziierten Antigen 22/18 in regenerierenden Herzen.....	102
3.6	Analysen der Proteinexpressionen während der Herzregeneration.....	104
3.6.1	Veränderungen des Phosphorylierungsstatus verschiedener Enzyme kurze Zeit nach Schädigung des Herzens.....	104
3.6.2	Untersuchung des Einflusses des MEK1/2 Inhibitors U0126 auf die Herzregeneration.....	106
3.6.2.1	Die biochemische Inhibition der MEK1/2-Kinase durch den Inhibitor U0126 ist in den ersten 30 min nach Herzscheidung detektierbar.....	107
3.6.2.2	Stärkere Aktivierung der Akt-Kinase nach Inhibition der MEK1/2 durch den Inhibitor U0126.....	109
3.6.2.3	Weitere Substratproteine des MAPK-Signalweges und oder Akt-Signalweges zeigen keine eindeutige Deregulation nach U0126 Injektionen.....	109

3.6.2.4	Untersuchung des Einflusses der U0126-Behandlungen auf die Proteinexpression von Zytoskelettproteinen und Mitose- bzw. S-Phasen Markern in geschädigten Herzen.....	112
3.6.2.5	Verringerte Expression der Aktin-Depolymerisationsfaktoren Cofilin und Destrin in U0126 injizierten Herzen vier Tage nach der Herzschädigung.....	114
3.6.2.6	Die transiente oder kontinuierliche Injektion von U0126 hat keinen Einfluss auf die Expression bzw. Phosphorylierung von Erk1/2, Histon 3 oder MyHC.....	114
3.7	Untersuchungen des Einflusses des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf Primärkulturen aus ungeschädigten Molchherzen.....	115
3.7.1	Blockierung der Mitoserate nach Inkubation von primären Molchherzzellen mit U0126.....	116
3.7.2	Verringerung der Anzahl an α -Aktinin positiven Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor U0126.....	117
	4. Diskussion.....	119
4.1	Vor- und Nachteile der Verwendung des Molches als Modellorganismus für die Analyse der Herzregeneration.....	119
4.2	Vor- und Nachteile der mechanischen Ventrikelschädigung.....	120
4.3	Mitotisch aktive Kardiomyozyten- ein entscheidender Vorteil von Molchen und Zebrafischen gegenüber Säugetieren ?.....	121
4.4	Histologische Untersuchungen belegen eine erfolgreiche Regeneration des Molchherzens innerhalb von 12 Wochen	123
4.5	Herstellung einer cDNS-Bibliothek und die Analyse differentiell exprimierter Gene.....	124
4.5.1	Die Analyse differentiell exprimierter Gene ergab große Veränderungen innerhalb der Expression von Transkripten die für Zytoskelettproteine codieren.....	125
4.5.2	Zunahme der Expression von glattemuskelspezifischen Proteinen.....	126
4.5.3	Zunahme der Expression von HSP-27 im regenerierenden Molchherzen.....	127
4.5.4	Zunahme der Expression von Thymosin β 4 im regenerierenden Molchherzen.....	128

4.6	Analyse der Subtraktionsklone.....	130
4.6.1	Dominanz der Expression der zu der glattmuskelspezifischen Myosin-regulatorischen-leichten-Kette homologen cDNS während der Macroarray-Hybridisierungen.....	130
4.6.2	Entstehung verschiedener Expressionsmuster bei den <i>in situ</i> Hybridisierungen mit den Subtraktionsklonen TB14 und TB25.....	130
4.6.3	<i>In situ</i> Hybridisierungen mit dem β -Aktin homologen Subtraktionsklon TB10.....	131
4.6.4	Distinkte Expression des NADH-Dehydrogenase Homologs TB8 ?...132	
4.7	Das regenerationsassoziierte Antigen 22/18 und Zytokeratin 18 werden auch im regenerierenden Herzen exprimiert.....	132
4.8	Aktivierung verschiedener Signalkaskaden kurze Zeit nach Schädigung des Ventrikels.....	134
4.9	Einfluss des MEK1/2 Inhibitors U0126 auf die Proteinexpressionen und Phosphorylierungen verschiedener Enzyme.....	134
4.9.1	Stärkere Aktivierung der Akt-Kinase nach U0126 Injektion in geschädigte Herzen.....	135
4.9.2	Zunahme der MyHC-Expression nach U0126 Behandlung.....	135
4.9.3	Die transiente oder kontinuierliche Injektionen von U0126 haben keinen signifikanten Einfluss auf nachfolgende Phosphorylierungen oder Proteinexpressionen.....	136
4.9.4	In vitro Analyse des Effektes von U0126 auf kardiale Molchzellen...137	
4.10	Wird die Regenerationsfähigkeit durch die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten oder von Stammzellen ermöglicht?.....	139
4.11	Mögliche Gründe für das limitierte regenerative Potenzial der Säugetiere.....	140
5.	Ausblick	141
6.	Zusammenfassung	143
7.	Literaturverzeichnis	145
8.	Anhang	158
8.1	Abkürzungsverzeichnis.....	158
8.2	Negativkontrollen für Immunfluoreszenzfärbungen.....	160
8.3	Lebenslauf.....	161
8.4	Publikationen und Tagungsbeiträge.....	162

1. Einleitung

1.1 Was versteht man unter Regeneration?

Regenerationsprozesse finden im weitesten Sinne auf allen biologischen Organisationsebenen statt. Alle Organismen besitzen mehr oder weniger ausgeprägte regenerative Fähigkeiten. Im Allgemeinen versteht man unter Regeneration vor allem solche Mechanismen, die zum Ersatz oder zur Reparatur von verletzten Körperteilen führen. Dabei ist die Wundheilung fast allen, die extensive epimorphe Regeneration hingegen nur wenigen Spezies vorbehalten. Unter epimorpher Regeneration versteht man eine komplette funktionelle und morphologische Wiederherstellung des verletzten Körperteils. Die Fähigkeit zur epimorphen Regeneration umfasst hauptsächlich jene Körperteile, die besonders häufig Verletzungen ausgesetzt sind (z.B. die Schwänze der Salamander). Aber auch weniger verletzungsgefährdete Organstrukturen wie zum Beispiel die Linse des Salamanderauges verfügen über bemerkenswerte regenerative Kapazitäten. Währenddessen fehlt beispielsweise Insekten und Knorpelfischen die Fähigkeit zu epimorpher Regeneration völlig (Dinsmore, 2001).

Sowohl Ein- und Vielzeller, als auch wir Menschen müssen angemessen auf akute Verletzungen reagieren können. Äußere Einflüsse wie Verletzungen oder Amputationen lösen die so genannten reparativen Regenerationsprozesse aus. Dabei müssen zunächst geschädigte Gewebe und zelluläre Bruchstücke entfernt werden, bevor die eigentliche Regeneration stattfinden kann (Dinsmore, 2001).

In der Wissenschaft wird zwischen verschiedenen Formen der Reparatur unterschieden. Die Wundheilung entspricht einer minimalen Form der Regeneration. Sie geht bei Säugern in der Regel mit Vernarbungen einher falls die Basalmembran durchbrochen wird. Geweberegeneration hingegen führt bereits zu einem besseren Ersatz von geschädigten Zellen und Geweben. Aus der bereits erwähnten epimorphen Regeneration resultiert die vollständige Wiederherstellung der zerstörten Struktur und ihrer Funktion (Dinsmore, 2001).

1.2 Phylogenetische Verteilung der Regenerationsfähigkeit

Die Fähigkeit zur Regeneration ist bei den Metazoen viel stärker verbreitet als gemeinhin angenommen. Fast jeder Stamm besitzt eine oder mehrere Spezies, die fehlende Körperteile oder in manchen Fällen sogar komplette neue Organismen aus Teilen ihres Körpers regenerieren können (Alvarado, 2000). Es gibt einige Stämme wie die Rotiferen und Nematoden bei denen die Anzahl der mitotischen Zellteilungen bereits während der Embryonalentwicklung festgelegt ist (Zellkonstanz) und somit kaum eine Möglichkeit zur Regeneration oder asexuellen Reproduktion im adulten Organismus besteht. Auch innerhalb nahverwandter Spezies wie den Schnurwürmern *Lineus ruber* und *Lineus viridis*, die sich makroskopisch kaum unterscheiden lassen, kann sich nur *Lineus ruber* bidirektional regenerieren und der andere Schnurwurm scheinbar nicht (Brockes et al., 2001). Urodele Amphibien können komplette Gliedmaßen regenerieren während Planarien neue Organismen aus 1/279 ihres Körpers bilden können (Alvarado, 2000). Die große Variabilität und die evolutionären Distanzen zwischen den Tieren, welche regenerative Fähigkeiten besitzen, sind erstaunlich und werfen die Frage auf, ob es verschiedene Arten der Regeneration gibt und jeder Stamm womöglich seine eigenen Strategien „entwickelt“ hat? oder ob die Mechanismen der Regeneration auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen? Um diese Frage zu beantworten muss man einen Blick auf die bereits bekannten Strategien der Regeneration werfen (Alvarado, 2000).

Von T.H. Morgan (1866-1945) wurde zunächst eine Unterteilung in zwei Gruppen unternommen:

1. Regeneration, die in Abwesenheit von aktiver Zellproliferation stattfindet (*Morphallaxis*).
2. Regeneration, die Zellproliferation benötigt (*Epimorphose*).

Ein prominentes Beispiel für morphallaktische Regeneration repräsentiert die Hydra. Dabei entdeckte Abraham Trembley (1710-1784), dass abgetrennte Teile der Hydra allein durch die Umgestaltung der bereits existierenden Zellen jedoch ohne neue Zellmasse zu bilden, regenerieren.

Die epimorphe Regeneration, bei der Zellproliferation notwendig ist, wird nochmals in zwei breite Kategorien unterteilt:

1. Regeneration ohne Blastembildung
2. Regeneration basierend auf der Ausbildung eines Blastems

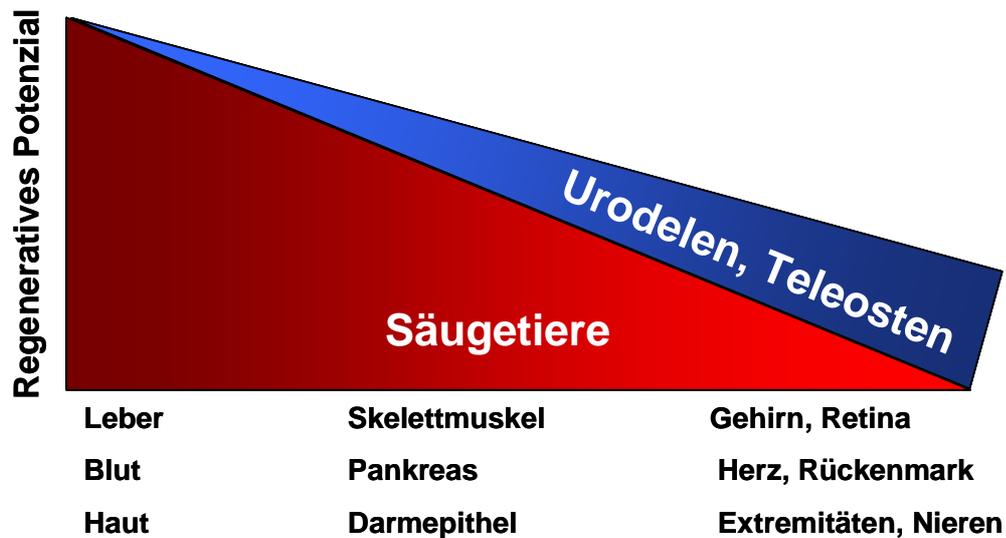


Abb.1: Unter den Vertebraten verfügen die Nicht-Säuger über ein höheres regeneratives Spektrum als die Säugetiere Viele Gewebe der Säugetiere wie die Leber, das Blut, die Haut, der Skelettmuskel, der Darm und die Bauchspeicheldrüse verfügen über bedeutende regenerative Fähigkeiten. Demgegenüber können Strukturen des Zentralnervensystems wie das Gehirn, das Rückenmark und die Retina der Säugetiere nicht regenerieren. Gleiches gilt auch für Niere, Herz und Extremitäten. Bestimmte Urodelen und/ oder Teleosteen können jedoch auch schwere Schädigungen der zuletzt genannten Organe und Strukturen durch Regeneration beheben. Wie und Warum diese unterschiedliche regenerative Fähigkeit dieser Gewebe nur bei einigen Stämmen während der Evolution erhalten blieb, ist nach wie vor ungeklärt. (Verändert nach (Poss, 2006))

Die Regeneration ohne Blastembildung erfolgt dann entweder mittels:

- der Transdifferenzierung des bestehenden Gewebes in die fehlende Gewebestruktur
- begrenzte Dedifferenzierung und Proliferation der überlebenden Zellen in dem verletzten oder amputierten Organ
- durch Zellteilung und anschließender Differenzierung der im geschädigten Gewebe ansässigen Stammzellen.

Beispiele für die stammzellvermittelte Regeneration finden sich zum Beispiel auch beim Menschen im Fall der Knochen- (Einhorn and Lee, 2001) und der Muskelregeneration (Shi and Garry, 2006). Im Gegensatz dazu beruht die blastemische Regeneration auf der Ausbildung einer spezialisierten Struktur, des sogenannten Regenerationsblastems. Diese Struktur weist große Ähnlichkeit zu der frühen embryonalen Extremitätenknospe während der Embryogenese der Wirbeltiere auf. Das Blastem lässt sich in zwei klar definierte Bereiche aufteilen: Einer äußeren Schicht von Zellen epithelialen Ursprungs, welche den gesamten Stumpf nach außen begrenzen und der darunter befindlichen Zellmasse mesenchymalen Ursprungs. Die Ausbildung des Blastems kann je nach Organismus wenige Stunden bis hin zu einigen Tagen dauern. Die fehlenden Strukturen werden letztlich durch Differenzierung des Blastems ersetzt. Diese Art der Regeneration findet

man gewöhnlich bei den Stämmen Planaria, Mollusca, Echinodermata, Urochordata und bei der Extremitäten- und Schwanzregeneration einiger Vertebraten.

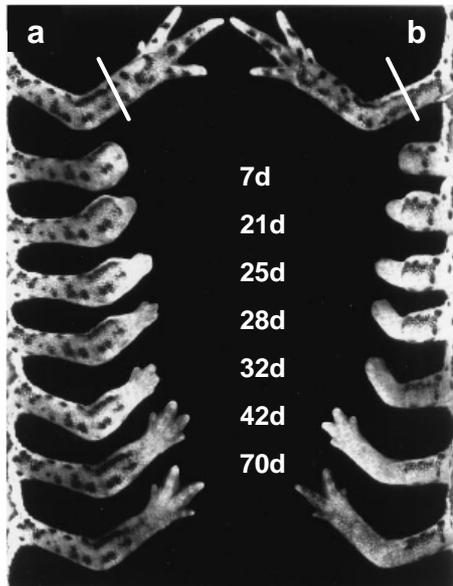


Abb.2: Beispiel für die Extremitätenregeneration nach Amputation unter Ausbildung eines Blastems

Die Fotografien zeigen die Regeneration einer Vorderextremität des Molches (*Nototophthalmus viridescens*) nach (a) distaler bzw. (b) proximaler Amputation einer im Zeitverlauf von 7d, 21d, 25d, 28d, 42d, und 70d. Die Extremitätenregeneration des Molches stellt ein klassisches und gut untersuchtes Beispiel für die Regeneration mit Blastembildung dar. (Verändert nach (Brockes, 1997))

Die bereits 1927 von Korschelt festgestellten großen strukturellen Ähnlichkeiten von Regenerationsblastemen zwischen den verschiedenen Stämmen und das häufige Vorkommen von Regenerationsblastemen im Bereich der epimorphen Regeneration lassen eine ursprüngliche Befähigung aller Metazoen zur Regeneration vermuten. Allerdings erklärt diese Theorie nicht, warum die Fähigkeiten zur Regeneration mittels Blastembildung als evolutionär konserviertem Merkmal innerhalb desselben Stammes nur einigen Spezies vorbehalten geblieben ist und bei anderen nahverwandten Arten ganz oder teilweise verloren gegangen ist.

Goss versuchte später diesen scheinbaren Widerspruch von Korschelts Theorie dadurch zu erklären, dass das Merkmal "Regeneration" während der Entwicklung der Metazoen möglicherweise negativ selektiert worden sein könnte. Damit ließen sich zum einen die Konservierung von blastemischen Strukturen zwischen weit entfernten Stämmen, sowie die differentielle Verteilung dieses Merkmals zwischen verschiedenen taxonomischen Gruppen innerhalb eines Stammes erklären. Warum das Merkmal Regeneration negativ selektiert worden sein könnte bleibt ungeklärt.

Vergleiche zwischen der bereits besser erforschten Embryonalentwicklung und der Regeneration bei Wirbeltieren geben deutliche Hinweise auf gemeinsam genutzte regulatorische Prozesse und Gene, die beispielsweise eine Rolle für die Morphogenese bei

der Extremitäten- oder Augenentwicklung und –der Extremitäten- oder Augenregeneration spielen (Alvarado, 2000).

Pax 6 ist ein solcher Hauptregulator der Augenentwicklung und seine Expression konnte unter anderem während der Augenregeneration des Plathelminthen *Dugesia(G) tigrina* (Callaerts et al., 1999), bei der Augenentwicklung beim Axolotl und der Linsenregeneration des Molches *Notophthalmus viridescens* (Rio-Tsonis et al., 1995) sowie in *in vitro* Transdifferenzierungsexperimenten von primären pigmentierten Epithelzellen aus der Iris von Hühnern zu Linsenzellen nachgewiesen werden (Kosaka et al., 1998).

Für den Verlust der Regenerationsfähigkeit zwischen nahverwandten Spezies gibt es zwei verschiedene kontroverse Hypothesen. So geht Goss von einer adaptiven Bedeutung der Regeneration aus und führt als Beispiel die unterschiedliche Regenerationsfähigkeit polychaeter und oligochaeter Würmer an. Beide können ihre hinteren Körpersegmente regenerieren, aber nur die röhrenförmige Höhlen bewohnenden polychaeten Würmer können auch vordere Körpersegmente ersetzen. Vermutlich sind die Höhlenbewohner anfälliger für Amputationen und die Fähigkeit zur Regeneration bringt ihnen somit einen selektiven Vorteil.

Alternativ postulierte Morgan (1901), dass es sich bei der Regeneration nicht um einen primären Mechanismus handeln würde, sondern lediglich um ein Nebenprodukt anderer Mechanismen. Einen Hinweis auf diese Theorie geben zum Beispiel die auffälligen Ähnlichkeiten der Regeneration mit der Ontogenese, der asexuellen Reproduktion oder der Metamorphose. Die Ontogenese besteht aus der hierarchischen Abfolge von Programmen, die gegebenenfalls als “Programmmodule“ auch bei der Regeneration genutzt werden und “sekundär“ aktiviert werden. Dabei steht die Regeneration in dieser Hypothese nicht unter selektivem Druck sondern ist aus anderen Gründen, wie zum Beispiel durch Mutationen, die dem primären Mechanismus auf Kosten des Sekundären einen selektiven Vorteil verschaffen, verloren gegangen. Eindeutige Beweise fehlen aber bisher für beide Ansichten (Brockes et al., 2001).

Um die evolutionäre Beziehung zwischen der Ontogenese und der Regeneration vollständig aufzuklären, bedarf es weiterer molekularer Beweise von verschiedenen Organismen wie Hydra, Planarien und Salamandern (Alvarado, 2000).

1.3 Modellorganismen für die Untersuchung der Herzregeneration bei Wirbeltieren

1.3.1 Der Molch

Molche sind aquatische, urodele Amphibien und gehören zur Familie der Salamander. Drei Molchspezies werden in der experimentellen Biologie bisher untersucht: *Notophthalmus viridescens*, der grünliche Wassermolch aus den USA, *Pleurodeles walt*, der iberische Molch und *Cynops pyroghaster*, der japanische Molch. Bei dem ebenfalls häufig verwendeten Versuchstier *Ambystoma mexicanum* handelt es sich um einen neotenen larvalen Salamander und nicht um einen Molch.

Während ihres Lebens durchlaufen die Molche drei verschiedene Stadien:

Als Larven leben sie zunächst im Wasser. Nach ihrer vollständigen Metamorphose verlieren sie ihre Kiemen und verbringen die nächsten ein bis drei Jahre als so genannte rote Efteln (im Falle von *Notophthalmus viridescens*) bis zu ihrer Geschlechtsreife an Land. Nach dieser zweiten Metamorphose kehren die adulten olivgrünen rotgepunkteten Molche wieder ins Wasser zurück (Brockes and Kumar, 2005).

Vor der Zeit des *Xenopus* war der Molch als ein beliebtes Versuchstier für die Untersuchung der Embryologie von Amphibien. Ihre Zellkerne besitzen einen großen haploiden DNS-Gehalt (20-40 pg) und verfügen über große Zellen, Zellkerne und Chromosomen einschließlich der bis zu einen Millimeter großen Lampenbürsten-Chromosomen in wachsenden Oocyten. Besonders zeichnen sie sich jedoch durch ihr breites regeneratives Potential aus.

Adulte Molche sind in der Lage ihre Extremitäten, ihren Schwanz inklusive des Rückenmarks und der sensorischen Ganglien, Unter- und Oberkiefer, die Linse und Retina der Augen, den Darm und Teile des Herzens zu regenerieren (Brockes and Kumar, 2005).

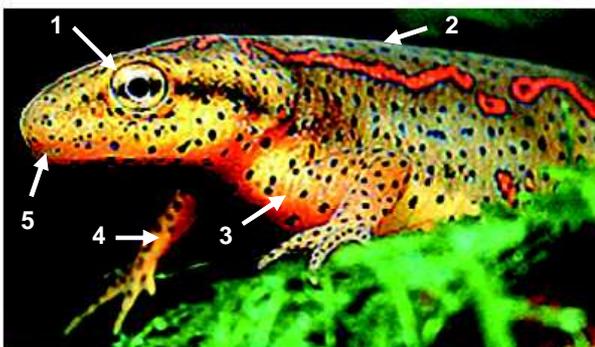


Abb.3: Molche wie der grünliche Wassermolch (*Notophthalmus viridescens*) verfügen über ein breites regeneratives Spektrum

Der adulte Molch kann unter anderem die Linse und die Retina (1), das Rückenmark (2), Teile des Herzens (3), die Extremitäten (4) sowie Ober- und Unterkiefer regenerieren. (Verändert nach (Brockes and Kumar, 2005)

1.3.1.1 Die Anatomie des Herzens von Amphibien

Im Großen und Ganzen ist die Anatomie des Herzens bei allen Amphibien ähnlich und variiert hauptsächlich in den relativen Proportionen und der inneren Struktur. Das Herz setzt sich aus drei Kammern zusammen: zwei Atrien und einem Ventrikel. Bei den meisten Amphibien ist der linke Ventrikel kleiner als der rechte. Die Aortenbögen erfüllen verschiedene Aufgaben, wobei nur einige adulte Salamander über die komplette Anzahl der Aortenbögen verfügen. Der karotide Bogen dient der Blutversorgung des Kopfes während der systemische Bogen den Körper inklusive Teile des Kopfes, außer der Lunge und des Pharynx, versorgt. Der pulmonale Bogen transportiert Blut in die Lungen und die Wände des Pharynx. Das Herz selbst bezieht seine Nährstoffe und Sauerstoff aus dem Blut, welches durch das Herz hindurchfließt. Im Allgemeinen läuft der Herzkreislauf bei Amphibien folgendermaßen ab. Das Blut verlässt den Ventrikel und das rechte Atrium auf unterschiedlichen Wegen in Richtung Kopf, Haut und Lunge. Zurückkommendes Blut aus dem Kopf, dem Körper und der Haut tritt über den Sinus venosus in das linke Atrium ein. Das Blut aus der Lunge kehrt über die Lungenvene in diesen zurück. Zusätzlich findet in manchen Spezies eine Trennung zwischen deoxygeniertem und oxygeniertem Blut durch ein ventrikuläres Septum (und einem interatriellen Septum bei manchen Salamandern) statt. Bei anderen Salamandern findet keine Trennung des Blutes statt, so dass sich das oxygenierte Blut der Haut und der Lunge mit dem deoxygenierten Blut des Körpers mischt, bevor es das Herz auf dem Weg zu den verschiedenen Körperteilen wieder verlässt. Diese verschiedenen Arten der kardialen Zirkulation hängen mit den unterschiedlichen Lebensweisen der Salamander zusammen. Eine andere Verteilung des Blutes ist beispielsweise besonders für aquatische Salamander die sauerstoffarme Gewässer bewohnen wichtig (Duellmann, 1994).

Der Ventrikel von Molchen ist stark trabekuliert. Die Trabekel setzen sich vorwiegend aus Kardiomyozyten, gelegentlich Fibroblasten und anderen Elementen wie Nervenfasern und Mastzellen zusammen. Von innen werden die Trabekel von einem einschichtigen Endokard ausgekleidet (Oberpriller and Oberpriller, 1974). Außerdem findet man im Molchherzen Melanozyten, Granulozyten, und Monozyten und im Gegensatz zum Menschen kernhaltige Erythrozyten.

1.3.1.2 Herzregeneration im Molch

Zur Untersuchung der Regenerationsfähigkeit von Molchherzen wurden entweder kleine Stücke eines der beiden Atrien oder ca. ein Achtel des Ventrikels amputiert. Dabei wurde die Wunde zunächst durch Bildung eines Blutgerinnsels verschlossen. Im weiteren Verlauf traten dann Koagulationsnekrosen auf, Makrophagen wurden aktiviert, die regenerative Aktivität der Kardiomyozyten stimuliert und Bindegewebe gebildet. Mit Hilfe von lichtmikroskopischen Autoradiographien, konnten sowohl in den Randzonen der Wunde im Atrium, als auch im Ventrikel DNS-Synthesen und Mitosen in Myozyten nachgewiesen werden. Im Ventrikel und Atrium begann die Proliferation etwa zehn Tage nach erfolgter Amputation (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974). Außer von Myozyten wurde ^3H -Thymidin auch von Fibroblasten, endokardialen Zellen, epikardialen Zellen und Blutzellen inkorporiert. 20-30 Tage nach der partiellen Ventrikelamputation konnten lichtmikroskopisch in der Randzone und innerhalb der hauptsächlich aus Bindegewebe bestehenden Wunde vereinzelte kardiale Fasern beobachtet werden, die sich durch weniger und kleinere Myofibrillen auszeichneten. Die Autoren zogen aus diesen Beobachtungen den Schluss, dass die Regeneration des Molchherzen nicht komplett erfolgt, sondern in einem halbfunktionellen Gewebe bestehend aus einem Gemisch von kontrahierenden Myozyten und zurückbleibenden Bindegewebe resultiert. In einem anderen Experiment wurde das aus der Herzspitze amputierte Gewebe zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend zur Vergrößerung des reaktiven Wundbereichs auf die Wunde zurückgegeben. Ein kleiner Teil des Herzmuskeltransplantats konnte sich in die Wunde integrieren. Die stärkste proliferative Aktivität der retransplantierten Kardiomyozyten wurde nach 16 Tagen beobachtet. Diese während der DNS-Synthese mit ^3H -Thymidin markierten Zellen wiesen einen Zusammenbruch der Myofibrillenstruktur auf. In mitotischen Zellen waren die Myofibrillen zerstreut und Z-Banden fehlten. Nach 70 Tagen waren die Myofibrillenstrukturen und die interzellulären Verbindungen der Transplantate komplett wiederhergestellt (Bader and Oberpriller, 1979). Dieses Experiment zeigte deutlich, dass Molchherzen die Fähigkeit zur effektiven Erneuerung von geschädigtem Myokard besitzen.

1.3.1.3 *In vitro* Analyse der proliferativen Eigenschaften von Kardiomyozyten des Molches

Bettencourt-Dias et al. (2003) analysierten die proliferativen Eigenschaften einzelner Kardiomyozyten mittels Time-Lapse-Mikroskopie *in vitro*. Dabei stellte sich heraus, dass 75% der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus eintraten und wiederum 76% dieser Zellen anschließend auch die Mitose durchliefen. Ein weiterer Anteil von 29 % dieser Zellen durchlief eine oder mehrere komplette Zellteilungen (inklusive Karyokinese und Zytokinese) und produzierte mononukleäre schlagende Tochterzellen. Manche aus der Zellteilung hervorgegangene Klone zeigten schwächere und ungeordnete Anti-MyHC-Färbungen im Vergleich zu sich nicht teilenden Zellen. Obwohl die proliferativen Fähigkeiten zwischen verschiedenen Klonen stark variierten, zeigten Tochterzellen interessanterweise gleiche Tendenzen zu weiteren symmetrischen Zellteilungen sowie eine vergleichbare Dauer des Zellzyklus. Weitere 31% der ursprünglichen Kardiomyozyten brachten als Folge unvollständiger Zellteilungen binukleäre Zellen hervor. Von diesen durchliefen manche jedoch im weiteren Verlauf eine weitere S-Phase und vollzogen danach eine komplette Mitose inklusive kompletter Zytokinese.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Kardiomyozyten ein heterogenes Zellteilungspotential besitzen. Nur eine Subpopulation der adulten Kardiomyozyten besitzt die Fähigkeit zur kompletten Zellteilung. Diese Subpopulation ist möglicherweise maßgeblich an der Herzregeneration des Molches beteiligt. Sie weist jedoch weder morphologisch noch in ihrem Kontraktionsverhalten Unterschiede zu den anderen Myozyten auf (Bettencourt-Dias et al., 2003) und könnte auch ein *in vitro* Artefakt sein.

Soonpaa et al. (1994) hatten zuvor die Wirkung verschiedener Substanzen und Wachstumsfaktoren auf die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten *in vitro* untersucht. Am stärksten erhöht wurde dabei die DNS-Synthese durch den Zusatz von konditioniertem Medium von ventrikulären Myozyten sowie dem Zusatz von 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA). Ebenfalls positive Einflüsse übte der Zusatz von saurem und basischem FGF (Fibroblast-growth-factor) und konditioniertem Medium von kardialen Nicht-Myozyten aus. Zu einer Hemmung der Proliferation führten hingegen Zusätze wie TGF- β (Transforming Growth Factor- β), konditioniertes Medium von Nicht-Myozyten mit Heparin sowie TGF- β und PDGF (Platelet Derived Growth Factor) in Kombination. Aus diesen Zellkulturexperimenten lässt sich ableiten, dass die

Proliferationsfähigkeit der Myozyten vermutlich sowohl auf autokrine, als auch auf parakriner Stimulation beruht (Soonpaa et al., 1994).

Die besondere Fähigkeit adulter Kardiomyozyten zur Regeneration des Herzens beizutragen, wurde außerdem von Experimenten unterstrichen, in denen das Potenzial von Kardiomyozyten zur Transdifferenzierung in verschiedene Zelltypen nachgewiesen werden konnte. So konnte zum einen eine starke Reduktion von Sarkomerproteinen wie α -Myosin-Schwere-Kette und Troponin T innerhalb des Myokards nach mechanischer Schädigung des Ventrikels beobachtet werden. Diese Beobachtung weist auf eine partielle Dedifferenzierung der adulten Kardiomyozyten während der Regeneration hin. Zum anderen verloren in regenerierende Extremitätenstümpfe transplantierte Kardiomyozyten ihren kardialen Phänotyp und nahmen stattdessen ein skelettmuskuläres oder chondrozytales Schicksal an. Darüber hinaus exprimierten die transplantierten Kardiomyozyten phosphoryliertes Histon 3, ein weiteres Indiz für ihre aktive Beteiligung an der Extremitätenregeneration mittels Proliferation. *In vitro* Kultivierungen und Kontrolltransplantationen der Kardiomyozyten in ungeschädigte Extremitäten belegten die Notwendigkeit des Kontaktes der transplantierten Zellen zu bisher noch unbekanntem Faktoren, die sich in Folge der Schädigung im Gewebe angesammelt haben, um Dedifferenzierungen und Reprogrammierungen zu ermöglichen (Laube et al., 2006).

Die Zellteilungsfähigkeit adulter Kardiomyozyten des Molches unterscheidet diese von Säugerzellen und die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen ist essentiell für die Entwicklung neuer Strategien zur Initiation bzw. Verbesserung der Herzregeneration beim Säugetier (Bettencourt-Dias et al., 2003).

1.3.2 Herzregeneration beim Zebrafisch

Außer vom Molch, ist bisher nur vom Zebrafisch als weiterem Vertebraten die Fähigkeit zu epimorpher Regeneration bekannt. Aufgrund seiner vergleichsweise einfachen genetischen Manipulierbarkeit und der vielen verfügbaren molekularen und genetischen Werkzeuge, stellt der Zebrafisch ein beliebtes Forschungsobjekt dar. Ähnlich wie nach der Amputation der Herzspitze des Molches, wird auch beim Zebrafisch, allerdings bereits innerhalb einiger Sekunden, die Amputationsfläche von einem Blutgerinnsel verschlossen. Zwei bis vier Tage später werden die Erythrozyten dann durch Fibrin ersetzt. Innerhalb der folgenden neun bis 30 Tage umgeben Kardiomyozyten das

Gerinnsel, wandern dort ein und ersetzen dieses schließlich. Nach 60 Tagen ist kein Fibrin mehr erkennbar und das ventrikuläre Gewebe und die Kontraktilität erscheinen normal. Die Herzspitze besteht nun aus neugebildetem kompaktem Myokard (Poss et al., 2002b).

Markierungsexperimente mit BrdU zeigten auch in diesem System eine verstärkte proliferative Aktivität der Kardiomyozyten mit einem Maximum nach 14 Tagen. Bei den markierten Myozyten handelte es sich vorwiegend um zirkulierende Zellen in der Nähe des kompakten Myokards an den lateralen Wundrändern. Mit Hilfe der BrdU-Inkorporation konnte festgestellt werden, dass nach zunächst disperser Kardiomyozytenproliferation, sich ein Gradient von proliferierenden Zellen ausbildet, der am höchsten in den epikardialen Myozyten ist, welche kontinuierlich nach innen verdrängt werden, um die Amputationsstelle aufzufüllen (Poss et al., 2002b).

Um zu testen, ob die Fähigkeit zur Herzregeneration im Zebrafisch im Gegensatz zur bei den Vertebraten viel stärker verbreiteten Vernarbung, von der Proliferationsfähigkeit der Kardiomyozyten abhängt, wurde die Regenerationsfähigkeit eines im *mps1* Gen mutierten Zebrafischs untersucht. *Mps1* ist eine mitotische Kontrollpunkt Kinase, die in vielen proliferativen Zelltypen stark exprimiert wird und auch während der Flossenregeneration einen Rolle spielt (Poss et al., 2002a). *Mps1-mRNS* konnte mittels *in situ* Hybridisierung in einigen wenigen Myozyten in der Nähe der Wunde detektiert werden. In *mps1* Mutanten wurde nach Amputation der Herzspitze ein normales Fibringerinnsel gebildet. Im weiteren Verlauf der Regeneration blieben die Fibrinablagerungen zurück und es entstanden große Bindegewebsnarben anstelle einer neuen kompakten Ventrikelwand (Poss et al., 2002b). Folglich scheint die proliferative Aktivität der Kardiomyozyten entscheidend zur epimorphen Regeneration beizutragen.

Da wie bereits erwähnt, Ontogenese und Regeneration gewisse Parallelen aufweisen, ist von Raya und Kollegen die Expression von kardialen Differenzierungsmarkern während der Regeneration untersucht worden. Der früheste bekannte Marker der kardialen Abstammung ist *Nkx2.5* (Schwartz and Olson, 1999). *Nkx2.5* wird im ungeschädigten adulten Zebrafischherz schwach exprimiert. Im Verlauf der Regeneration hingegen, konnte kein verändertes Expressionslevel beobachtet werden (Raya et al., 2003). *Tbx5*, ein weiterer früher Herzmarker (Begemann and Ingham, 2000), zeigte ebenfalls keine Veränderung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die *de novo* generierten Kardiomyozyten vermutlich nicht aus undifferenzierten Stammzellen oder dedifferenzierten Blastemzellen gebildet wurden, sondern dass vielmehr differenzierte

Kardiomyozyten in den Zellzyklus zurückkehren und proliferieren und somit die zelluläre Grundlage für die epimorphe Herzregeneration bilden (Raya et al., 2003).

Von einigen Mitgliedern der *Msx* Familie der Homeodomänen besitzenden Transkriptionsfaktoren ist die Fähigkeit zur Unterdrückung von Differenzierungsprozessen während der Entwicklung und Regeneration bekannt (Koshiba et al., 1998; Nechiporuk and Keating, 2002; Odelberg, 2002). Außerdem konnte eine verstärkte Expression von *msxB* und *msxC* während der Flossenregeneration nachgewiesen werden (Akimenko et al., 1995). Die Analyse des Einflusses dieser Faktoren auf die Herzregeneration ergab auch hier eine starke, bereits nach 3 Tagen einsetzende Expression in der myokardialen Randzone der Läsion. In der zweiten Woche erreichte die Expression ihr Maximum und nahm anschließend wieder vollständig ab. Im ungeschädigten adulten Herzen und während der Herzentwicklung konnte dagegen keine Expression von *msxB* und *msxC* nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen unter anderem auf eine Eignung der Mitglieder der *Msx* Genfamilie als gewebeunabhängige Marker für regenerative Prozesse hin (Raya et al., 2003). Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe (Zimmermann et al.) weisen jedoch auf eine Expression von *Msx*-Genen auch im ungeschädigten Myokard hin, was zu gewissen Zweifeln an den publizierten Daten führt.

Die Beobachtungen, dass Gene die während der Herzentwicklung eine Rolle spielen keine veränderte bzw. verstärkte Expression während der Herzregeneration zeigen und ebenfalls Gene, die während der Regeneration verstärkt exprimiert werden, während der Herzentwicklung keine große Rolle spielen, führen zu der Frage, ob Regeneration und Embryonalentwicklung auf unterschiedlichen genetischen Programmen basieren. Zur Beantwortung dieser Frage wurde ~ 50% der Atrien von 24-hpf Embryonen amputiert und die Expression von *msxB* und *msxC* nach drei, sieben und 24 Stunden mittels *in situ* Hybridisierung analysiert. *Msx*-Transkripte wurden bereits nach 3 Stunden in dem verbleibenden kardialen Schlauch stark exprimiert und blieben auch nach sieben bzw. 24 Stunden noch nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Expression von molekularen Regenerationsmarkern nicht nur auf adulte Zellen zutrifft, sondern auch embryonale, kardiale Zellen in der Lage sind ein genetisches Regenerationsprogramm zu aktivieren (Raya et al., 2003).

Im Rahmen eines großen Screenings mittels *in situ* Hybridisierungen zur Identifizierung von Faktoren, die in Regenerationsmechanismen involviert sind, wiesen Komponenten des *Notch* Signalweges eine veränderte Expression auf. Diese Faktoren sind bisher nicht mit epimorpher Regeneration sondern vielmehr bei Verletzungen der Zähne (Mitsiadis et al.,

1999) und der Arterien, d.h. vorwiegend mit endothelialen Verletzungsreaktionen in Zusammenhang gebracht worden (Lindner et al., 2001). Bei dem im Screening identifizierten Kandidaten handelt es sich um *notch1b* einem der beiden Zebrafischorthologen vom *Drosophila Notch*. Die Expressionsanalyse von *notch1b* im adulten Zebrafischherz ergab eine schwache Expression, die mit endokardialer Expression deckungsgleich war. Einen Tag nach der Amputation der Herzspitze fand man bereits Expressionen im gesamten Endokard und besonders stark in dem die Läsion umgebenden Areal. Nach einer Woche nahm die Expression ab, bis sie nach zwei Wochen das Kontrollniveau wieder erreicht hat.

Auch der *notch1b* Ligand *deltaC*, der während der Embryonalentwicklung in arteriellem Endothel exprimiert wird (Smithers et al., 2000), zeigt räumlich das gleiche, jedoch zeitlich ein auf die erste Woche begrenztes Expressionsmuster. Beide Faktoren werden interessanterweise nicht während der Herzentwicklung exprimiert (Raya et al., 2003).

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob es sich bei der entdeckten Beteiligung des Notch Signalweges um eine endotheliale Verletzungsreaktion oder um einen echten Beitrag zur epimorphen Regeneration handelt, wurde die Expression dieser beiden Faktoren auch während der kaudalen Flossenregeneration untersucht. Während die Faktoren in Kontrollflossen nicht exprimiert wurden, konnte bereits nach 24 Stunden in dem frühen Blastem eine Anhäufung der *notch1b* und *deltaC* Transkripte in den Bereichen, in denen auch *msxb* und *msxc* detektiert wurden, nachgewiesen werden (Raya et al., 2003). Demnach scheint der Notch Signalweg in beiden regenerativen Prozessen eine Rolle zu spielen.

Da die Aktivierung von Notch eine bedeutende Rolle bei der Schicksalsentscheidung über Proliferation/ Differenzierung von einigen residenten Stammzellen wie denen der hämatopoetischen (Radtke et al., 2002), neuralen (Gaiano and Fishell, 2002), gastrointestinalen (Brittan and Wright, 2002) und skelettmuskulären (Conboy and Rando, 2002) Abstammungen spielt, bleibt zu klären, ob die erhaltenen Resultate einen Hinweis auf die Beteiligung einer Stammzellpopulation während der Herzregeneration im Zebrafisch darstellen. Zumindest bei der Extremitätenregeneration des Molches wurde eine Beteiligung von Pax7⁺ Satellitenzellen postuliert (Morrison et al., 2006).

Lepilina und Kollegen konnten durch die Verwendung von transgenen Reporterstämmen zeigen, dass sich nach Amputation der Ventrikelspitze ein Blastem aus Vorläuferzellen, welche prekardiale Marker exprimierten, differenzierten und proliferierten, bildete. Darüber hinaus stellten sie fest, dass das Epikardium, welches die beiden Herzkammern

umgibt, die Expression von Markern der Embryonalentwicklung induziert und schnell expandiert, um das durch die Amputation exponierte Myokard zu bedecken. Außerdem machte eine Subpopulation der epikardialen Zellen einen epithelialen zu mesenchymalen Übergang (EMT) durch und stellte neue Gefäße für den regenerierenden Muskel bereit.

Während der Regeneration wurde die Expression des Fibroblastenwachstumsfaktors *fgf17b* im Myokard induziert, während die FGF-Rezeptoren *fgfr2* und *fgfr4* von benachbarten, ursprünglich epikardialen Zellen exprimiert wurden. Die experimentelle Blockade des FGF-Signalweges mittels Expression eines dominant negativen FGF-Rezeptors verhinderte den epithelialen zu mesenchymalen Übergang und somit die koronare Gefäßneubildung. Dies resultierte dann in einem vorzeitigen Arrest der Regeneration. Diese Untersuchungen zeigen, dass myokardiales und epikardiales Gewebe auf Verletzungen in einer FGF-abhängigen Art und Weise miteinander reagieren und so eine kardiale Regeneration ermöglichen (Lepilina et al., 2006).

1.4 Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten verschiedener Spezies und Altersstufen

In kardialen Myozyten sind DNS-Synthese und Mitose trotz der Präsenz von Myofibrillen möglich. Während der normalen Kardiomyogenese proliferieren ventrikuläre und atrielle Myozyten mit ähnlicher Geschwindigkeit während sich spezialisierte Myozyten des konduktiven Systems im Ratten- und Mäuseherzen langsamer teilen. Zwei bis drei Wochen nach der Geburt sinkt die Proliferationsrate in Kardiomyozyten graduell ab und es findet ein Übergang von hyperplastischem zu hypertrophem Wachstum statt (Rumyantsev, 1991). Im adulten Herzen konnte bisher keine mit den Satellitenzellen des Skelettmuskels vergleichbare, große und potente Vorläuferzellpopulation identifiziert werden. Auch klinisch wurde bisher keine funktionell signifikante myokardiale Regeneration in Folge von Krankheiten oder Verletzungen des Herzens, die auf dem Verlust von Kardiomyozyten beruhen, dokumentiert. Zudem treten bei Erwachsenen sehr selten primäre myokardiale Tumore auf. Obwohl diese Beobachtungen nahe legen, dass die Proliferationsfähigkeit adulter Kardiomyozyten niedrig ist, schließen sie die Existenz einer limitierten Fähigkeit für hyperplastisches Wachstum im normalen oder kranken Myokard nicht aus. Von verschiedenen Forschergruppen existieren Daten, die zeigen, dass die Proliferationsfähigkeit von adulten Kardiomyozyten nicht irreversibel verlorengegangen ist. Allerdings ist diese Fähigkeit ungleich zwischen verschiedenen

Zelltypen verteilt und stark vom Alter und der systematischen Position der jeweiligen Spezies abhängig (Rumyantsev, 1991; (Soonpaa and Field, 1998).

Rumyantsev et al. haben für die Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten sowohl verschiedene Tiermodelle (Frösche, Eidechsen, Ratten und Mäuse) sowie auch verschiedene Schädigungsmodelle (mechanische Quetschung des Ventrikels, Ligation der linken Koronararterie, Koarktation der abdominalen Aorta zur Induktion von kardialer Hypertrophie wie auch Injektionen von Isoproterenol ebenfalls zur Induktion von Hypertrophie) verwendet. Anschließend wurden proliferierende Zellen mit Tritium markiertem Thymidin markiert und Gewebeschnitte licht- bzw. elektronenmikroskopisch analysiert. 13- 14 % der perinekrotischen ventrikulären Myozyten des Frosches wurden bereits nach einmaliger Injektion von ³H-Thymidin markiert. Bei Säugern überstieg die DNS-Syntheserate unabhängig vom experimentellen Modell einschließlich neonataler Rattenherzen 1,6 % nicht, sondern variierte von 0 bis 0,5 % in adulten Tieren. Nach mehrfachen ³H-Thymidin- Injektionen konnten in Fröschen bis zu 94 % der Myozyten in perinekrotischen Regionen markiert werden. Bei den Säugetieren wurden hingegen höchstens 9 % markierte Myozyten identifiziert (Rumyantsev, 1991).

In einem Übersichtsartikel von Soonpaa & Field werden die Schwierigkeiten bei der eindeutigen Identifikation von proliferierende Kardiomyozyten kritisch diskutiert und Publikationen in denen in geschädigten bzw. ungeschädigten Ratten- oder Mäuseherzen DNS-Synthesen in Kardiomyozyten ermittelt wurden und tabellarisch aufgelistet und verglichen. In den meisten Arbeiten wurde nicht untersucht, ob die DNS-Synthesen auch zu kompletten Zytokinesen geführt haben. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass DNS-Synthesen im adulten Säugerherz auftreten. Dabei existieren allerdings große Diskrepanzen zwischen den ermittelten Häufigkeiten der DNS-Synthesen, die in ungeschädigten oder geschädigten Herzen ermittelt wurden. Die Genauigkeit solcher Messungen hängt dabei vor allem von der Genauigkeit der Methode zur Bestimmung der DNS-Syntheserate und der Methode zur eindeutigen Identifizierung von Kardiomyozyten ab. Generell nimmt die DNS-Syntheserate der Kardiomyozyten von embryonalen über neonatale bis hin zu adulten Kardiomyozyten stark ab und bewegt sich für Mäuse und Ratten meistens deutlich unter 1% (Soonpaa and Field, 1998).

1.5 Grundprinzipien der myokardialen Infarktrepauratur beim Säugetier

Ischämische Herzkrankheiten und deren Folgen gehören zu den weltweit häufigsten Todesursachen des Menschen (Thom et al., 2006). In Deutschland stellten sie mit 21% im Jahr 2002 die häufigste Todesursache dar (World Health Statistics 2006).

Herzinfarkte entstehen hauptsächlich als Folge einer Thrombose innerhalb der Herzkranzgefäße. Bereits nach 20 minütiger Durchblutungsstörung beginnt das Herz irreversiblen Schaden zu nehmen, da der hohe metabolische Umsatz des Myokards unterbrochen wird. Es folgt eine Welle des Zelltodes die sich von den inneren Schichten nach außen innerhalb der folgenden drei bis sechs Stunden ausbreitet. Obwohl Kardiomyozyten am empfindlichsten reagieren, sind auch Gefäßzellen, Fibroblasten und Nervenzellen von der Ischämie betroffen. Die myokardiale Nekrose ruft eine starke inflammatorische Antwort hervor. Mehrere Millionen aus dem Knochenmark stammende Leukozyten, anfänglich vorwiegend Neutrophile und später hauptsächlich Makrophagen, erreichen das infizierte Areal. Die Makrophagen phagozytieren die Zelltrümmer und dirigieren die nun folgende Wundheilungsphase. Gleichzeitig mit der Entfernung von totem Gewebe bildet sich ein hydrophiles provisorisches Wundheilungsgewebe aus, das vorwiegend aus proliferierenden Fibroblasten und Endothelzellen besteht. Mit der Zeit wandelt sich dieses so genannte Granulozytengewebe in eine kompakte Kollagenarbe um. Bei den meisten humanen Infarkten dauert dieser Wundheilungsprozess zwei Monate.

Herzinfarkte führen zu einer Abnahme der Wanddicke in der verletzten Region und zu einer Dilatation des Lumens des betroffenen Ventrikels. Dieser Prozess wird als ventrikuläre Umgestaltung (Remodeling) bezeichnet und führt zu erhöhtem mechanischem Stress auf die Ventrikelwand. Der mechanische Stress provoziert das Entstehen von Fehlfunktionen bei der Kontraktion. Das Ausmaß des Herzversagens korreliert mit der Menge an geschädigtem Myokard (Laflamme and Murry, 2005).

1.5.1 Herzregeneration im Säugetier

Zwischen 1850-1911 wurde allgemein angenommen, dass die kardiale Hypertrophie auf hypertrophierenden und hyperplasierenden Myozyten beruht (Anversa and Kajstura, 1998). Die 1925 publizierte Beobachtung, dass im humanen Herzen keine mitotischen Figuren detektiert werden konnten, prägten ein neues Verständnis vom Säugerherz als einem terminal differenzierten, postmitotischen Organ (Anversa et al., 2006).

In den letzten 10-12 Jahren konnten jedoch in histologischen Gewebeproben von verschiedenen humanen Herzerkrankungen mitotische Figuren innerhalb humaner Kardiomyozyten detektiert werden (Beltrami et al., 2001;Chimenti et al., 2003;Kajstura et al., 1998b;Quaini et al., 1994;Urbanek et al., 2003). In früheren elektronenmikroskopischen Analysen konnten keine mitotischen Myozyten entdeckt werden, weil nur sehr kleine Gewebeproben analysiert werden können und die mitotischen Ereignisse in Kardiomyozyten äußerst selten sind. Neuere Techniken wie die konvokale Laser-Scannig-Mikroskopie ermöglichen jedoch die Analyse größerer Gewebeareale und ergaben neben der Identifikation von mitotischen interstitiellen Fibroblasten auch eine vergleichbar große Anzahl von mitotischen Kardiomyozyten (14×10^6 - 37×10^6) (Kajstura et al., 1998a;Limana et al., 2002). Wobei diese Ergebnisse innerhalb der Forschergemeinschaft als umstritten gelten.

Darüber hinaus gelang es einigen Gruppen kleine Populationen kardialer Stammzellen zu isolieren (Beltrami et al., 2003;Laugwitz et al., 2005;Martin et al., 2004b;Oh et al., 2003). Manche dieser Vorläuferzellpopulationen konnten in *in vivo* Versuchen zu Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenzieren und geschädigtes Areal ersetzen (Beltrami et al., 2003) bzw. nach Transplantationen exprimierten sie kardiale Marker und fusionierten teilweise mit Kardiomyozyten oder differenzierten zu Kardiomyozyten (Oh et al., 2003). Auch extrakardiale Vorläuferzellen, wie hämatopoetische Stammzellen, migrierten nach transgener Transplantation von Herzen oder Knochenmark in das Wirts- bzw. Spenderherz und siedelten sich dort an. Dort differenzierten sie in verschiedene Zelltypen (Laflamme et al., 2002b;Minami et al., 2005b;Orlic et al., 2001). Über die Höhe des Anteils an chimären Kardiomyozyten herrschen konträre Meinungen (Glaser et al., 2002;Laflamme et al., 2002b;Minami et al.,

2005b;Quaini et al., 2002). Es sollte jedoch angemerkt werden, dass zurzeit keine einheitliche Lehrmeinung zur Rolle kardialer Stammzellen existiert.

Alle diese Beobachtungen zeigen, dass auch das Säugerherz gewisse endogene regenerative Kapazitäten besitzt. Diese scheinen aber ohne externe Unterstützung oder Aktivierung nicht effektiv genug zu sein, um große geschädigte Areale funktionell zu regenerieren.

Eine Ausnahme hiervon wurde in einer Publikation von Leferovich et al. postuliert. Dort wurde die Herzregeneration eines bestimmten Mausstammes, der MRL/MpJ-Maus, welche über besondere Fähigkeiten der Wundheilung verfügt, nach transmuraler Kryoschädigung untersucht. Dieses besondere Wundheilungsmerkmal ist über mindestens sieben genetische Loci verteilt. Dieser Mausstamm reagierte auf die Schädigung mit deutlich geringerer Narbenbildung und einer erhöhten Mitoserate in Kardiomyozyten (Leferovich et al., 2001). Diese Ergebnisse wurden durch die Arbeiten zweier anderer Gruppen deutlich relativiert. Abdullah et al. konnten nach Anwendung des Ischämie-Reperusionsmodells keine signifikanten Unterschiede zwischen der Resistenz der MRL-Mäuse und der Resistenz der C57/Bl6 Kontrolltiere gegenüber myokardialen Infarkten feststellen (Abdullah et al., 2005). Eine dritte Gruppe die die Auswirkungen von oberflächlichen und transmuralen Verletzungen des Myokards in MRL-Mäusen und Kontrollmäusen untersucht und verglichen hat, konnte zwar zytoprotektive Mechanismen wie Zellproliferation, erhöhte Gefäßbildung und geringere Apoptoseraten und damit bessere Überlebensraten in Herzen von MRL-Mäusen beobachten, diese reichten aber nicht für eine komplette myokardiale Regeneration aus (Naseem et al., 2007).

1.6 Embryonale Herzentwicklung

Das Herz ist das erste Organ das während der Embryogenese gebildet wird und seine zirkulatorische Funktion ist notwendig für die Lebensfähigkeit von Säugetierembryonen. Die Entwicklung des Herzens setzt sich aus einer Vielzahl sehr komplexer morphogenetischer Prozesse, die sowohl in ihrer räumlichen, als auch zeitlichen Reihenfolge exakt koordiniert werden müssen, zusammen. Viele dieser Prozesse basieren auf Interaktionen zwischen Zellen und Geweben. Diese Interaktionen werden über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt. Die Herzentwicklung beginnt mit der Induktion von kardiogenen Zellen in bilateralen Feldern des lateralen Mesoderms. Die

bilateralen Herzprimordien konvergieren und fusionieren entlang der Mittellinie und bilden dort einen linearen, kontrahierenden Herzschlauch (Zaffran and Frasch, 2002). Dieser bringt dann anhand von anschließenden Windungen die rudimentären Atrien und Ventrikel in die entsprechende Positionen, die für die weitere Ausbildung des Vier- bzw. Dreikammerherzens notwendig sind. Im Folgenden werden kurz drei Signaltransduktionswege vorgestellt, deren Beteiligung besonders in der frühen Herzentwicklung und dabei insbesondere für die kardiogene Induktion im Mesoderm eine Rolle spielen. Eine Beteiligung dieser Signaltransduktionswege bzw. einiger Bestandteile an der Herzregeneration ist denkbar und wurde im Fall der Herzregeneration des Zebrafisches auch schon teilweise untersucht (Lepilina et al., 2006).

1.6.1 Positiv wirkende Signalmoleküle des Endoderms: BMPs und FGFs

BMPs

BMPs wurden ursprünglich als Signalmoleküle mit der Fähigkeit zur Induktion der Knochen- und Knorpelbildung entdeckt (Urist, 1965). Sie gehören zu der TGF- β Superfamilie (transforming growth factor- β) zu der außerdem TGF- β , Activine, Inhibine und die Müllerian inhibiting substance gehören. Bis heute konnten 15 BMPs in Säugetieren identifiziert werden. Dabei scheinen BMP2 und 4 die einzigen BMP-Isoformen zu sein, die die Bildung von kardiogenen Zellen aus nicht präkardialen Mesoderm *in vitro* induzieren können (Schultheiss et al., 1997). Endodermale Zellen ventral des anteromedialen Mesoderms produzieren und sekretieren BMPs, die an BMP-Rezeptoren binden und entsprechende Signaltransduktionswege aktivieren. Die ektopische Applikation von rekombinantem, reinem BMP2 in nichtkardiogenem Mesoderm konnte die Expression von kardiogenen Transkriptionsfaktoren wie Nkx2,5 GATA4 und Tbx 2 und 3 induzieren (Schultheiss et al., 1997; Yamada et al., 2000). Weitere Experimente zeigten aber, dass BMPs allein nicht ausreichen, um eine komplette kardiogene Induktion zu gewährleisten, sondern nur diese nur im Zusammenspiel mit FGFs erreichen können (Barron et al., 2000). Demnach spielen BMP2 und BMP4 eine wichtige Rolle für die frühen Schritte der kardiogenen Induktion. Neben BMP2 und BMP4 werden auch die BMPs 5,6,7 und 10 während der Herzentwicklung zu bestimmten Zeitpunkten und in bestimmten Regionen exprimiert. Die funktionellen Inaktivierungen verschiedener BMPs konnten die genauen Rollen dieser Faktoren während der Kardiogenese bisher jedoch nicht

entschlüsseln. BMP2-Knock-out Mäuse sterben nach Ausbildung des Herzschlauches (Zhang and Bradley, 1996) und BMP4-Knock-out Mäuse schon während der Gastrulation (Winnier et al., 1995). Im Fall der Inaktivierung von BMP 5, 6 und 7 sind die Mäuse lebensfähig und zeigen aber keinen ausgeprägten Herzphänotyp (Dudley and Robertson, 1997; Kingsley et al., 1992; Solloway et al., 1998). BMP 10 defiziente Mäuse sterben zwischen den embryonalen Tagen E 9,5 bzw. 10,5 und zeigen starke kardiale Abnormalitäten (Chen et al., 2004; Neuhaus et al., 1999).

Die von BMPs vermittelte Signaltransduktion erfordert eine Komplexbildung durch Bindung an BMP-Typ I und Typ II Rezeptoren. Daraufhin phosphoryliert der Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor und aktiviert dessen Kinaseaktivität. Diese kann zur Aktivierung des TAK-1-MKK3/6-p38/JNK Signalweges oder des Smad Signalweges führen. In beiden Fällen führen weitere Phosphorylierungen und Interaktionen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie ATF-2 und der Transkription entsprechender Zielgene (Monzen et al., 2002).

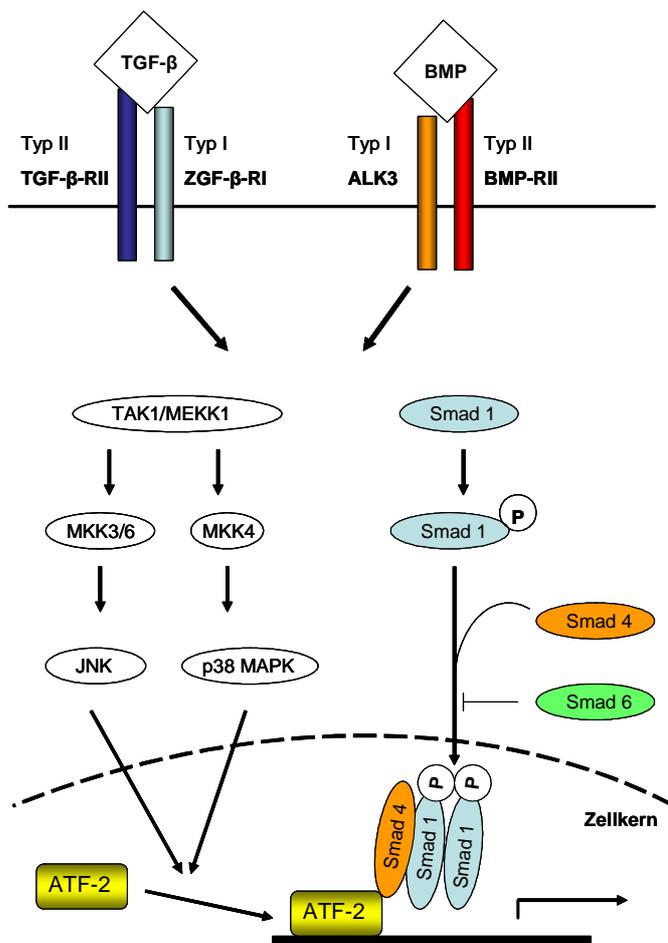


Abb.4: TGFβ- und BMP Signaltransduktionswege und deren Beteiligung an der kardiogenen Induktion. Das TGFβ- oder BMP Signal kann über den TAK1/MEKK1 oder den Smad-Signalweg weitergeleitet werden und aktiviert verschiedene genetische Programme mittels Interaktionen mit verschiedenen transkriptionalen Effektoren oder Smad-Transkriptionsfaktoren wie ATF-2. Verändert nach (Wagner and Siddiqui, 2007)).

FGFs

FGFs bestehen aus einer großen Familie von Polypeptidwachstumsfaktoren. Sie wurden erstmals als wachstumsstimulierende Faktoren identifiziert, als gezeigt wurde, dass FGF-1 und FGF-2 die Proliferation von Fibroblasten stimulierten. Sie sind an vielen verschiedenen zellulären Prozessen wie Chemotaxis, Zellmigration, Angiogenese, Differenzierung, Zellüberleben und Apoptose beteiligt (Bottcher and Niehrs, 2005).

Da FGFs bereits in die Induktion und Modellierung des Mesoderms unabhängig von der kardiogenen Induktion involviert sind ist es schwierig deren primäre Funktion während der kardiogenen Induktion zu entschlüsseln. Es konnte gezeigt werden, dass ihre Rolle innerhalb der kardiogenen Induktion synergistische Interaktionen mit BMP-Signalwegen erfordert (Barron et al., 2000; Lough et al., 1996). Experimente in Hühner- und Mäuseembryonen zeigten, dass bestimmte FGFs wie FGF 1, 2, 4, und 8 mit BMP2 kooperieren und mesodermale Zellen kardiogen spezifizieren können (Alsan and Schultheiss, 2002; Lough et al., 1996); (Zhu et al., 1996). Dementsprechend benötigen mesodermale Zellen BMPs für die Induktion der kardiogenen Vorläuferzellen und FGFs für den Erhalt der Proliferations- und Überlebensfähigkeit der differenzierten Kardiomyozyten.

Die Signalweiterleitung der FGFs erfolgt über die Dimerisierung der FGF-Rezeptoren nach Ligandenbindung und anschließender Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste. Diese induzieren die Assemblierung und Rekrutierung von nachfolgenden Signalkomplexen. Die FGF-Signale können über drei Hauptsignalwege weitergegeben werden: Den Ras/MAPK-Signalweg, den Phospholipase C γ / Ca⁺² Signalweg und den Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase/Akt Signalweg. Dabei wird der Ras/MAPK-Signalweg während der Kardiogenese am häufigsten aktiviert (Wagner and Siddiqui, 2007).

1.6.2 Positive und negative Signalmoleküle des Mesoderms und des Ektoderms

Wnts und Crescent

Wnts sind sekretorische Glycoproteine mit verschiedenen Funktionen innerhalb diverser entwicklungsbiologischer Prozesse wie der Schicksalsbestimmung verschiedener Zelltypen, der Ausbildung von Zellpolaritäten, sowie der Differenzierung, Proliferation und Migration verschiedener Zelltypen (Patapoutian et al., 1995).

Die *Wnts* bilden eine dritte große Gruppe von Signalmolekülen welche die kardiogene Induktion des Mesoderms kontrollieren. Untersuchungen der Herzentwicklung im *Xenopus* und im Hühnchen haben gezeigt, dass die Induktion der kardialen mesodermalen Vorläuferzellen auf der Aktivierung des Wnt/ Ca^{+2} (Sheldahl et al., 2003) und des Wnt/Polarität (Pandur et al., 2002) Signalweges bei gleichzeitiger Inhibition des Wnt/ β -catenin Signalweges beruhen (Schneider and Mercola, 2001). Die Aktivierung des Wnt/ Ca^{+2} Signalweges führt zur Aktivierung der Proteinkinase C während die Aktivierung des Wnt/Polarität Signalweges die Jun aminoterminalen Kinase (JNK) aktiviert. Beide Signalwege werden von *Wnt 11* aktiviert, dessen Expression im präkardialen Mesoderm von *Xenopus*- Hühnchen- und Mäuseembryonen detektiert wurde (Pandur et al., 2002). Zwei weitere *Wnts* *Wnt 3a* und *Wnt 8c* werden ebenfalls im kardiogenen Mesoderm exprimiert und aktivieren den Wnt/ β -catenin Signalweg, welcher die Kardiogenese inhibiert (Schneider and Mercola, 2001). Daher erfordert die Herzentwicklung im Falle des Wnt Signalweges eine räumlich koordinierte Expression von zwei gegensätzlichen Aktivitäten. Zum einen die Inhibition des Wnt/ β -catenin Signalweges durch Sekretion der inhibierenden Moleküle *DKK-1* und *Crescent* und die Aktivierung des Wnt/ Ca^{+2} und des Wnt/Polarität Signalweges durch *Wnt 11* im präkardialen Mesoderm (Wagner and Siddiqui, 2007).

1.7 Therapeutische Ansätze zur Unterstützung der Herzregeneration

Es werden derzeit verschiedene Ansätze zur Unterstützung der kardialen Regeneration verfolgt. Eine Auswahl dieser Methoden wird im Folgenden kurz vorgestellt.

1.7.1 Transplantation von autologen skelettalen Myoblasten (Satellitenzellen)

Die zellbasierte kardiale Reparatur begann mit der Transplantation von Satellitenzellen, denn manche Forscher hofften, dass auch Skelettmuskelzellen nach Transplantation in den Herzmuskel zu einer Verbesserung der Kontraktionsleitung führen. Allerdings exprimieren die reifen Skelettmuskelzellen nicht die nötigen Adhäsions-oder Gap-Junction-Proteine, die für eine korrekte elektromechanische Kopplung mit dem Myokard des Wirtes notwendig sind (Reinecke et al., 2000). Daher schlugen die Transplantate asynchron (Leobon et al., 2003;Rubart et al., 2004). Trotzdem konnten in

Tiermodellen positive Effekte auf die kontraktile Ventrikelfunktion nach Infarkt erzielt werden.

Klinische Phase 1 Studien ergaben eine schlechte Integration der transplantierten Satellitenzellen im Infarktgebiet und ein Teil der Patienten entwickelte ventrikuläre Arrhythmien (Menasche et al., 2003). Ähnliche negative Effekte wurden auch nach Transplantation von skelettalen Myoblasten in infizierte Mäuseherzen beobachtet (Roell et al., 2007).

1.7.2 Transplantation von multipotenten adulten Stammzellen

Transplantationen von kompletten Organen oder von Knochenmarkszellen ermöglichen wichtige Einsichten in die Fähigkeiten zirkulierender Zellen sich in adulten Geweben anzusiedeln. So genannte "transgender" Transplantationen, bei denen beispielsweise männliche Patienten weibliche Spenderherzen erhalten, lassen die Verfolgung des Schicksals zirkulierender extrakardialer Zellen aufgrund des unterschiedlichen Genotyps zu. Immunfärbungen mit spezifischen Zellmarkern ermöglichen darüber hinaus die Charakterisierung des angesiedelten Zelltyps. Dadurch ließen sich unter anderem zirkulierende, endotheliale Vorläuferzellen nachweisen. Die hohe endotheliale Chimerbildung konnte sowohl nach Herztransplantationen (Hocht-Zeisberg et al., 2004) als auch nach Knochenmarkstransplantationen (Deb et al., 2003) in der koronaren Zirkulation beobachtet werden. Auch im glatten Muskel von Arterien und Venen (Glaser et al., 2002; Quaini et al., 2002) und in perineuralen Schwannzellen (Minami et al., 2005a) wurden zirkulierende Zellen nach Herztransplantationen wiedergefunden.

Kontroverse Ansichten herrschen darüber, in welchem Ausmaß zirkulierende Zellen in das Myokard integrieren. Es konnten zwar Y+ Kardiomyozyten im transplantierten weiblichen Spenderherzen detektiert werden, aber die meisten Forscher fanden nur sehr wenige dieser chimären Kardiomyozyten (einer auf 10^3 - 10^4 Kardiomyozyten insgesamt) (Deb et al., 2003; Hocht-Zeisberg et al., 2004; Laflamme et al., 2002a; Muller et al., 2002).

Summa summarum zeigen die Daten der klinischen Transplantationsstudien, dass endogene zirkulierende Vorläuferzellen in erster Linie die Gefäßneubildung, besonders des Endothels und in geringerem Umfang im Glatten Muskel unterstützen. Der Anteil an chimären Kardiomyozyten ist hingegen sehr gering (Laflamme and Murry, 2005).

1.7.3. Der Einsatz von Zytokinen zur gezielten Mobilisierung von endogenen Vorläuferzellen

Die zuvor genannten Beobachtungen der Teilnahme von endogene Vorläuferzellen aus dem Knochenmark an den Reparaturprozessen nach einem Infarkt resultierten in Bestrebungen solche Zellen gezielt mittels Zytokinen, wie dem gut untersuchten Granulozyten stimulierenden Faktor (G-CSF), zu mobilisieren. Mehrere Gruppen berichteten von verbesserten ventrikulären Funktionen durch G-CSF-Behandlungen nach Infarkten in Mäusen (Orlic et al., 2001), Ratten (Sugano et al., 2005) und Schweinen (Iwanaga et al., 2004). Andererseits gab es auch Berichte in denen solche Behandlungen keinen Nutzen (Deten et al., 2005) brachten. Die Gründe für die unterschiedlichen Effekte sind bisher unbekannt.

Da G-CSF keinen Einfluss auf die kontraktile Funktion des Herzens hat und mehr als 99% der mobilisierten Zellen Makrophagen und Granulozyten sind, scheinen die zusätzlich aktivierten Leukozyten positiv auf die Reparatur des Infarktes unabhängig von myokardialer Regeneration zu wirken (Laflamme and Murry, 2005).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten selbst einen G-CSF-Rezeptor exprimieren und eine *in vitro* G-CSF-Behandlung die Kardiomyozyten vor dem Zelltod, ausgelöst durch oxidativen Stress, schützen kann (Harada et al., 2005). Klinische Studien konnten erste Verbesserungen im Bereich der ventrikulären Funktion und Reperfusion zeigen.

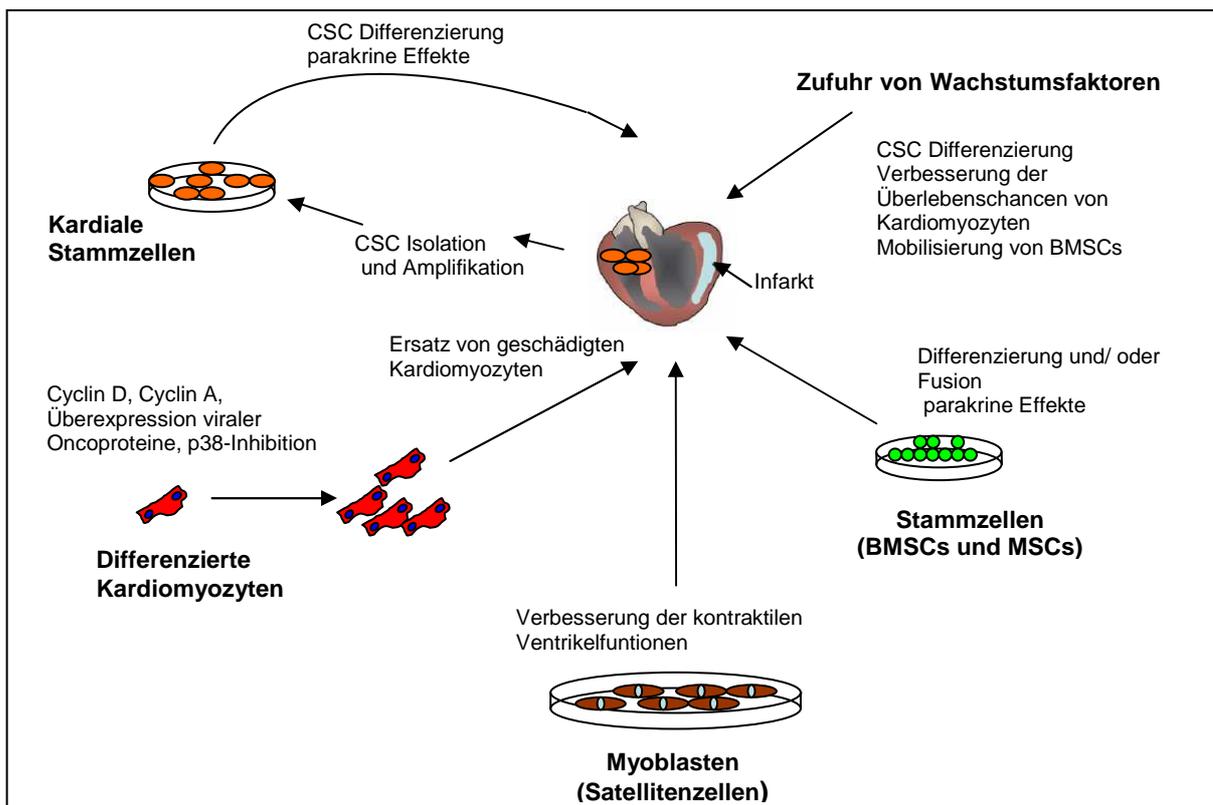


Abb.5: Zellbasierte und molekulare Strategien für die Reparatur des Säugerherzens

Schematische Darstellung von vier mögliche Strategien: Stimulation endogener kardialer Stammzellen, Transplantation adulter Stammzellen oder autologer Myoblasten und Induktion der Proliferation von endogenen Kardiomyozyten. Kardiale Stammzellen und BMSCs können durch Applikation von Wachstumsfaktoren lokal aktiviert bzw. mobilisiert werden. Alternativ können kardiale und andere adulte Stammzellen *in vitro* amplifiziert werden und für autologe Transplantationen eingesetzt werden. Die transplantierten Zellen erzielen dabei entweder positive Effekte durch die Differenzierung in kardiovaskuläre Zelltypen (Kardiomyozyten, Endothelzellen und Glattmuskulzellen), und/oder durch die Sekretion von parakrinen Mediatoren. Die Proliferation terminal differenzierte Kardiomyozyten lässt sich möglicherweise durch die direkte Beeinflussung verschiedener Zellzyklusmodulatoren initiieren. (Verändert nach (Germani et al., 2007))

1.7.4 Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Mesenchymale Stammzellen werden aus dem Stroma des Knochenmarks isoliert und produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren die die Hämatopoese unterstützen (Dazzi et al., 2006). Darüber hinaus können sie spontan zu Adipozyten und Osteoblasten und nach Induktion auch zu Chondrozyten differenzieren (Caplan and Bruder, 2001). Diese Entdeckungen machten mesenchymale Stammzellen auch für die kardiale Reparatur interessant. Unter Verwendung von 5-Azacytidin zur Demethylierung der DNS konnten MSCs zur Expression kardialer Marker *in vitro* stimuliert werden (Makino et al., 1999). Allerdings ist unklar ob sich auch funktionelle Kardiomyozyten aus MSCs bilden können. Der Einsatz von 5-Azacytidin limitiert zudem die klinische Anwendbarkeit solcher

Strategien. Direkte Injektionen von nicht induzierten MSCs in infizierte Herzen konnten deren Herzfunktion verbessern (Berry et al., 2006). Direkt injizierte, markierte MSCs konnten im Myokard detektiert werden, aber obwohl sie sich mit verschiedenen Muskelmarkern anfärben ließen, glich ihre Morphologie mehr der Morphologie von Fibroblasten als von Kardiomyozyten (Shake et al., 2002). Außerdem konnten keine elektromechanischen Kopplungen untereinander oder mit Wirtszellen festgestellt werden. Dennoch erschien das pathologische ventrikuläre Remodeling in transplantierten Herzen dadurch abgeschwächt, dass eine dickere Infarkt Narbe und eine geringere ventrikuläre Dilatation entstanden (Shake et al., 2002).

1.7.5. Myokardiale Vorläuferzellen

Bis vor Kurzem gehörte das Herzen noch mit zu einem der letzten Organe in denen keine definierte Vorläuferzellpopulation identifiziert werden konnte. Die Arbeiten verschiedener Gruppen weisen darauf hin, dass auch das Herz, Populationen residenter Vorläuferzellen mit kardiomyogenem Potential besitzt. Einer Gruppe gelang die Isolation einer Zellpopulation aus adulten Rattenherzen, die für den Stammzellmarker c-kit positiv waren (Beltrami et al., 2003). Eine zweite Vorläuferzellpopulation wurde aus adulten Mäuseherzen, basierend auf ihrer Sca-1 (Stammzellantigen-1) Expression, isoliert (Oh et al., 2003). Eine dritte aus adulten Mäuseherzen isolierte Zellpopulation zeichnet sich durch den Ausschluss des Hoechstfarbstoffes aus (Martin et al., 2004a). Eine weitere entdeckte Vorläuferzellpopulation besteht aus Zellen, die den LIM- Homeodomänen Transkriptionsfaktor islet-1 exprimieren. Diese Zellen wurden zunächst während der Herzentwicklung entdeckt (Cai et al., 2003). Anderen Forschern gelang es die Existenz von islet-1 positiven Zellen in neonatalen und in geringerer Menge im adulten Herzen nachzuweisen (Laugwitz et al., 2005).

In *in vitro* und *in vivo* Versuche mit den verschiedenen myokardialen Vorläuferzellen konnten zwar gewisse kardiale Eigenschaften anhand kardialer Gen- oder Proteinexpressionen sowie verbesserte ventrikuläre Funktionen nach Transplantationen in infizierte Herzen beobachtet werden, aber es sollte kritisch angemerkt werden, dass die Experimente mit kardialen Stammzellen durchaus kritisch diskutiert werden und viele Versuche von anderen Gruppen nicht reproduziert werden können.

Gegenwärtig wird behauptet, dass sich alle vier kardialen Vorläuferzellen voneinander unterscheiden, d.h. keine der anderen Marker überlappend exprimiert werden. Dabei scheint es paradox, dass ein Organ, das bekannt ist für seine fehlende regenerative Kapazität, mehrere nicht überlappende Populationen kardialer Vorläuferzellen beherbergen soll. Jedenfalls scheinen diese Zellen nicht wie beispielweise Satellitenzellen eine effektive Geweberegeneration unterstützen zu können. Sollten die erwähnten Zellen tatsächlich eine Vorläuferzellfunktion *in vivo* haben, dann scheint es sich bei dieser um einen sehr langsamen Erneuerungsprozess zu handeln. Alternativ könnten die Vorläuferzeleigenschaften jedoch auch bei der *in vitro* Isolation entstanden sein. Nichtsdestotrotz könnten diese Zellen jedoch trotzdem von theoretischem Nutzen sein (Laflamme and Murry, 2005).

1.7.6. Embryonale Stammzellen (ES-Zellen)

Mit Ausnahme der ethischen und politischen Bedenken, machen die vielfältigen Eigenschaften embryonaler Stammzellen diese zu einer attraktiven Quelle für zellbasierte kardiale Therapien. Die aus der inneren Zellmasse während des Präimplantationsstadiums von Säugetierembryonen gewonnenen ES-Zellen haben eine nahezu unbegrenzte Selbsterneuerungsfähigkeit (Amit et al., 2000) und es existieren bereits gut etablierte Protokolle für deren Isolation, Kultivierung und Differenzierung. Aus ES-Zellen generierte Kardiomyozyten exprimieren die molekularen Elemente, die für die korrekte elektromechanische Kopplungen mit dem Wirtsmiokard notwendig sind (Westfall et al., 1997; Xu et al., 2002). Da murine ES-Zellen im Vergleich zu humanen ES-Zellen bereits seit über 20 Jahren untersucht werden, konnten mit ihrer Hilfe schon wichtige Erkenntnisse über die Herzentwicklung und mögliche regenerative Anwendungen gewonnen werden. Bereits die spontan gebildeten dreidimensionalen Aggregate, die so genannten "Embryoid Bodies" beinhalten Foci von schlagendem Myokard (Doetschman et al., 1985). Schon nach kurzer Zeit der *in vitro* Differenzierung nehmen von ES-Zellen abstammende Myozyten verschiedene Phänotypen elektrophysiologisch unterschiedlicher Subtypen wie ventrikulären, atrialen und nodal/ geschwindigkeitsmachender Kardiomyozyten an (Maltsev et al., 1993; Zhang et al., 2002). Ein gewisses Problem stellt die Ausbildung von Teratomen nach Transplantationen in geschädigte Herzen dar und erfordert deshalb eine

sehr sorgfältige Aufreinigung von von ES-Zellen abstammenden Myozyten (Laflamme and Murry, 2005).

Transplantationsversuche mit genetisch selektierten von ES-Zellen abstammenden Myozyten in ein immunkompatibles Empfängerherz resultierten in der Entstehung von stabilen intrakardialen Transplantaten. Auch die Transplantationen von undifferenzierten ES-Zellen führten zu funktionell verbesserten Integrationen die morphologisch keine Unterschiede zu von ES-Zellen abgeleiteten Myozyten aufwiesen und keine Teratome bildeten (Hodgson et al., 2004). Diese Beobachtungen sind jedoch umstritten. Die positiven Effekte von ES-Zelltransplantationen müssen nicht ausschließlich auf der Ausbildung von neuem Myokard beruhen, sondern können auch auf bereits erwähnten sekundären Effekten wie den Veränderungen des Remodelings nach Infarkt oder verstärkter Angiogenese beruhen (Ebelt et al., 2007).

Der große Vorteil der von humanen ES-Zellen abstammenden Myozyten liegt in ihrer proliferativen Aktivität *in vitro* (Snir et al., 2003) als auch *in vivo* (Laflamme et al., 2005). Durch ihre Proliferationseigenschaft wäre eine geringere Zellzahl für Transplantationen ausreichend und eine graduelle *in situ* Vermehrung würde es der Angiogenese im Empfängerherz erleichtern, den wachsenden metabolischen Anforderungen nachkommen zu können.

1.7.7. Tissue engineering (Gewebezüchtung)

Beim Tissue engineering werden verschiedene bestehende Techniken und Entwicklungen so miteinander verknüpft, dass künstlich neue Gewebe generiert werden können. Einer der am stärksten verfolgten Ansätze auf diesem Gebiet stellt das Aussäen von Kardiomyozyten auf porösen Gerüsten dar. Diese Gerüste bestehen aus biologisch abbaubaren synthetischen oder natürlichen Polymeren. Da aus Mäusen oder Ratten isolierte Kardiomyozyten an sich teilungsunfähig sind, gestaltet sich das Erreichen einer gewebeähnlichen Zelldichte als schwierig. Trotzdem konnten diese Konstrukte Aktionspotenziale leiten, synchron schlagen und nach elektrischer Stimulation hypertrophieren (Papadaki et al., 2001; Radisic et al., 2004). Die Entdeckung der Proliferationsfähigkeit von von humanem ES-Zell abgeleiteten Kardiomyozyten ist für diese Technik sehr verheißungsvoll. Ein weiterer Ansatz besteht darin die primären Kardiomyozyten in ein Kollagengel zu geben in dem sie in einer zyklischen

Streckapparatur mechanisch konditioniert werden. In diesen Konstrukten hatten die Kardiomyozyten eine natürliche stäbchenförmige Morphologie und gut ausgebildete elektromechanische Verbindungen. Darüber hinaus ordneten sie sich zu Muskelfasern an und konnten eine gewisse Kraft erzeugen. Nach Transplantation in ungeschädigte Herzen, überlebte ein Teil dieser Konstrukte und hypertrophierte weiter (Zimmermann et al., 2002). Einen limitierenden Faktor bei der Gewebezüchtung und der zellbasierten Herzreparatur stellt die Nährstoffzufuhr dar (Laflamme et al., 2002b).

1.7.8 Probleme verschiedener Methoden und Strategien für deren klinischen Einsatz

Die direkte Injektion von Zellen ins Herz stellt nach wie vor ein großes Problem dar, da ca. 90% der injizierten Zellen im Blutkreislauf oder durch Austritte an der Injektionsstelle verloren gehen (Muller-Ehmsen et al., 2002). Daher ist auch die Anzahl der im Myokard zurückbleibenden Zellen nicht vorhersagbar und variiert stark zwischen den einzelnen Studien.

Eine weitere Schwierigkeit bereitet die große Apoptoserate der transplantierten Zellen unabhängig vom Zelltyp. Auch hier beträgt der Verlust innerhalb der ersten Woche an die 90% (Muller-Ehmsen et al., 2002; Zhang et al., 2001).

Weitere Herausforderungen stellen die Proliferationskontrolle von transplantierten Zellen und deren Schwierigkeiten sich erfolgreich in vernarbtes Gewebe zu integrieren. Das unwirtliche Narbengewebe verhindert die Bildung von elektromechanischen Verbindungen zwischen transplantierten Kardiomyozyten und dem Gastmyokard. Diese sind aber notwendig, um die synchrone Kontraktion zu gewährleisten und Arrhythmien zu verhindern (Reinecke et al., 1999).

1.8 Ziele der Doktorarbeit

Der Molch *Notophthalmus viridescens* ist für seine außergewöhnliche Fähigkeit zur Regeneration diverser verletzter Organe bekannt. In früheren Arbeiten von Oberpriller et al. ist die Regenerationsfähigkeit des Molchherzens nach partieller Amputation des Ventrikels oder Atriums in erster Linie anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen histologisch untersucht worden. Dabei wurde den Herzen von Molchen zwar ein gewisses regeneratives Potenzial zugestanden, die Wunde letztendlich aber trotzdem durch Ausbildung einer Narbe verschlossen (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer mechanischen Schädigung des Ventrikels auf die Regeneration des Herzens morphologisch und molekular untersucht werden. Die Herstellung einer cDNS-Bibliothek aus geschädigten Molchherzen sollte dabei als Grundlage für die Herstellung von Macro- und Microarrays für die Analyse im regenerierenden Herzen differentiell exprimierter Gene dienen. Deren differentielle Expression sollte anschließend verifiziert und mittels *in situ* Hybridisierungen weiter charakterisiert werden. Die Proteinexpression potentiell interessanter Gene sollte mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Western Blots untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders erwähnt, wurden Chemikalien in Analysequalität und Biochemikalien der Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen), New England Biolabs, Invitrogen (Leek, NL), Promega (Mannheim), Stratagene (Heidelberg) und Boehringer (Mannheim) verwendet. Radioaktiv gelabelte Nukleotide wurden von Amersham Buchler (Braunschweig) bezogen.

BCIP	Boehringer
Bromdesoxy-Uridin (BrdU)	Sigma
Deckgläser (24mm x 60mm)	Menzel
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
DIG RNA Labeling Mix (10x konzentriert)	Sigma
Einmalfilter Minisart NML Minisart (0.45µm)	Sartorius (Göttingen)
Entellan	Merck
Ethyl 3-aminobenzoate, methanesulfonic acid salt (Tricain)	Sigma
Faltenfilter	Schleicher & Schüll
Hefe-tRNA	Boehringer
LB-Medium (Lennox)	Roth
LB-Agar (Lennox)	Roth
NBT	Boehringer
Objektträger	Elka
Paraffin	Merck
Parafilm	American National Can
Plastikgefäße	Nunc (Roskilde, DK)
Röntgenfilme	Kodak (Frankfurt)
Sulfamerazine	Sigma
Trizol [®] Reagent	Invitrogen
UV-Küvetten	Eppendorf

Vectabond Reagent

Vector Laboratories

2.1.2 Enzyme

Expand™ Reverse Transkriptase

Boehringer Mannheim

Proteinase K

Boehringer Mannheim

Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs oder
Jena Biosciences

RNase A

Boehringer Mannheim

RNase H

Promega

RNasin (RNase Inhibitor)

Promega

Sp6- RNA-Polymerase

Promega

Taq-DNA- Polymerase

Eppendorf

T7- RNA-Polymerase

Promega

2.1.3 Bakterienstämme

XL1blue: Stratagene, *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F⁺ *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

Elektro-Ten-Blue® Electroporation Competent Cells: Stratagene, Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Kan^r* [F⁺ *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)]

2.1.4 Verwendete Vektoren

pGEM®-T-Vektor

Promega

pGEM®-T Easy- Vektor

Promega

pBluescript® II SK (+/-)

Stratagene

pBluescript® II KS (+/-)

Stratagene

pDNR-LIB

BD Biosciences

2.1.5 DNA-Größenstandards

λ DNA	<i>EcoRI/HindIII</i> verdaut
pUC 18	<i>Sau3A</i> verdaut

2.1.6 Verwendete Kits

- DNA Cycle Sequencing Kit (Abi, Weiterstadt)
- CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech)
- QUIAEX II Gel Extraction Kit (500) (Quiagen)
- VECTASTAIN® ABC Kit Vector (Vector Laboratories)
- Creator™ Smart™ cDNA Library Construction Kit (Clontech)
- NucleoBond®-PC(500) (Macherey-Nagel)
- Oligotex® mRNA Mini-Kit (Quiagen)

2.1.7 Häufig verwendete Lösungen und Medien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit bidestilliertem H₂O aus einer Reinstwasseranlage angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert oder sterilfiltriert. Spezielle Lösungen werden bei den einzelnen Protokollen extra angegeben.

- Ampicillin-Stammlösung: 100 mg/ml in H₂O
- Chloramphenicol-Stammlösung: 30 mg/ml in Ethanol absolut
- IPTG-Stammlösung: 24 mg/ml in H₂O
- X-Gal-Stammlösung: 50 mg/ml in DMF
- BrdU-Stammlösung: 10 mg/ml in PBS
- Proteinase K-Stammlösung: 20mg/ml in DEPC behandeltem H₂O
- 10x DNA-Ladepuffer (25 ml): 5 g Ficoll 400; 5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0); 5 ml 20% SDS; 0,0625 g Bromphenolblau; 0,0625 g Xylen Cyanol ad 25 ml H₂O
- 10x PBS: 1,5 M NaCl; 0,03 M KCl; 0,08 M Na₂HPO₄ x 2H₂O pH 7,2
- 50x TAE-Puffer: 2 M Tris-HCl; 57,1 ml konz. Essigsäure; 0,05M EDTA

- 10x TBS(T): 0,1 M Tris-HCl pH 8,0 oder pH 7,4; 1,5 M NaCl; (5% Tween 20)
- Lösungen für die Plasmid-Präparation: [Lösung A: 50 mM Glukose; 25 mM Tris·Hcl, pH 8,0; 10 mM EDTA], [Lösung B: 0,2 N NaOH; 1% SDS], [Lösung C: 30 ml 5 M Kac; 5,75 ml Eisessig; 14.25 ml H₂O]
- Lösungen für In situ Hybridisierungen auf Paraffinschnitten: [Hybridisierungspuffer: 50% Formamid; 5x SSC pH 4,5; 50 µg/ml Hefe-tRNA; 1% SDS; 50 µg/ml Heparin], [Waschlösung I: 50% Formamid; 5x SSC pH 4,5; 1% SDS], [Waschlösung III: 50% Formamid; 2x SSC pH 4,5], [NTMT: 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 0,1% Tween 20; 2 mM Levamisol]
- 20x SSC: 175,32 g NaCl; 88,23 g Natriumcitrat; pH-Wert auf 4,5 mit Zitronensäure
- Narkosebad: 0,5 g Tricain auf 0,5 l H₂O
- Desinfektionsbad: 5 g Sulfermerazine 1 l
- SOB-Medium: 20 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl ad 1 L H₂O nach dem autoklavieren 10 ml steriles 1 M MgCl₂ und 10 ml 1 M MgSO₄
- SOC-Medium: zu 100 ml SOB-Medium wird 1 ml 2 M Glucose (sterilfiltriert gegeben)
- Proteinextraktionspuffer (EP) : 25mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH8,0; 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche); 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail Set III (Calbiochem); 2,5% SDS; 0,5% Triton X-100; x µl ddH₂O
- 20x Elektrobloiting-Puffer: 163,2 g Bicine; 209,3 g; BisTris; 12 g EDTA ad 2 L dd H₂O
- 1x Elektrobloiting-Puffer: 50 ml 20x Elektrobloiting-Puffer; 200 ml ad 1 L dd H₂O

2.1.8 Für Western Blots verwendete Primärantikörper

Bezeichnung	Spezies	Phosphorylierungs- stelle	MW in kDa	Hersteller; Bestnr.	Verdünnung
Akt	Kaninchen		60	CST;	1.1000
Cofilin	Kaninchen		19	CST; 3312	1: 1000
Destrin/ADF	Kaninchen		19	Sigma; D8815	1: 1000
Erk 1	Maus		44/ 42	BD; 610030	1: 5000
Erk 2	Maus		42	BD; 610103	1: 5000
MEK 1	Maus		45	BD; 610121	1: 1000
MEK 2	Maus		46	BD; 610235	1: 1000
MF20 (MyHC)	Maus		~200	Prof. Braun	1: 1500
P-4EBP1	Kaninchen	Thr 37/ 46	15-20	CST; 2855	1: 1000
P-Akt	Kaninchen	Thr 308	60	CST; 9275	1: 500
P-Akt	Kaninchen	Ser 473	60	CST; 9271	1:500
PCNA	Maus		36	BD; 610664	1: 2000
P-CREB	Kaninchen	Ser 133	43	CST; 9191	1. 1000
P-Elk 1	Kaninchen	Ser 383	62	CST; 9181	1: 1000
P-Erk1/2	Kaninchen	Thr 202/ Tyr 204	42/ 44	CST; 9101	1. 1000
P-GSK 3 β	Kaninchen	Ser 9	46	CST; 9336	1: 1000
P-Histon 3	Kaninchen	Ser 10	17	CST; 9701	1: 1000
P-MEK1/2	Kaninchen	Ser 217/ 221	45	CST; 9121	1. 1000
P-MSK 1	Kaninchen	Ser 376	90	CST; 9591	1: 500
P-p38	Kaninchen	Thr 180/ Tyr 182	43	CST; 9211	1: 1000
P-p70S6 Kinase	Kaninchen	Thr 412/ Ser 424	70, 85	CST, 9204	1: 1000
P-p70S6 Kinase	Kaninchen	Thr 389	70, 85	CST; 9234	1: 500
P-S6 rib. Prot.	Kaninchen	Ser 240/ 244	32	CST; 2215	1: 2000
P-p90 RSK	Kaninchen	Ser 380	90	CST; 9341	1: 1000
P-PKC (pan)	Kaninchen	Thr 410	76-85	CST; 2060	1: 1000
P-SAPK/ JNK	Kaninchen	Thr 183/ Tyr 185	46, 54	CST; 4671	1. 1000
P-TSC2	Kaninchen	Tyr 1571	200	CST; 3614	1: 1000
Ral A	Maus		24	BD; 610221	1: 5000
Troponin T	Maus		~ 25	HyTest; 4T19	1: 1000

Tab.1: Primärantikörper für Western Blots

2.1.9 Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

Name	Klon	Spezies	Hersteller/Bestnr.	Verdünnung
Anit-Collagen Type VI Rabbit		Kaninchen	Rockland/600-401-108- 0.5	1:50
Anti-Digoxigenin - AP Fab Fragmente 150 U (200 µl)			Boehringer/	1:2500
Fibronectin		Maus	Hybridomabank/ MT4	1: 200
MF 20		Maus	Hybridomazellüberstand von Prof. Braun	1:20
Monoclonal Anti- Actin, α -Smooth Muscle-FITC	1A4	Maus	Sigma/ F-3777	1:200
Monoclonal Anti- Caldesmon	hHCD	Maus	Sigma/ C 4562	1:100
Monoclonal Anti- Calponin	hCP	Maus	Sigma/ C 2687	1: 100
Monoclonal Anti- β -Actin	AC-15	Maus	Sigma/ A 5441	1:100
Monoclonal Anti- α - Actinin	EA53	Maus	Sigma/ A-7811	1:50
Monoclonal Anti- α Smooth Muscle Actin	1A4	Maus	Sigma/ A 2547	1:100
Monoclonal mouse anti- troponin T	1F2	Maus	Acris/ 4T19	1:140
Myomesin	B4	Maus	Hybridomazellüberstand von Prof. Eppenberger	1:10
Thymosin beta 4		Kaninchen	Abcam/ ab 14334	1:100
Blastemmarker 22/18		Maus (Ig M)	Hybridomabank	1:16
Phospho- Histon H3		Kaninchen	NEB/ 9701	1:300

Tab.2: Primärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen

2.1.10 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen, Western Blots und *in situ* Hybridisierungen

Name	Hersteller/ Bestnr.	Verdünnung
Anti-Digoxigenin - AP Fab Fragmente 150 U (200 µl)	Boehringer	1:2500
Donkey Anti-Rabbit, Cy3	Chemicon/ AP182C	1:300
Donkey Anti-Mouse, Cy2 Conjugated	Dianova/ 715-225-151	1:100
Donkey Anti-Mouse, Cy3 Conjugated	Chemicon/ AP 192C	1:100
Cy2 Donkey-Anti-Rabbit	Biomeda/ SJ29002	1:100
Biotinylated Anti-Mouse IgM	Vector/ BA-2020	1:100
HRP-gekoppelt-Anti-Maus	Pierce/	1:3000
HRP-gekoppelt-Anti-Kanichen	Pierce/	1:3000

Tab.3: Sekundärantikörper

2.1.11 Tertiärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Name	Hersteller/ Bestnr.	Verdünnung
Cy2 Conjugated Streptavidin	Rockland/ S000-11	1:100
Dapi	Molecular Probes/ D-3571	1:1000
Phalloidin-TRITC labeled	Sigma/ P-1951	1:300

Tab.4: Tertiärantikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

2.1.12 Liste der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	T(an) in C°	Produkt in bp
TB1-MHC	Fw-5`TGACAGGAGCAGCCAGGATG-3` Rv-5`ACATTGCTTTATTTTCAGCGTG-3`	56	340
TB2	Fw-5`ACTCCCTGAAACAGACCGGAC-3` Rv-5`CGCTATTGGCTAAATTCAGTC-3`	56	240
TB5-TroponinT	Fw-5`TCATTGAGCTCACGGAGAGG-3` Rv-5`GTCACTGACTCGGTTCCCTCAG-3`	56	445
TB8-NADH-DH	Fw-5`TGTCTTCGTTACCTCACG-3` Rv-5`CACTCTGGAACCTTGTAGCAGTC-3`	56	290
TB10-β Aktin	Fw-5`CTGTCATTCCAAATATTGTGTAATGC-3` Rv-5`GAGGAGAGATTGTAACCTAACAGG-3`	56	245
MRLC	Fw-5`AGGAGTCTGCGCTGCTCTACTC-3` Rv-5`AACATCTTCCGGGTCAGTGC-3`	56	360
TB13-Xen. MRLC	Fw-5`AGGAGTTCAAGGAGGCATTCAG-3` Rv-5`GGGTCCAACAACCTTGAATGC-3`	56	245
TB19	Fw-5`CTTCTCAAACCCATGAGAAGG-3` Rv-5`CCGTAACCTACTTTCACAGGG-3`	56	300
TB25-Fhl1	Fw-5`GGATGTCTCAAGCACATCTTACC-3` Rv-5`GTAGCAATCCACACAGTAGAACAG-3`	56	330
TB 46	Fw-5`GTTCTCATCACGTTGAGACC-3` Rv-5`CGCTTGTTTTATTAGTTGCTC-3`	56	126
TB 54-Hb β	Fw-5`ACAGCCHACGATTGCAAGG-3` Rv-5`AGTTGGAGTGCAGGGTCAGG-3`	56	345
TB 59-Xen.RNP	Fw-5`AGAATTTGGCATAAGGCTACAG-3` Rv-5`AGCGAACTGTGGCTATGAGTC-3`	56	200
sm-alpha-aktin [227D_C07]	Fw-5`CGGGCATGAAACAACCTTACA-3` Rv-5`ATTTTGGGATGGAATTGTGG-3`	55	410
Xen-Thymosinβ4 [248A_D08]	Fw-5`TCACAGGGATCAAGGCTTCT-3` Rv-5`TCCAATCTCCCTTTGCATCT-3`	55	303

Tab.5: Oligonukleotidsequenzen

2.2 Methoden

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Standardmethoden der Molekularbiologie nach „Molecular Cloning“ (Sambrook et al., 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1992) durchgeführt. Die wichtigsten in dieser Arbeit angewendeten Techniken werden im Folgenden kurz beschrieben.

2.2.1 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Die Sterilisation von Lösungen, Medien und Labormaterialien (z.B. Glaswaren, Pipettenspitzen u.ä.) erfolgte in Autoklaven der Firma Sauter und Fedegari für 30 min bei 2,2 bar Druck und 134°C. Lösungen mit hitzesensitiven Bestandteilen wurden gegebenenfalls durch 0,2 µm bzw. 0,45 µm Cellulose-Acetat Sterilfilter (Sartorius) entkeimt.

2.2.2. Extraktion von Nukleinsäuren aus Geweben

Die Präparation von Gesamt-RNS aus diversen Geweben erfolgte mittels Trizol[®] Reagent (Invitrogen) nach den Empfehlungen des Herstellers. Zur Zerkleinerung der Gewebeproben wurde entweder ein elektrischer Gewebezerkleinerer für Eppendorfgläser oder eine Stahlkugel in einer Schwingmühle (Retsch MM 301) mit 20 Schwingungen pro Sekunde für zwei mal drei Minuten benutzt. Zur Isolation von RNS aus 30 Molchherzen für die Herstellung der cDNS-Bibliothek bzw. für die Durchführung der cDNS-Subtraktion wurde für jeweils 10 Herzen 1 ml Trizol eingesetzt. Nach der Gewebezerkleinerung wurden Gewebereste durch eine zehnmündige Zentrifugation bei 12.000 x g und 4°C pelletiert. Ansonsten wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.2.1 Isolation von mRNS aus Gesamt-RNS

Die Isolation von mRNS erfolgte mit Hilfe des Oligotex[®] mRNS Mini-Kits (Quiagen) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3 Transformation von *E. Coli*-Zellen mit Plasmiden

Ligationsansätze wurden in chemisch- oder elektrokompetente *E.coli* XLI blue Bakterien transformiert. Die gesamten 10 µl der Ligationsansätze wurden zu 200 µl auf Eis aufgetauten chemischkompetenten Bakterien gegeben und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für zwei Minuten, bevor die Bakterien für 30-60 Minuten in 1 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt wurden und in verschiedenen Konzentrationen auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausgestrichen wurden. Die Bakterien wurden auf den Agarplatten bei 37°C über Nacht im Brutschrank kultiviert. Je nach Art der verwendeten Plasmide und in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Agarplatten war eine Blau-Weiß-Selektion hinsichtlich solcher Kolonien, welche Plasmide mit integriertem Insert aufgenommen haben, möglich. Für die Transformation der cDNS-Bibliothek wurden 4 µl Ligationsansatz zu 40 µl Elektro-Ten-Blue[®] Electroporation Competent Cells (Stratagene) auf Eis gegeben und in einer sterilen 1 mm Elektroporationsküvette (Peqlab) im Electro Square Porator[™] ECM 830 (BTX) mit folgenden Einstellungen: 1700 V; 176µs Pulslänge; 25 Pulse; Intervall von 100 ms transformiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 960 µl SOC-Medium verdünnt und bei 37°C für 90 min im Schüttler inkubiert. Ansonsten ist wie bereits beschrieben weiter verfahren worden.

2.2.4 DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Dabei wurde nach Protokollen der Firma ABI (Applied Biosystems) durch "Dye Terminator Cycle Sequencing" in der automatischen Sequenziermaschine 310 Genetic Analyser (ABI). Pro Reaktion wurden 100-200 ng Plasmid 4 µl "Ready Reaction Premix", 2 µl 5x "Big Dye Sequencing Puffer" und 1 µl Oligonukleotid (5 pmol) eingesetzt und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt.

2.2.5 Amplifikation von DNS-Fragmenten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lässt sich ein DNS-Segment, das von bekannten Sequenzen begrenzt wird, durch eine sich zyklisch wiederholende Abfolge von Reaktionsschritten amplifizieren (Saiki et al., 1988). Durch den Einsatz geeigneter genspezifischer Primer und der Taq-DNS-Polymerase wurden bestimmte Genfragmente amplifiziert und nachgewiesen.

2.2.5.1 RT-PCR

Mittels der RT-PCR lassen sich spezifische mRNS-Moleküle nach vorheriger reverser Transkription nachweisen.

cDNS-Erststrangsynthese:

Für die Synthese einzelsträngiger zur mRNS komplementärer DNS (cDNS) wurden 1-4 µg Gesamt-RNS und 1 µg Oligo-dT-Oligonukleotide in einem Volumen von 21 µl für 10 min bei 65°C zusammen inkubiert. Nach erfolgter Auflösung von Sekundärstrukturen wurde der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt und durch folgende Komponenten ergänzt:

8 µl 5x Reaktionspuffer; 4 µl DTT (0,1 M); 4 µl dNTP-Mix (10 mM); 1 µl RNase-Inhibitor (Rnasin; 40 U gesamt); 2 µl SuperScript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen 200 U/µl).

Der vollständige Reaktionsansatz wurde für 60 min bei 42°C im Heizblock inkubiert. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase durch eine zehnminütige Inkubation bei 70°C hitzeinaktiviert. Vor dem Einsatz in der PCR wurde der Ansatz gegebenenfalls noch verdünnt.

2.2.6 cDNS-Subtraktion

Das in dem „PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit“ (Clontech) angewendete Verfahren ermöglicht die Isolation differentiell exprimierter Sequenzen durch selektive Amplifikation. Aus zwei unterschiedlichen Proben wird mRNA isoliert und aus dieser cDNS synthetisiert. Abb.5 zeigt ein Schema der cDNS Subtraktion. Möchte man sowohl

Gene identifizieren, welche in einem bestimmten Zustand stark, als auch schwach exprimiert werden im Vergleich zu einem Kontrollzustand, führt man die Subtraktion in zwei Richtungen durch.

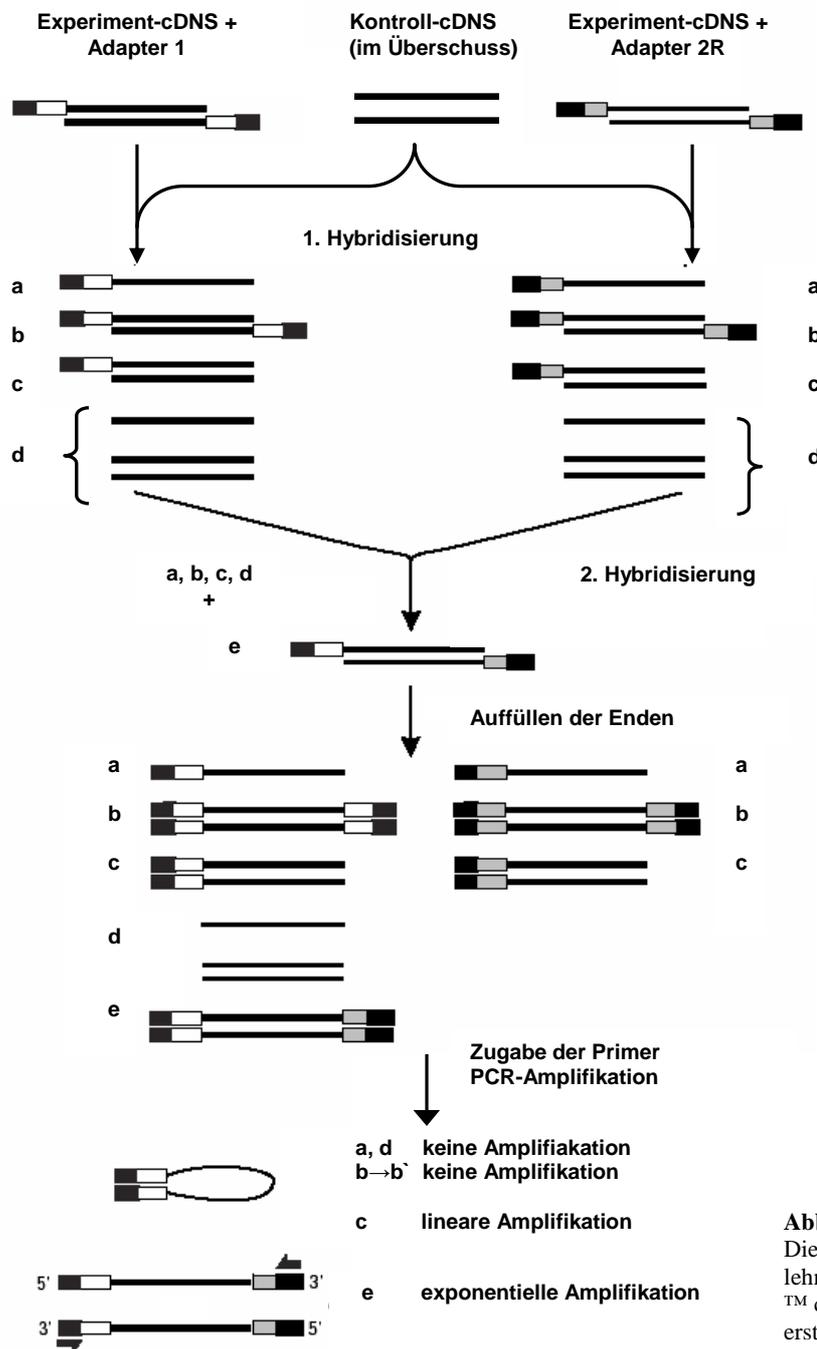


Abb.6: Schema der cDNS-Subtraktion
Die Abbildung wurde in direkter Anlehnung an das CLONTECH „PCR-Select™ cDNA Subtraction“ Benutzerhandbuch erstellt.

Auf Abweichungen von den Angaben im Benutzerhandbuch wird im Folgenden eingegangen:

- Für den Ligationseffizienztest wurden statt der mitgelieferten G3PDH-Oligonukleotide, die für murines und humanes Gewebe spezifisch sind, vorher getestete Aktin-Oligonukleotide verwendet.

- Zur Untersuchung der Subtraktionseffizienz wurden sowohl die nicht subtrahierten cDNSs, als auch die subtrahierten cDNSs zunächst mittels der verschachtelten PCR amplifiziert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine positiv geladene Polyamidmembran transferiert und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen Aktin hybridisiert.

2.2.7 Konstruktion einer cDNS-Bibliothek

Für die Herstellung einer cDNS-Bibliothek aus 1 µg mRNA aus 30 Molchherzen ist das „Creator™Smart™ cDNA Library Construction Kit“ (Clontech) verwendet worden. Die im Kit enthaltenen optimierten Oligonukleotide und Enzyme sollen vor allem die Anreicherung vollständiger cDNSs während der Erst- und Zweitstrangsynthese begünstigen. Im Wesentlichen wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Allerdings wurden für die Zweitstrangsynthese mittels Oligonukleotid-Verlängerung statt drei Amplifikationsrunden fünfzehn Runden benötigt. Für die Ligation in den Plasmidvektor hat sich der Einsatz von 1 µl doppelsträngiger cDNS am besten bewährt.

2.2.8 Transfer von DNS auf Polyamidmembranen (Southern-Blotting)

Nach elektrophoretischer Auftrennung der zu transferierenden DNS-Fragmente im 1 %-igen Agarosegel wurden diese zunächst durch zehnmütige Inkubation in 0,25 M HCl-Lösung depuriniert. Anschließend wurden die DNS-Fragmente mittels 0,4 M NaOH-Lösung über Nacht auf eine positiv geladene Polyamidmembran übertragen. Die Membran wurde 10 min mit 2x SSC gewaschen, getrocknet und die DNA nach 30 min Inkubation bei 80°C auf der Membran immobilisiert.

2.2.9 Markierung von Nukleinsäuren

2.2.9.1 Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten

Für die radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten wurde die Methode des "Random-Priming" (Feinberg und Vogelstein, 1984) angewendet. Hierbei hybridisieren komplementäre Hexanukleotide aus einem Gemisch verschiedenster Basensequenzen ("Random Primer") an die zu markierende DNS. Dabei wird der komplementäre DNS-Strang durch den enzymatischen Einbau (DNS-Polymerase /Klenow-Fragment) von Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ markiert) synthetisiert. Es wurden im Fall der Aktin-Sonde 50 ng DNS und 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP (Amersham) eingesetzt. Für die Markierung der subtrahierten cDNSs wurden zu 100 ng 50 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP gegeben. Die Inkubation betrug 2h bei 37°C. Die Proben wurden anschließend über NAP-5 Säulen aufgereinigt.

2.2.9.2 *In vitro* Transkription zur Synthese von Digoxigenin-UTP markierten RNS-Proben

Sense und antisense RNS-Proben für *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten wurden mit Digoxigenin-UTP markiert. Die als Matrize für die Transkription dienenden DNS-Fragmente befanden sich in einem Plasmidvektor, in dem sie von je einem Promotor für unterschiedliche RNS-Polymerasen flankiert wurden. Dieser Umstand ermöglichte die Generierung von RNS-Proben in beiden Transkriptionsrichtungen (sense und antisense). Für die *in vitro* Transkription und die dabei erfolgende Markierung wurde jeweils ~1 μg zuvor linearisierte DNS verwendet. Die Schnittstellen für die Linearisierungen wurden dabei so gewählt, dass sie die Herstellung von Transkripten mit definierter Länge ermöglichten. Ein typischer Ansatz für eine Transkription setzte sich folgendermaßen zusammen:

x μl	linearisierte DNS (1 μg)
4 μl	5x Transkriptionspuffer
2 μl	100 mM DTT
2 μl	DIG-Mix (DIG-11-UTP, ATP, CTP, GTP, UTP)

1 µl	RNasin (RNase Inhibitor) (40 U/µl)
1 µl	RNS-Polymerase (T3, Sp6 [20 U/µl] oder T7 [15 U/µl])
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde 1 µl Probe abgenommen. Die im Ansatz enthaltene DNS wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl DNase und Inkubation bei 37°C für 15 min abgebaut. Danach wurde die RNS durch Zugabe von:

1 µl	t-RNS (10 mg/ml)
33 µl	DEPC behandeltes 7,5 M Ammoniumacetat
100 µl	DEPC behandeltes H ₂ O
300 µl	100% Ethanol

und einstündiger Inkubation bei -80°C präzipitiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet in 100 µl DEPC behandeltem H₂O aufgenommen. Die vor dem DNase-Verdau entnommene Probe und 5 µl der gelösten RNA wurden zur Kontrolle auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Der verbliebene Rest wurde bei -20°C gelagert.

Bezeichnung	Schnittstelle		RNA-Polymerase		Orientierung		Größe (bp)
TB8-pSK	<i>SalI</i>	<i>XbaI</i>	T3	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	~ 800
TB10-pKS	<i>XbaI</i>	<i>SalI</i>	T3	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	~300
TB14-pSK	<i>SalI</i>	<i>XbaI</i>	T3	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	~900
TB19-pSK	<i>SalI</i>	<i>XbaI</i>	T3	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	~900
TB25-pSK	<i>SalI</i>	<i>XbaI</i>	T3	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	~1800
<i>α-sm muscle actin</i>	<i>SphI</i>	<i>PstI</i>	Sp6	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	410
Thymosin β 4	<i>SphI</i>	<i>PstI</i>	Sp6	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	300
Cytokeratin 18	<i>ApaI</i>	<i>SalI</i>	Sp6	T7	<i>antisense</i>	<i>sense</i>	507

Tab.6: Übersicht über die *in situ* Proben

Sense und antisense RNS-Proben für *in situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten wurden mit Digoxigenin-UTP markiert. Die als Matrize für die Transkription dienenden DNS-Fragmente befanden sich in einem Plasmidvektor, in dem sie von je einem Promotor für unterschiedliche RNS-Polymerasen flankiert wurden. Dieser Umstand ermöglichte die Generierung von RNS-Proben in beiden Transkriptionsrichtungen (*sense* und *antisense*). Für die *in vitro* Transkription und die dabei erfolgende Markierung wurde jeweils ~1 µg

zuvor linearisierte DNS verwendet. Die Schnittstellen für die Linearisierungen wurden dabei so gewählt, dass sie die Herstellung von Transkripten mit definierter Länge ermöglichten. Ein typischer Ansatz für eine Transkription setzte sich folgendermaßen zusammen:

x µl	linearisierte DNS (1 µg)
4 µl	5x Transkriptionspuffer
2 µl	100 mM DTT
2 µl	DIG-Mix (DIG-11-UTP, ATP, CTP, GTP, UTP)
1 µl	RNasin (RNase Inhibitor) (40 U/µl)
1 µl	RNS-Polymerase (T3, Sp6 [20 U/µl] oder T7 [15 U/µl])
ad 20 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl DnaseI (10 U) und Inkubation bei 37°C für 15 min wurde die Plasmid-DNS abgebaut. Danach wurde die RNS unter Zugabe von 10 µg t-RNA, 33 µl 7,5 M Ammoniumacetat, 100 µl H₂O und 300 µl Ethanol präzipitiert, sedimentiert und in 100 µl RNase-freiem H₂O resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.2.9.3 Fluoreszenzmarkierungen von RNS-Proben für die Chiphybridisierungen

1. Erststrangsynthese

Zunächst wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNS zusammen mit 0,5 µl OligoT7-dT₍₂₈₎-VN-Oligonukleotid (0,25 µg/µl) für 10 min auf 70°C erhitzt. Anschließend kurz auf Eis abgekühlt und wieder auf Raumtemperatur erwärmt und folgende Komponenten zugefügt:

2 µl	5x First Strand Buffer (GibcoBRL®)
1 µl	DTT (100 mM; GibcoBRL®)
1 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
0,5 µl	RNase Inhibitor (35 U/µl; Fermentas)
0,5 µl	Superscript II Reverse Transkriptase (200 U/µl; GibcoBRL®)

Der 10 µl Ansatz wurde zuerst für 5 min bei RT und dann bei 42°C für 1 h inkubiert.

2. Zweitstrangsynthese

Für die Zweitstrangsynthese wurden folgende weitere Komponenten zugefügt:

45,5 µl	RNase freies H ₂ O
15 µl	5x Second Strand Buffer
1,5 µl	dNTPs (je 2,5 mM)
0,5 µl	<i>E.coli</i> DNS-Ligase (10 U/µl; GibcoBRL [®])
0,5 µl	RNase H (2 U/µl; GibcoBRL [®])
2 µl	<i>E.coli</i> DNS-Polymerase I (10 U/µl; GibcoBRL [®])

Der gesamte Reaktionsansatz von 75 µl wurde bei 16°C für 2 h inkubiert. Nach Zugabe von 75 µl H₂O wurde erst eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) Extraktion und anschließend noch eine Chloroform Extraktion durchgeführt. Für die Präzipitation der DNS wurden 1 µl Polyacrylamid, 10 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 375 µl eiskalter Ethanol (- 20°C) zugegeben. Nach Zentrifugation mit 14.000 g für 20 min bei 4°C wurde das Präzipitat mit 70 % Ethanol gewaschen und in 4 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

3. In vitro-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde das T7-Megascript Kit (Ambion) verwendet.

4 µl	präzipitiertes Produkt der Zweitstrangsynthese
1 µl	10x Transcription buffer
je 1 µl	75 mM (ATP, CTP, GTP, UTP)
1 µl	Enzym-Mix

Dieser Ansatz wurde für mindestens 6 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 130 µl RNase-freiem Wasser wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) – und Chloroform- Extraktion durchgeführt. Wie zuvor beschrieben wurde die RNA gefällt und gewaschen. Das Präzipitat wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

4. Synthese der fluoreszenzmarkierten cDNS-Proben

Von den amplifizierten RNSs wurden zur Konzentrationsbestimmung 0,5 µl auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt. Äquivalente Mengen Gesamt-RNS (50-100 µg) wurden mit 4 µl regular anchored RAM-Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 15,4 µl gemischt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden folgende Komponenten zugegeben:

6 µl	5x First Strand Buffer (250 mM Tris HCL (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	
		unmarkierte dNTPs:
3 µl	0,1 M DTT	dATP (25 mM)
0,6 µl	unmarkierter dNTP-Mix (25 mM)	dCTP (10 mM)
3 µl	Cy3- oder Cy5-dCTP (25 nM)	dGTP (25 mM)
2 µl	Superscript III (Invitrogen)	dTTP (25 mM)

Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl Superscript wurde die Reverse Transkription nochmals verstärkt und für weitere 30-60 min fortgesetzt. Zur Degradation der RNS und zum Stoppen der Erststrangsynthese wurden 15 µl 0,1 N NaOH und 2 mM EDTA zugefügt und der gesamte Reaktionsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt. Zur Neutralisation wurden 15 µl 0,1 M HCl zugegeben. Zur Aufreinigung der Proben wurden 380 µl TE-Puffer (pH 8,0) in einer Microcon YM-30 Säule (Millipore) vorgelegt. Dann wurden je 60 µl Cy5-Probe zusammen mit der zu vergleichenden Cy3-Probe hinzugefügt und für 20 min bei 14000 xg zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und der Waschschrift mit 450 µl TE-Puffer wiederholt. Beim dritten Waschschrift wurde die 450 µl TE-Puffer noch durch die Zugabe von 20 µg Cot 1 human DNS (10 mg/ml) und 20 µg Poly A RNS (10 mg/ml) ergänzt und wie zuvor beschrieben erneut zentrifugiert. Die Membran durfte nicht vollständig austrocknen, sondern es sollten ca. 25 µl des lilafarbenen, konzentrierten Probengemisches auf der Membran zurückbleiben. Nun wurde die Microcon-Säule umgedreht auf in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und kurz bei 14000 rpm zentrifugiert. Dann wurde die Säule erneut umgedreht und mit 30 µl DEPC-H₂O für eine Minute inkubiert, wiederum umgedreht und in dasselbe Eppendorfgefäß eluiert. Anschließend wurde das Volumen in einer Vakuumzentrifuge auf ca. 5 µl reduziert. Zu dem Konzentrat wurden 80 µl DIG-Hyb-Buffer (Roche) gegeben. Der Ansatz

wurde bei 100°C für maximal 2 min denaturiert und für 20 min bei 14000 rpm bei RT zentrifugiert.

2.2.10 Hybridisierungstechniken

2.2.10.1 Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren oder Koloniefilter

Die Koloniefilter wurden zunächst mit 5xSSC für 15 min bei Raumtemperatur angefeuchtet und anschließend in (0,1xSSC/0,1% SDS) für 30-60 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Die Filter bzw. Southern-Blot-Membranen wurden anschließend in einem geeigneten Volumen Church & Gilbert-Puffer unter Zusatz von 200 µg/ml denaturierter Heringssperma-DNS für 2 h ohne Hybridisierungssonde bei 65°C prähybridisiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte ebenfalls im Church & Gilbert-Puffer (100 µg/ml Heringssperma-DNA) bei 65°C über Nacht mit der erfolgreich radioaktivmarkierten Sonde (100000 - 3 000 000 counts/ml). Am nächsten Tag wurden die Southern-Blots 3 mal für 15 min mit Waschpuffer 1 bei 65°C gewaschen, ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach gemessener Aktivität für 1 bis 7 Tage bei -80°C exponiert. Die Koloniefilter wurden einmal mit (1x SSC/ 0,1 % SDS) für 20 min bei 65°C gewaschen. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit (0,3 % SSC/ 0,1 % SDS) für 15 min und zum Schluss ein letzter Waschschrift mit 0,1 % SSC/ 0,1 % SDS für 30 min.

2.2.10.2 Hybridisierung der cDNS-Microarrays mit fluoreszenzmarkierten cDNS-Proben

Die Glaschips wurden in den Hybridisierungskammern während der Vorbereitung der Hybridisierungsproben auf 42°C vortemperiert. Zuletzt wurde die Probe auf den Chip pipettiert, ohne den gespotteten Bereich zu beschädigen. Das Ganze wurde vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen mit einem passenden Deckgläschen (22 mm x 60 mm) abgedeckt. In die vier Vertiefungen in den Ecken der Hybridisierungskammern wurden zum Erhalt der Feuchtigkeit zusätzlich jeweils 20 µl Hybridisierungspuffer gegeben. Die fest verschraubten Hybridisierungskammern wurden dann bei 42°C über Nacht in einem Wasserbad inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Chips nach dem die Hybridisierungskammern sorgfältig von Außen trocken gewischt wurden, bei maximal 4 Chips pro Objektträgerhalterung nach folgendem Schema gewaschen:

Waschschritt	Beschreibung	SSC (pH 7,0)	SDS (10 %)	Dauer (min)
1 A	2x SSC / 0,03% SDS	200 ml 2x	0,6 ml	10 min
1 B	2x SSC	200 ml 2x	-----	10 min
2	1x SSC	200 ml 1x	-----	5 min
3	0,2x SSC	200 ml 0,2x	-----	2 min

Tab.7: Zusammensetzung der Waschpuffer und Dauer der Waschschritte nach der Hybridisierung

Dabei wurden zunächst die Deckgläschen vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und maximal 4 Chips pro Küvette nach den Angaben in der Tabelle vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Chips einzeln in einem 50 ml-Röhrchen bei 600 rpm für 2 min zentrifugiert um die restliche Flüssigkeit zu entfernen. Die trockenen Chips wurden dann trocken und dunkel bis zum Scannen gelagert.

2.2.10.3 *In situ* Hybridisierung auf Gewebeschnitten

Die Technik der *in situ* Hybridisierung wurde im Labor von David Wilkinson etabliert und stellt eine Methode zur Untersuchung von Expressionsmustern auf Transkriptionsebene (RNA) dar. Dabei wird die auf Komplementarität der Nukleotide beruhende Hybridisierung zwischen endogener Ziel-RNS (sense) und *in vitro* synthetisierter, markierter antisense RNS ausgenutzt. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung der RNS-Proben durch Einbau von Digoxigenin-11-UTP. Die Hybridisierung konnte dann mit Hilfe eines Anti-Digoxigenin Antikörpers, welcher wiederum mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt ist, in einer Farbreaktion nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde neben der antisense-Probe eine ebenfalls synthetisierte *sense*-Probe mit untersucht. Die *sense*-Probe sollte mit der Ziel-RNS kein Signal geben, da die beiden Sequenzen miteinander übereinstimmen und daher nicht hybridisieren können. Alle für den ersten Tag verwendeten Lösungen sind zuvor mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden.

Tag 1: Hybridisierung

Schritt	Dauer	Zusammensetzung	Behälter
Xylol	2x 7 min		Küvette
96% EtOH	3x 2 min		Küvette
70% EtOH	1x 2 min		Küvette
50% EtOH	1x 2 min		Küvette
30% EtOH	1x 2 min		Küvette
PBS	2x 5 min		Küvette
Proteinase K	1x 5 min	10 µg/ml in PBS	Küvette
Glycin	1x 10 min	2 mg/ml in PBS	Küvette
PFA/Glutaraldehyd	1x 15 min	4% PFA/0,2 % Glutaraldehyd	Küvette
Essigsäureanhydrid	1x 10 min	0,25% in 0,1 M Triethanolamin	Küvette
PBS	2x 5 min		Küvette
Hybridisierungspuffer	1x 20 min	100-200 µl/Objektträger	feuchte Kammer, 65°C
RNS-Probe	über Nacht	ca. 100 ng/200 µl	feuchte Kammer, 70°C

Tab.8: Inkubationsschritte am ersten Tag

100 ng der RNS-Proben wurden zu 200 µl Hybridisierungspuffer gegeben und durch Inkubation bei 80°C für 10 Minuten denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf die Schnitte pipettiert und diese mit Deckgläschen abgedeckt.

Tag 2: Antikörper Inkubation

Schritt	Dauer	Zusammensetzung	Behälter
Waschlösung I	mehrmals, kurz		Küvette, 65°C
Waschlösung I	3x 15 min		Küvette, 65°C
Waschlösung III	3x 15 min		Küvette, 65°C
TBST	3x 10 min		Küvette, RT
Blockierung	1x 30 min	TBST + 5% Schafserum	feuchte Kammer RT
Anti-Dig-Ak	über Nacht	1:2500 in TBST + 1% Schafserum	feuchte Kammer 4°C

Tab.9: Waschschritte und Antikörperinkubation

Tag 3: Färbung

TBST	4x 15 min	Küvette
NTMT	3x 10 min	Küvette

Zuletzt erfolgte die Inkubation in der NBT/BCIP Färbelösung im Dunkeln über eine Dauer von 10 Stunden bis zu drei Tagen.

2.2.11 Haltungbedingungen der Molche

Adulte Molche der Gattung *Notophthalmus viridescens viridescens* wurden in der freien Wildbahn auf dem Gelände von der Charles D. Sullivan & Co. Incorporation eingefangen und verschickt. Pro Aquarium (HxBxT: 35cm x 62 cm x 38 cm) konnten zehn bis 15 Tiere untergebracht werden. Diese wurden zweimal wöchentlich mit lebenden roten Mückenlarven gefüttert. Aquarien waren mit einer kleinen Insel sowie einigen künstlichen Wasserpflanzen ausgestattet. Die Wassertemperatur betrug 18-20°C. Über ein Pumpen- und Filtersystem konnte das Wasser durch die Aquarien zirkulieren und ständig frisches Wasser zugeführt werden.

2.2.12 Operative Eingriffe am MolchNarkose und Wunddesinfektion

Am Tag des operativen Eingriffs erhielten die Versuchstiere kein Futter. Für die Einleitung der Narkose wurden die Molche für ca. 10 min in einem Becherglas mit 0,1 % iger Tricain-Lösung gehalten. Zur Desinfektion der Wunden wurden die operierten Tiere über Nacht in einem geeigneten Behälter mit 0,5%-iger Sulfamerazine-Lösung gehalten.

Intraperitoneale Injektionen von Inhibitoren

20 µg pro g Molch wurden in einer 42%-igen Methanol-A-PBS-Lösung mit einer MEK1/2-Inhibitor U0126 wurde mittels einer sterilen 1ml Plastikspritze und einer 27 G x 3/4“ Kanüle direkt i.p. in das narkotisierte Versuchstier gespritzt. Zwei Stunden später

erfolgte die mechanische Ventrikelschädigung. Je nach Versuchsansatz erfolgten an den drei darauffolgenden Tagen weitere intraperitoneale Injektionen.

Schädigung des Ventrikels

Narkotisierten Tieren wurde zunächst mit einer Microschere ein ca. 1 cm langer Schnitt in die Oberhaut gemacht. Dieser verlief oberhalb der Vorderbeine sagittal in der Mitte bis zum Anfang des Kopfes. Es folgte ein zweiter Schnitt transversal durch die Unterhaut. Von hier aus war der kräftige Truncus arteriosus sichtbar, welcher vorsichtig mit einer Pinzette ergriffen wurde und das Herz aus der Körperöffnung gezogen wurde. Die Schädigung erfolgte durch fünfzehnmaliges Quetschen des Ventrikels mit einer Pinzette. Anschließend wurde das Herz vorsichtig wieder in den Brustkorb zurückgeschoben und der Schnitt in der Oberhaut mit Cyanacrylatklebstoff verklebt. Während des Aufwachens wurden die Molche in einem Becherglas mit Wasser gehalten und nach dem Desinfektionsbad in ihre Halterbecken zurückgesetzt.

Amputation der Schwanzspitze oder der Hinterextremität

Narkotisierten Tieren wurde mit einer scharfen Schere entweder ein ca. 5 mm langes Stück Schwanz oder der distale Teil einer Hinterextremität entfernt. Für die Gewinnung von Blastemgewebe wurde nach einem geeigneten Zeitraum nach der Amputation das nachwachsende Regenerat möglichst exakt herausgeschnitten.

2.2.13 Einbettung von Gewebeproben

2.2.13.1 Plastikeinbettungen für die Anfertigungen semidünner (2 µm)

Ultramikrotomschnitte

Gewebe die nachfolgend elektronenmikroskopisch analysiert werden sollten, wurden nach der Entnahme kurz in Amphibien-PBS gewaschen und dann bis zur Einbettung in 3%-Glutaraldehyd bei 4°C gelagert. Es folgte ein Waschschriff in Cacodylatpuffer (pH 7,4) mit Saccharose über Nacht. Anschließend wurden die Proben wie folgt in einem Microscopy Tissue Processor (Lynx™ el; Reichert-Jung) 120 min bei 4°C in 4%-iger Osmiumtetroxidlösung (Roth (Karlsruhe)) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Cacodylatpuffer pH 7,4 ohne Saccharose. Zum Dehydratisieren wurde eine aufsteigende

Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, zweimal 100%) für jeweils 30 min bei ebenfalls 4°C durchlaufen. Danach wurden die Proben zweimal für 15 min und 4°C in Propylenoxid (Merck) und für 60 min in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epoxid-Harz (Ladd; USA) inkubiert. Zuletzt wurden zwei einstündige Inkubationen in reinem Epoxid-Harz bei 37°C und eine dritte für 15 min. Zuletzt wurden die Herzen in Silikonformen in dem Epoxidharz für 3 Tage zum Aushärten in einen 50°C Inkubator gestellt. Semidünne Schnitte wurden dann am Ultramikrotom (Ultracut E; Reichert-Jung) angefertigt und anschließend mit Toluidin-Blau kontrastiert.

Toluidin-Blau-Stocklösungen:

A: 1%-ige wässrige filtrierte Lösung

B: 0,5%-ige wässrige Lösung pH 11,4

Gebrauchslösungen:

0,5%-ige Lösung : 1%-iger Lösung (1:6)

2.2.13.2 Einbettungen in Paraffin

Für Antikörperfärbungen und *in situ* Hybridisierungen wurden Organe in 4% Paraformaldehyd in PBS für 2 h bei 4°C fixiert und anschließend durch halb- bis einstündige Inkubationen in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%, und 2x 100% Ethanol) entwässert. Es folgte eine zweimalige Inkubation in reinem Xylol von je einer Stunde. Als Nächstes wurde mit einer 1:1 Mischung aus Xylol und Paraffin fortgefahren. In diesem Gemisch wurde eine Stunde lang bei 60°C inkubiert, bevor sich die einzubettenden Objekte zweimal eine Stunde lang mit 60°C warmem Paraffin infiltriert wurden. Zuletzt wurden die Embryonen bzw. Organe in eine Plastikform gegossen und mit flüssigem Paraffin bedeckt. Nach dem Erhärten bei Raumtemperatur wurden die Paraffinblöcke bei RT gelagert.

Paraffinschnitte wurden mit einer Dicke von 10 µm am Rotationsmikrotom RM 2145 (Leica) angefertigt und auf mit Vectabond-Reagenz beschichteten Objektträgern platziert. Nachdem die Schnitte auf einer Heizplatte bei 45°C mindestens 30 Minuten gestreckt wurden, konnte die Lagerung bei 4°C bzw. RT erfolgen.

2.2.13.3 Einbettungen in Gefriermedium

Frisch präpariertes Gewebe wurde nach kurzem Waschen in PBS entweder direkt in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Eppendorfgefäß, oder in eine kleine aus Parafilm gefaltete mit Kryoeinbettungsmedium gefüllte Tasche überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zum Schneiden wurden die Gewebe bei -80°C gelagert. Die gefrorenen Gewebestücke wurden vor ihrer Einbettung mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Pinzette im Kryostaten in gewünschter Orientierung platziert. Auf einen Objekthalter wurde etwas Gefriermedium gegeben und so lange gewartet, bis sich dieses milchig weiß verfärbt und langsam fest wird, dann wurde das Gewebe darauf platziert, kurz in flüssigen Stickstoff getaucht und mit einem weiteren Tropfen Gefriermedium bedeckt. Der Objekthalter wurde bis zum vollständigen Gefrieren des Einbettungsmediums in flüssigen Stickstoff getaucht.

Für die Anfertigung der $6\ \mu\text{m}$ dicken Gefrierschnitte, wurde im Kryostaten (CM 3050 S; Leica) eine Kammertemperatur von -25°C und eine Objekthaltertemperatur von -21°C eingestellt. Die Schnitte wurden auf mit silikonbeschichtete oder kommerziell vorbehandelte Objektträger aufgenommen, 30 min an der Luft getrocknet und in 4% PFA für 10 min bei RT fixiert und bis zur Antikörperfärbung in PBS im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.14 Antikörperfärbungen auf Gefrierschnitten

Fixierte Gewebeschnitte wurden zunächst 2×3 min in PBS (pH 7,4) gewaschen. Dann wurde der erste Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS auf die Schnitte pipettiert und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde der entsprechende mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Zweitantikörper appliziert und für 2h bei RT inkubiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte gegebenenfalls noch eine Kernfärbung mit DAPI (1:1000) für 15-20 min und oder eine F-Aktin-Färbung (Phalloidin) 1:200 für 30 min bei RT. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte mit Mowiol eingedeckt und dunkel bei 4°C gelagert.

2.2.15 Proteinpräparationen und Western Blots

Molchherzen wurden in je 120 μ l Extraktionspuffer (EP) mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus 15% Power, 1 Zyklus von 20s Länge) zerkleinert und für 1 min bei 99°C denaturiert. Restliche Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation für 5 min bei 14.000 rpm präzipitiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und ein 10 μ l Aliquot für die Konzentrationsbestimmung der Proteine abgenommen. Zu dem restlichen Proteinlysat wurden 4,4 μ l 1M DTT gegeben und die Proben bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels des DC Protein Assay kit (BioRad Laboratories, CA, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die für jede Messung neu angesetzte BSA-Standardkurve umfasste einen Bereich von 2- 20 μ g. Die colorimetrische Messung erfolgte an einem FLUOstar Galaxy (bMG) Messgerät.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte unter Verwendung von NuPAGE® Novex Bis-Tris Gelen (4-12%) (Invitrogen, Germany) in dazu passenden Gelelektrophoresekammern in einem 1x MES SDS Running Buffer (NuPAGE; Invitrogen). Pro Tasche wurden 10 μ g Protein aufgetragen. Dazu wurden x μ l Proteinlösung mit 2 μ l EP und y μ l LB/DTT-Puffer auf ein Volumen von 10 μ l gebracht. Durch den Zusatz von je 0,4 μ l Bromphenolblaulsg. konnte die Migration der Proben auf der SDS-PAGE visualisiert werden. Als Größenstandard wurden 5 μ l BenchMark™ (Invitrogen, Germany) mit aufgetragen. Die ersten 15 min wurden die Gele einer Spannung von 75V, die restlichen ca. 1,5h bei 130V ausgesetzt.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel in einem XCell II™ Blot Module (Invitrogen, Germany) elektrisch auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 μ m Porengröße; Invitrogen, Germany) für drei Stunden bei 30 V geblottet. Anschließend wurden die Membranen für 2-5 min in Red Alert-Lsg. (Novagen, Germany) gefärbt und zwischen Filterpapier bis zum Scannen getrocknet. Nach dem Scannen wurden die Membranen anhand der Markerbanden in geeignete Streifen zerteilt, um gleichzeitig verschiedene primäre Antikörper verwenden zu können.

Die Membranstreifen wurden dann auf einem Schüttler 15 min in ddH₂O wieder angefeuchtet. Danach erfolgte eine Inkubation mit je 5 ml Enhancer Reagent 1 (Pierce, Biotechnology, Inxc., IL, USA) pro Membranstreifen für 2 min und anschließendem fünfmaligem Waschen für je 2 min in ddH₂O. Danach wurde in je 5 ml Enhancer Reagent 2 (Pierce, Biotechnology, Inxc., IL, USA) für 10 min inkubiert und wiederum fünf Mal mit

Kulturmedium:	60% MEM + GlutaMax (Gibco; 42360) 10% FCS (PAA Laboratories GmbH) 2% Penicillin/Streptomycin/Glutamin 28 U/ 100ml Insulin (Sigma; I-0516)
100x P/S/G-Stocklösung:	10.000 U/ml Penicillin G sodium (Gibco, UK) 10.000 µg/ml Streptomycin sulfate (GibcoUK) 29,2 mg/ml L-Glutamine (Gibco,UK)

2.2.16.1 Behandlung der Kardiomyozytenkulturen mit dem Inhibitor U0126

Die Zellen wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen mit reinem Methanol, 10µM oder 80 µM U0126 inkubiert. Dabei wurde pro Konzentration zwei Kammern behandelt. Jeden zweiten Tag, also insgesamt 3 Mal wurde, das Medium unter Zusatz des Lösungsmittels bzw. des Inhibitors erneuert.

2.2.17 Mikroskopie und Fotodokumentation

Die mikroskopische Begutachtung und fotografische Dokumentation von fluoreszenzgefärbten Gewebeschnitten oder Zellkulturen erfolgte am Imager.Z1 (Zeiss) mit integrierter Axiocam (Zeiss). Für die Hellfeldaufnahmen wurde ein Axiophot 2 (Zeiss) Mikroskop mit integrierter Axiocam (Zeiss) verwendet. Aufnahmen erfolgten an beiden Mikroskopen mit der Software Axiovision Rel. 4.5 (Zeiss).

3. Ergebnisse

In früheren Arbeiten von Oberpriller et al. ist die Regenerationsfähigkeit des Molchherzens nach partieller Amputation des Ventrikels oder Atriums in erster Linie anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen histologisch untersucht worden (Bader and Oberpriller, 1979; McDonnell and Oberpriller, 1983; McDonnell and Oberpriller, 1984). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer mechanischen Schädigung des Herzens auf die Regeneration des Herzens untersucht werden. Die Untersuchung sollte sowohl morphologische wie molekulare Veränderungen des Regenerationsprozesses umfassen und versuchen zu einem kausalen Modell der Regeneration zu kommen.

3.1 Die mechanische Schädigung des Ventrikels führt zu makroskopisch erkennbaren Läsionen

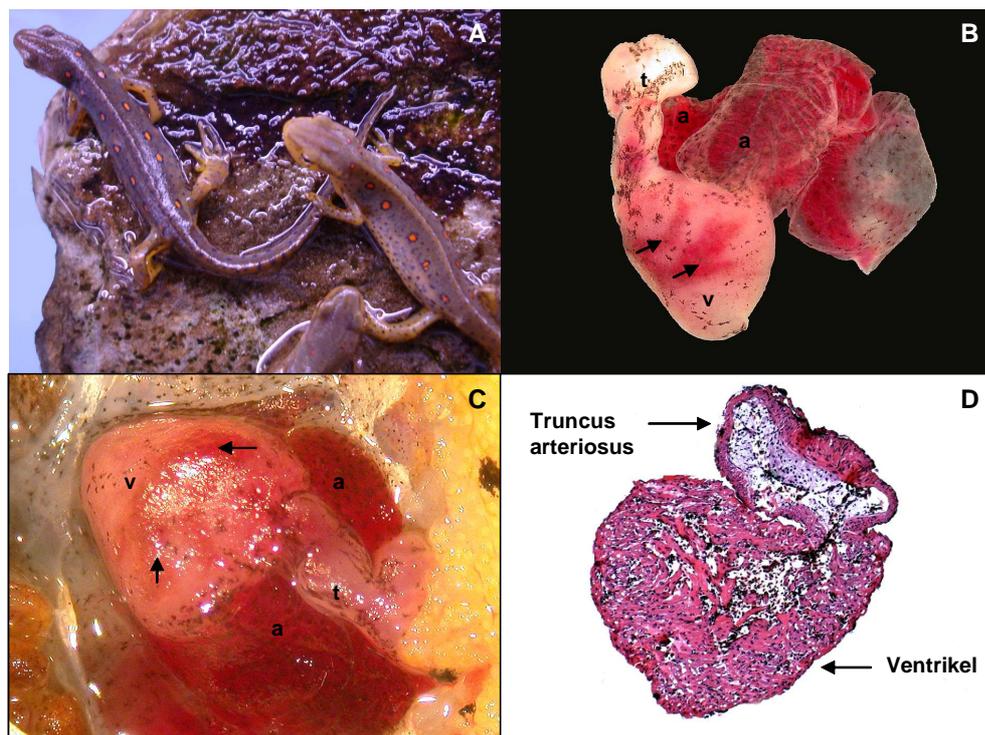


Abb.7: Verschiedene Ansichten des Molches *Notophthalmus viridescens* und seines geschädigten bzw. ungeschädigten Herzens. (A) zwei adulte grünliche Wassermolche (*Notophthalmus viridescens*) (B) isoliertes Herz 14 Tage nach Herzschädigung; t: Truncus arteriosus, a: Atrium, v: Ventrikel, die schwarzen Pfeile markieren die nach der Schädigung sichtbaren Läsionen (C) *in situ* Aufnahme eines Molchherzen, Beschriftungen vgl.(B); (D) Hämatoxylin & Eosin-Färbung eines transversalen Kryotomschnittes durch den Ventrikel und den Truncus arteriosus.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der adulten Molchspezies *Notophthalmus viridescens* (dargestellt in Abb.7 (A)) ventrikuläres Myokard nach mechanischer Schädigung zu regenerieren, untersucht. Die allgemeine Anatomie des Molchherzens ist bereits im 1.2.1.1 beschrieben worden. Auf dem HE-gefärbten Transversalschnitt in Abb.7 (D) kann man die starke Trabekulierung des Myokards und das geringe Ventrikellumen gut erkennen. Um die Schädigung möglichst großflächig und reproduzierbar zu machen, wurden die Ventrikel jeweils 15-mal mit einer feinen Pinzette gequetscht. Die hier verwendete Schädigungsmethode resultierte in dem Erhalt der äußeren Morphologie des Ventrikels bei gleichzeitiger, großflächiger Zerstörung der inneren Struktur des Ventrikels. Die Abb.7 (B) und (C) zeigen die noch 14 Tage nach der Schädigung makroskopisch erkennbaren Schädigungen des Ventrikels. Sie sind in Form von roten Läsionen erkennbar.

3.2 Histologische Untersuchung der Herzregeneration anhand semidünner, transversaler Plastikschnitte

Zur histologischen Untersuchung des Verlaufs der Herzregeneration sind Molchherzen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Schädigung entnommen, in Plastik eingebettet, semidünn (0,5-1µm) geschnitten und anschließend mittels Toluidin-Blau-Färbung gegengefärbt worden. Der scheinoperierte, ungeschädigte Ventrikel des Molchherzens zeichnet sich durch sein kompaktes, stark trabekuliertes Myokard aus. Es wird nach außen von einem einschichtigen Epikard begrenzt und innen werden die Trabekel von einem einschichtigen Endokard umgeben. In Abb.8 (B) und Abb.9 (A) ist das Ausmaß der Schädigung nach vier Tagen zu erkennen. Große Areale sind zerstört und man findet in diesen Bereichen kaum noch intaktes Myokard. Das Epikard wird von Extrazellulärer Matrix (EZM) nach innen verstärkt. Sieben Tage später findet man bereits Bereiche in denen neue schlauchartige, unreife Trabekel entstanden sind, die teilweise von Myozyten besetzt wurden. Zwischen 14 und 21 Tagen wurde das zerstörte Myokard an vielen Stellen bereits durch neues ersetzt. Einige Randregionen zeichnen sich nach wie vor durch ein starkes EZM-Aufkommen aus. In diesem Zeitraum wird das Myokard allmählich wieder kompakter, aber die Folgen der Schädigung bleiben immer noch gut erkennbar. Nach 43 Tagen gibt es nur noch wenige Regionen, die noch nicht wieder das geordnete Erscheinungsbild von intaktem Myokard aufweisen.

70 bzw. 84 Tage nach der Herzschädigung ist die Regeneration komplett abgeschlossen und kein Unterschied im Vergleich mit den scheinoperierten Kontrollherzen erkennbar.

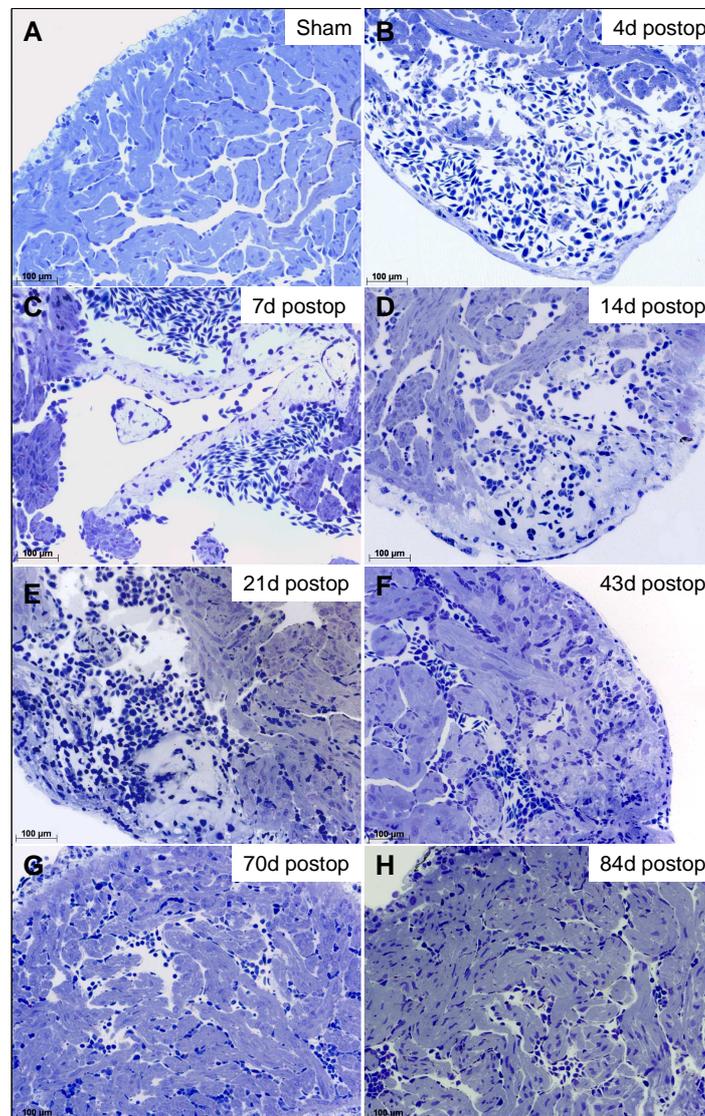


Abb.8: Zerstörung und Regeneration des kompakten, trabekulierten Myokards nach mechanischer Schädigung des Ventrikels Ausschnitte aus semidünnen toluidinblaugefärbten Transversalschnitten aus (A) scheinoperierten Herzen, (B) vier, (C) sieben, (D) 14, (E) 21, (F) 43, (G) 70 und (H) 84 Tage nach Schädigung.

Betrachtet man die 40-fachen Vergrößerungen in Abb.9 (B, E) so erkennt man die schlauchförmigen, unreifen Trabekel deutlich anhand ihrer nur schwachen Blaufärbung. Außerdem befinden sich in ihrem Inneren kaum Zellkerne. Dafür befindet sich auf ihren äußeren Umrandungen eine Vielzahl von sogenannten Trabekel-assoziierten Zellen. In manchen Fällen vgl. Abb.9 (B) wird ein Teil des Trabekels von reiferen Kardiomyozyten (erkennbar an der Querstreifung der Sarkomere und der kräftigeren Blaufärbung) besetzt.

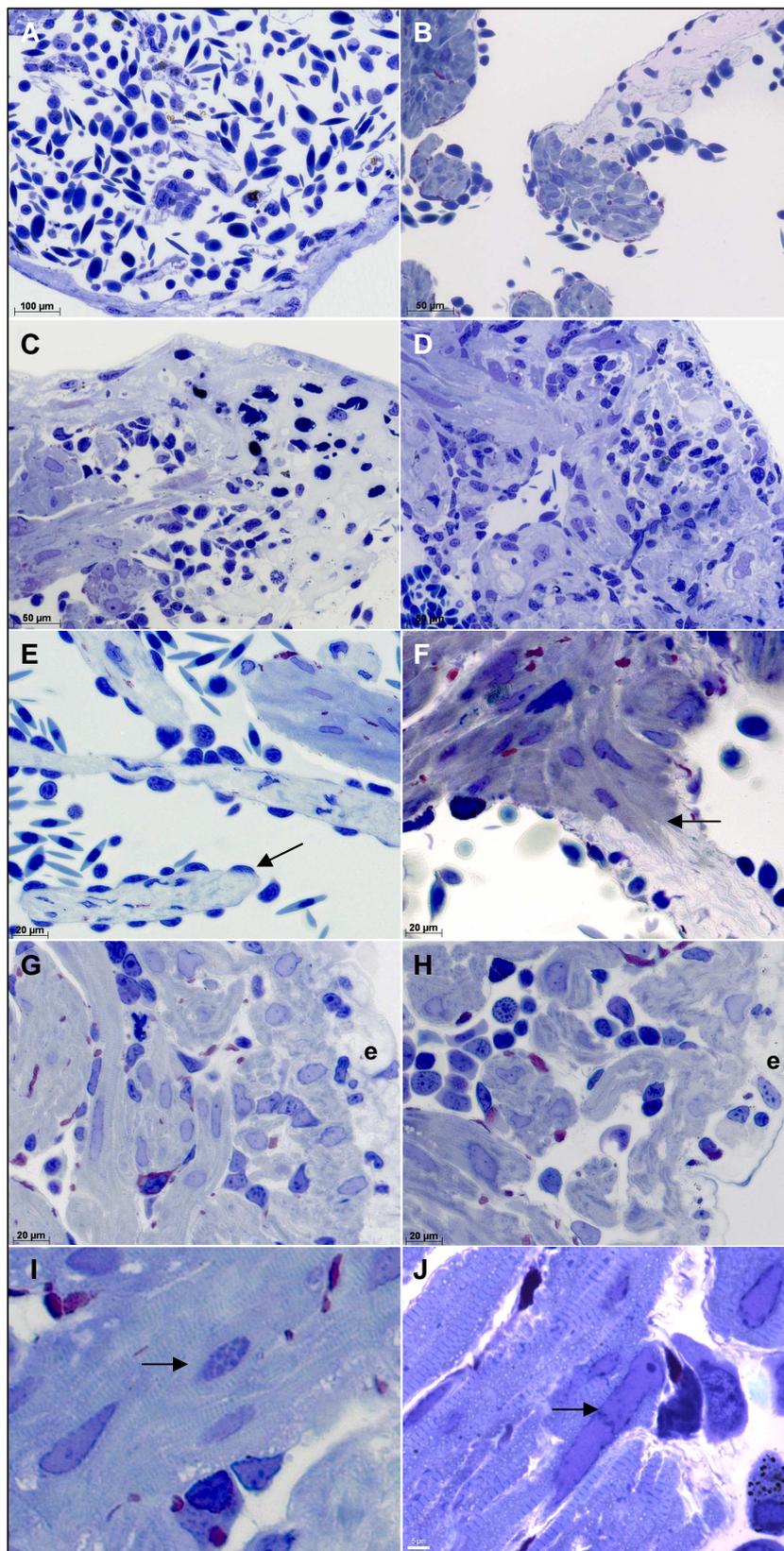


Abb.9: Vergrößerte Ausschnitte aus semidünnen Schnitten von regenerierenden Herzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der mechanischen Schädigung (A) 20-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 4 Tage nach der Schädigung; (B) 20-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 7 Tage nach der Schädigung; (C) 20-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 14 Tage nach der Schädigung; (D) 20-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 43 Tage nach der Schädigung; (E) 40-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 4 Tage nach der Schädigung, der schwarze Pfeil markiert Trabekel-assoziierte Zellen; (F) 40-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 7 Tage nach der

Schädigung, der schwarze Pfeil weist auf einen partiell mit Kardiomyozyten gefüllten Trabekel hin; (G) 40-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes aus einem scheinoperierten Herzen, e: steht für Epikard; (H) 40-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 84 Tage nach der Schädigung, e: steht für Epikard; (I) 40-fache Vergrößerung eines Ventrikelausschnittes 14 Tage nach der Schädigung, der schwarze Pfeil kennzeichnet eine Mitose in Kardiomyozyten; (J) 63-fache Vergrößerung einer Karyokinese innerhalb eines Kardiomyozyten.

3.2.1 Analyse der Mitosehäufigkeit im Verlauf der kardialen Regeneration

Im Rahmen einer erfolgreichen Wiederherstellung von zerstörtem Myokard bedarf es wie bereits beschrieben (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974) der Teilungsfähigkeit verschiedener Zelltypen. Zur Bestimmung der Häufigkeit von Zellkernteilungen in mechanisch geschädigtem Myokard wurden semidünne Schnitte (0,5-1 μm) von je zwei oder drei scheinoperierten Herzen bzw. von Herzen 4, 7, 14, 21 oder 43 Tage nach der Schädigung angefertigt. Anschließend wurden diese mit Toluidinblaufärbelösung kontrastiert. Für jeden Zeitpunkt wurden je vier transversale Schnitte durch den kompletten Ventrikel unter einem Mikroskop mit 63-facher Vergrößerung ausgezählt. Als mitotische Zellkerne wurden solche Kerne definiert, in denen die kondensierten Chromosomen deutlich zu erkennen waren. Außerdem war die in nicht-mitotischen Zellen gut erkennbare Kernmembran in Zellen in der M-Phase nicht mehr sichtbar. Je nach ihrer Lokalisation im Gewebe wurden die Zellkerne als Myozytenkerne, trabekel-assoziierte Zellkerne oder als andere, zu keiner der beiden vorherigen Gruppen zugehörigen Zellkerne bezeichnet. Beispiele für die Zuordnung der verschiedenen Zellen sind in Abb.10 zu sehen.

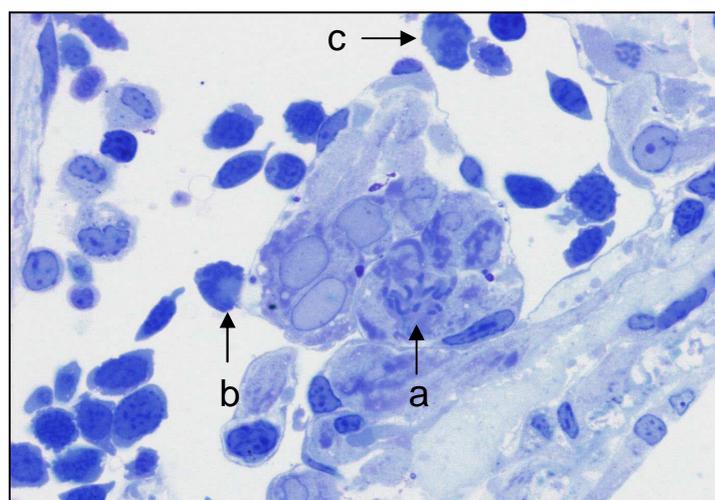


Abb.10: Beispiel für Mitosen in verschiedenen Zelltypen 14 Tage nach Schädigung. Ausschnitt aus einem semidünnen, toluidinblaufärbten Plastikschnitt. Die Pfeile weisen auf einen mitotischen Myozyten- (a), trabekel-assoziierten (b) und nicht-trabekel-assoziierten Zellkern (c).

Myozytenkerne befanden sich innerhalb von Trabekeln in Regionen starker Toluidinblaufärbung. Je nach Schnittrichtung konnten wie in Abb. dargestellt die während der Mitose kondensierten Chromosomen in der Nähe von quergestreiften Sarkomeren lokalisiert werden. Als trabekel-assoziierte Zellen wurden solche Zellen bezeichnet, die einen direkten Kontakt zu der Basalmembran der Trabekel aufweisen. Die als „andere Zellen“ bezeichneten Zellen befanden sich meist in einer lockeren Ansammlung von Zellen, ohne jedoch direkte Zellkontakte zu den Trabekeln auszubilden.

Parallel dazu wurden die Ventrikelschnitte mit einer 2.5-fachen Vergrößerung aufgenommen und unter Verwendung des Programms Image J die Ventrikelflächen berechnet. Somit ließ sich die Anzahl der mitotischen Zellkerne pro mm² Fläche berechnen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb.11 grafisch dargestellt. Im scheinoperierten Ventrikel konnten gelegentlich Mitosen in Nichtmyozytenkernen und ganz selten innerhalb von Myozytenkernen identifiziert werden. Vier Tage nach der Schädigung war schon ein leichter Anstieg der Mitoserate in den Nichtmyozytenkernen zu verzeichnen. Dieser wurde aber nach sieben Tagen zunächst wieder geringer. Die höchste Mitoserate trat in den trabekel-assoziierten Zellkernen 14 Tage nach Herzschädigung auf. Zu diesem Zeitpunkt fand man auch in den Myozyten und in den nicht-trabekel-assoziierten Zellkernen die meisten Mitosen. 21 Tage nach Schädigung fiel in allen drei Zelltypen die Mitoserate wieder ab, und erreichte nach 43 Tagen fast wieder das Kontrollniveau des scheinoperierten Ventrikels. Im Allgemeinen ergab diese Analyse eine eher geringe Mitoserate unter den Myozyten, aber viele Mitosen in den trabekel-assoziierten Zellen.

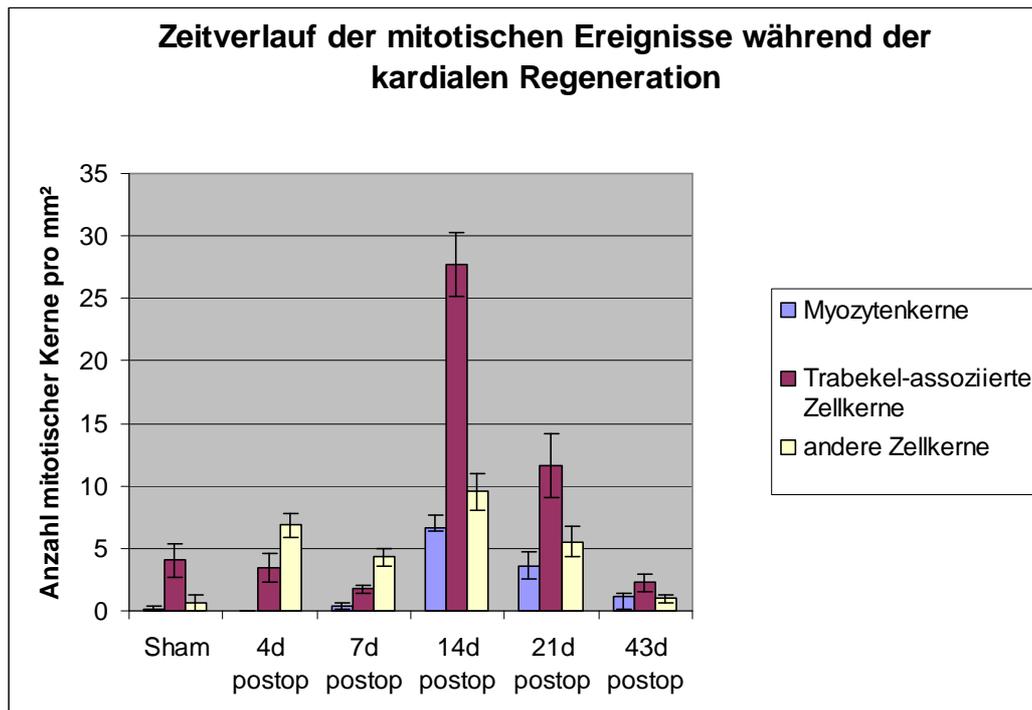


Abb.11: Grafische Darstellung des Zeitverlaufs der Mitosehäufigkeit während der kardialen Regeneration. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler an.

3.3. Herstellung einer cDNS-Bibliothek als Hilfsmittel zur Untersuchung der Herzregeneration im Molch *Notophthalmus viridescens viridescens* auf der transkriptionalen Ebene

Die Herstellung einer eigenen cDNS-Bibliothek wurde notwendig, da das Genom des Molches *Notophthalmus viridescens viridescens* bisher nicht vollständig sequenziert wurde und keine kommerziellen cDNS-Bibliotheken oder cDNS-Microarrays von diesem Organismus zur Verfügung standen. Der Zeitpunkt 14 Tage nach der mechanischen Ventrikelschädigung schien aus verschiedenen Gründen für die Herstellung einer cDNS-Bibliothek geeignet. Zum Einen ist bereits von Oberpriller et al. unter Verwendung eines anderen Schädigungsmodells gezeigt worden, dass in diesem Zeitraum besonders Myozyten im Randbereich des geschädigten Areals eine verstärkte Proliferationsaktivität aufweisen (Bader and Oberpriller, 1979; McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974). Zum Anderen ergab die lichtmikroskopische Analyse von Toluidinblaugefärbten, semidünnen Schnitten von verschiedenen Zeitpunkten nach der ventrikulären Schädigung auch im vorliegenden Schädigungsmodell ein Maximum an Zellkernteilungen 14 Tage nach der Schädigung. Die bereits bekannte Fähigkeit von Amphibien mittels starker Zellteilung sowohl differenzierter Zelltypen (z.B. Myozyten), als auch dedifferenzierter Zelltypen geschädigtes Gewebe vollständig und funktionell zu

ersetzen, stellt einen wesentlichen Vorteil der Amphibien gegenüber den Säugetieren dar. Die Mechanismen, die zu diesem Vorteil führen, sollten mit Hilfe der cDNS-Bibliothek und der anschließend hergestellten Macro- und Microarrays untersucht werden.

Für die Herstellung der cDNS-Bibliothek wurden 14 Tage nach der mechanischen Schädigung die Ventrikel von 30 Tieren entnommen und aus diesen das benötigte eine Mikrogramm m-RNS isoliert. Nach der cDNS-Synthese und weiterer Prozessierung der erhaltenen Fragmente (enzymatischer Verdau, Größenfraktionierung, etc.) konnten diese schließlich in den Plasmidvektor pDNR-Lib kloniert und anschließend in *E.coli*-Bakterien transformiert werden. Zur Überprüfung des Anteils rekombinanter Kolonien und deren Fragmentgrößen, wurden von 18 Klonen Plasmid-DNS präpariert, diese mit dem Restriktionsenzym *SfiI* verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

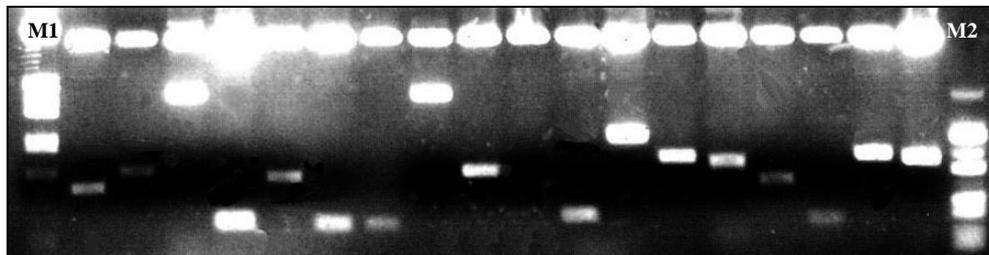


Abb.12: *SfiI*-Restriktionsverdau von 18 Klonen aus der cDNS-Bibliothek
M1: : λ -EcoRI/HindIII DNS-Größenstandard; M2: pUC18-Sau3A DNS-Größenstandard

Wie in Abb.12 zu sehen ist, konnte aus allen 18 Plasmiden ein Fragment herausgeschnitten werden. Zweidrittel der Klone verfügten über Fragmente mit einer Mindestlänge von 500 bp. Die transformierten *E.coli* Bakterien wurden mit einem Titer von $2,5 \times 10^5$ cfu/ml in Form von Glycerolstocks eingefroren.

3.3.1 Herstellung von Macro- und Microarrays

Das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) wurde nach der Fertigstellung der cDNS-Bibliothek damit beauftragt, 100.000 Kolonien zu isolieren, diese auf 384er-Platten zu transferieren und Macroarrays in Form von Koloniefiltern herzustellen. Die komplette cDNS-Bibliothek wurde anschließend auf sieben Koloniefiltersets mit je ca. 15.000 Kolonien abgebildet.

Zusätzlich erfolgte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik der Abteilung von Prof. Dr. Hans Lehrach eine Vervielfältigung der klonierten Fragmente mittels PCR (AG Patricia Ruiz). Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden dann auf zwei Sets von Microarrays mit je 50.000 Fragmenten gespottet und vervielfältigt (AG Claus Hultschig).

Mit der Sequenzierung von dreißig 384er-Mikrotiterplatten, also von insgesamt 11.520 cDNS-Klonen, wurde der DNA-Sequenzierservice des Max-Planck-Instituts für Molekulare Zellbiologie und Genetik (Dresden) beauftragt. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann von den Diplombioinformatikern Mario Looso und Patrick Weiss auf ihre Qualität überprüft. Aus der Qualitätsprüfung der Sequenzen resultierten 9686 Sequenzen von guter Qualität, 257 Sequenzen niedriger Qualität, 105 Klone ohne Sequenzdaten und 260 von sehr geringer Länge. 1200 Sequenzen besaßen kein Insert. Die 9686 Sequenzen hoher Qualität konnten zu 2894 verschiedenen Contigs zusammengefasst werden. Unter Verwendung verschiedener BLAST Algorithmen (BLASTn, BLASTx, tBLASTx) wurde nach Homologien zwischen den Contigsequenzen und den Einträgen in verschiedenen nicht-redundanten Proteindatenbanken (NCBI NR und EST Datenbanken) gesucht. Die Ergebnisse wurden anschließend von den Bioinformatikern Mario Looso und Patrick Weiss in einer eigens programmierten Molch-EST-Datenbank dargestellt. 55% der Contigsequenzen erreichten bei den BLAST-Suchen E-values -20 bis -100 , und damit große Übereinstimmungen mit bereits bekannten Sequenzen.

3.3.2 Hybridisierung der cDNS-Microarrays

Für die ersten Genexpressionsanalysen wurde das zweite 50.000 Fragmente umfassende Chipset (B) verwendet. Auf diesem Set befanden sich die 11.520 bereits sequenzierten Klone. Dieser Umstand sollte die anschließende Bestimmung der Sequenzen von deregulierten cDNS erleichtern. Für die Herstellung der Hybridisierungsproben wurde zunächst geschädigtes und ungeschädigtes Gewebe von verschiedenen Zeitpunkten nach einer Gewebeschädigung gesammelt. Die sehr geringen Mengen an Gesamt-RNS pro Herz machte die mRNA-Isolation aus je drei Herzen pro Zeitpunkt notwendig. Diese aus je drei Geweben bestehenden sogenannten „Minipools“ wurden auch bei der Isolation von RNS aus Extremitätenstümpfen und Schwanzproben beibehalten. In Ausnahmefällen wurden nur zwei Gewebeproben vereint. Für jeden Schädigungszeitpunkt wurden vier solcher Minipools hergestellt. In Tab. 1 sind die verschiedenen Proben aufgeführt. Für die Chiphybridisierungen wurde beispielsweise RNS aus dem Minipool 1 von regenerierenden Herzen 7d postop mit dem Cy3-Farbstoff markiert und zusammen mit Cy5-markierter RNS aus Minipool 1 der scheinoperierten Herzen auf einem Chip hybridisiert. Um Unregelmäßigkeiten zwischen den Einbauraten der beiden Farbstoffe ausschließen zu können, wurden beide Proben in einem zweiten Ansatz mit dem jeweils anderen Farbstoff markiert und auf einem zweiten Chip hybridisiert (Dye-swap). So konnten je acht Messdaten pro Experiment ermittelt werden. Insgesamt wurden 56 Chips mit verschiedenen Probenkombinationen hybridisiert. Die verschiedenen Zeitpunkte sollten dazu dienen, Einblicke in den Verlauf der Regeneration auf der transkriptionalen Ebene durch die differentielle Expression von bestimmten Genen zu gewinnen. Die Verwendung weiterer Molchgewebe wie der Extremitätenregenerate und der Schwanzregenerate sollten die Unterscheidung von gemeinsam genutzten „Regenerationsprogrammen“ und rein herzspezifischen Genexpressionen ermöglichen. Der Zeitpunkt zwölf Tage nach Amputation der Extremitäten wird als sogenannte Akkumulationsphase (Maier and Miller, 1992) oder moderate early bud stage (Iten&Bryant, 1973) bezeichnet, da diese Phase vorwiegend von Dedifferenzierungen und Proliferation im Blastem gekennzeichnet ist. 23 Tage nach Amputation beginnt hingegen die Differenzierungsphase (Maier and Miller, 1992) bzw. das late bud stage (Iten&Bryant, 1973), in dieser Phase respezialisieren sich die Blastemzellen wieder, das heißt es konnten erste Anzeichen beginnender Chondrogenese und Myogenese beobachtet werden. Im Fall der Schwanzregeneration fällt der Zeitpunkt

12 Tage nach Amputation in die sogenannte Phase III (10-15 Tage) während dieser Phase wird die Regeneration axialer Strukturen sichtbar und die Chondrogenese und Myogenese beginnen langsam (Iten and Bryant, 1976). Der Zeitpunkt 23 Tage nach der Amputation fällt in die so genannte Phase IV (13-32) Tage während der die Myogenese stark zunimmt und sich die Knorpelstrukturen verlängern und weiter ausdifferenzieren. Außerdem konnten in dieser Phase Mitosen im Knochenmark detektiert werden (Iten and Bryant, 1976).

Probe	Minipool	Gesamt-RNS Menge in μg /Minipool 1-4			
Scheinoperierte Herzen	1-4	13	9	14	8
Regenerierende Herzen 7d postop	1-4	20	23	23	22
Regenerierende Herzen 14d postop	1-4	14	25	18	39
Regenerierende Herzen 21d postop	1-4	18	22	22	9
Nicht amputierte Hinterextremitäten	1-4	48	31	31	15
Regenerat 12d nach Amputation	1-4	15	12	11	16
Regenerat 23d nach Amputation	1-4	30	24	20	10
Nicht amputierte Schwanzspitzen	1-4	35	24	27	21
Regenerat 12d nach Amputation	1-4	10	8	3	8
Regenerat 23d nach Amputation	1-4	4	13	7	

Tab.10: Übersicht über die Anzahl der Hybridisierungsproben mit Angaben der jeweiligen Gesamtmengen an isolierter Gesamt-RNA

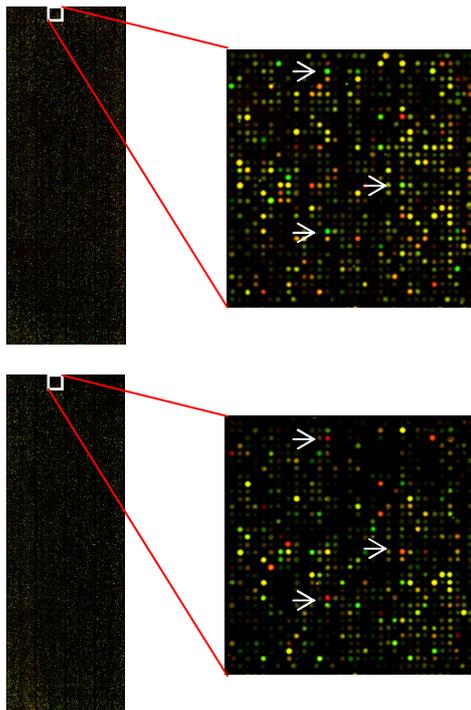


Abb.13: Beispiel für zwei komplexe Microarray Hybridisierungen mit erfolgreichem Farbstoffaustausch (Dye swap).

Links im Bild sind zwei komplette Microarrays abgebildet, die mit der gleichen Probenkombination aber mit jeweils vertauschten Farbstoffen markiert wurden. In den vergrößerten Ausschnitten weisen die weißen Pfeile auf deregulierte Spots hin, die einmal grün erscheinen und im Parallelexperiment nach Farbstoffwechsel wie zu erwarten rot leuchten. Bei gelben Spots handelt es sich um nicht deregulierte Transkripte.

3.3.2.1 Deregulation verschiedener Gene während der ersten drei Wochen der Herzregeneration

Im Folgenden wurden Transkripte ausgewählt, die mindestens 2,48-fach stärker oder schwächer exprimiert wurden als in den scheinoperierten Kontrollherzen.

Die Chiphybridisierungen mit den fluoreszenzmarkierten Herzproben ergaben eine 2,48-fache verringerte Expression von einigen Komponenten des Zytoskelettes. Dies galt vor allem für die cDNS-Sequenzen, die den Contigs 13, 19, 24, und 52 zugeordnet wurden. In Abb.14 sind Beschreibungen zu den homologen Sequenzen der einzelnen Contigs und deren bekannten biologischen Funktionen aufgeführt. Bei den Transkripten der Contigs 1, 2, 6, 10, 25 und 38 trat die verringerte Expression nur sieben Tage und 14 Tage nach der Schädigung auf, 21 Tage nach der Herzschildigung wurden die entsprechenden Transkripte bereits wieder verstärkt exprimiert. Andere schwach exprimierte Contigs wiesen Homologien zu Enzymen der Regulation des Metabolismus bzw. Komponenten von Stress- und Entzündungsreaktionen auf (vgl. Abb.15).

	CombineHerz7T	CombineHerz14T	CombineHerz21T	
Plate055_J09				Contig 13: Myosin light Chain kinase, Zytokinese, Regulation der Chemotaxis, Kinaseaktivität
Plate061_G01				
Plate063_N08				
Plate070_A16				
Plate070_D19				
Plate090_Q21				Contig 10: Amb. Mex. 5' similar to Desmin, Muskelzeldifferenzierung, Intermediärfilament
Plate091_D10				
Plate093_D09				
Plate093_E10				
Plate097_D06				Contig 2: Troponin C type1 (langsam); Aktinbindung, Muskelkontraktion
Plate099_O08				
Plate100_D12				
Plate100_I11				
Plate105_D17				
Plate110_D08				
Plate041_C22				Contig 6: Myosin heavy Chain, Polypeptide 6, Muskelentwicklung
Plate091_J06				
Plate109_F18				
Plate113_O08				
Plate011_E07				Contig 1: Human Myosin heavy chain, cardiac muscle beta isoform; Muskelentwicklung Muskelkontraktion
Plate011_M17				
Plate013_E13				
Plate014_C11				
Plate014_L04				
Plate014_P07				
Plate052_H08				Contig 24: Ventricular Alkali myosin light chain-1, Zytoskelettorganisation and Biogenese, Calciumbindung
Plate082_L13				
Plate110_C15				
Plate123_K10				
Plate006_F07				Contig 52: Telethonin; Sarkomerorganisation, Z-Scheibe
Plate017_J09				
Plate039_I01				
Plate047_K21				
Plate086_F02				Contig 19: Myosin Light chain 1 Muskelkontraktion, Mikrofilamentmotoraktivität
Plate102_F18				
Plate107_E13				
Plate110_M20				
Plate057_E10				Contig 25: Keratin 19 Typel zytoskelettal, Sarkomerorganisation
Plate059_F17				
Plate083_E12				
Plate091_E21				
Plate034_O19				Contig 38: Amb. Mex. Cardiac actin, Regulation der Herzkontraktion

Abb.14: Grafische Darstellung im regenerierenden Herzen schwach exprimierter cDNS-Sequenzen, deren Contigsequenzen Ähnlichkeiten zu Komponenten des Zytoskelettes aufweisen. Die je acht Einzelexperimente pro Regenerationszeitpunkt wurden als „Combine 7T, Combine 14T und Combine 21T“ zusammengefasst. Die linke Spalte zeigt die Plattenkoordinaten der einzelnen Sequenzen. Die grünen Balken zeigen eine verringerte Genexpression gegenüber der Expression in scheinoperierten Kontrollherzen an, die roten Balken weisen auf erhöhte Genexpressionen hin. Die rechte Spalte enthält die Contignummern, sowie eine kurze Beschreibung zu welchen Sequenzen das jeweilige Contig Homologien aufweist und deren biologischen Funktionen.

Metabolismus, Homeostase			
	CombineHerz7T	CombineHerz14T	CombineHerz21T
Plate005_C10			
Plate009_F24			
Plate011_H01			
Plate017_C14			
Plate020_I19			
Plate024_A20			
Plate024_P22			
Plate027_N16			
Plate030_J17			
Entzündung, Stressantwort			
Plate059_K20			
Plate071_B04			
Plate082_N13			
Plate085_E20			
Plate097_A14			
Plate121_C10			
Plate007_A01			
Plate064_M13			
Plate065_A17			
Plate041_H19			
Plate089_M16			
Plate095_E04			
Plate119_L05			

Contig 27: Lactate Dehydrogenase B, L-lactate Dehydrogenase-aktivität, Glykolyse

Contig 9: Amb.mex. Ähnlich der Creatine Kinase, M-Kette Energie, Homeostase

Contig 11: ähnlich wie Resistin lokalisiert in inflammatorischen Regionen; Hormonaktivität, von Adipozyten sekretiert

Contig 17: Kompl. C3 Vorläufer Komplementaktivierung

Contig 77: Thioredoxin interagierendes Protein Regulation der Zellproliferation, Antwort auf oxidativen Stress

Abb.15: Grafische Darstellung im Herzen mindestens 2,48-fach runterregulierter cDNS-Sequenzen, deren Contigsequenzen Ähnlichkeiten zu Komponenten die in metabolische bzw. homeostatische Vorgängen oder in Stressantworten und Entzündungsreaktionen involviert sind. Die je acht Einzelerperimente pro Regenerationszeitpunkt wurden als „Combine 7T, Combine 14T und Combine 21T“ zusammengefasst. Die linke Spalte zeigt die Plattenkoordinaten der einzelnen Sequenzen. Die grünen Balken zeigen eine verringerte Genexpression gegenüber der Expression in scheinoperierten Kontrollherzen an. Die rechte Spalte enthält die Contignummern, sowie eine kurze Beschreibung zu welchen Sequenzen das jeweilige Contig Homologien aufweist und deren biologischen Funktionen.

Auf der anderen Seite stieg die Expression der Transkripte einiger Zytoskelettproteine besonders ab vierzehn Tagen nach der Herzscheidung wieder stark an. Darunter befand sich zum Beispiel auch ein Contig mit Homologie zum dem Glattmuskelprotein Transgelin. Andere Transkripte deren Expression angestiegen sind zeigten Homologien zu den Komponenten der Extrazellulären Matrix (Fibronectin und Kollagen), oder zu Faktoren aus dem Bereich des Chromatinumbaus, sowie aus den Bereichen der Stressantwort und des Zellüberlebens vgl. Abb.16 .

Zytoskelettkomponenten				
	CombineHerz7T	CombineHerz14T	CombineHerz21T	
Plate011_P17				Contig 28: Salamander skelettales alpha-Aktin, Entwicklung von Skelettmuskelfasern
Plate022_N01				
Plate029_K12				
Plate065_M12				
Plate041_D14				Contig 64: Alpha-Aktin 2, Glattmuskel Aorta, Zytoskelett
Plate045_G19				
Plate052_K22				
Plate058_F18				
Plate040_I19				Contig 51: ähnlich wie Transgelin 2, Reorganisation des Aktinskeletts, Muskelentwicklung
Plate051_M18				
Plate059_B24				
Plate071_I09				
Extrazelluläre Matrix				
Plate056_K01				Contig 29: Salamander Fibronectin, Extrazelluläre Matrix, Zelladhäsion
Plate069_G19				
Plate074_M15				
Plate082_E22				
Plate097_J04				Contig 18: Kollagen Alpha-1 (III) Kette Vorläufer
Plate112_F01				
Plate114_B24				
Plate116_O24				
Plate127_M02				
Chromatinumbau				
	CombineHerz7T	CombineHerz14T	CombineHerz21T	
Plate101_B16				Contig 55: HMG-17 Chromatinentfaltung, Genaktivierung
Plate108_L19				
Plate119_B08				
Plate124_N14				
Plate014_K05				Contig 45: Histon H4
Transkriptionsfaktoren				
Plate023_K06				Contig 46: MRF2 3'end Modulator Rec. Fact. 2, Transkriptionale Repressoraktivität
Entzündung, Zellüberleben				
Plate061_E01				Contig 21: Similar to Monocyte Chemotactic Protein 3 MCP3 Makrophagenlockung
Plate090_D11				
Plate093_E13				
Plate115_E13				Contig 12: Small heat shock protein 27, Proteinbindung, antiapoptotisch, Zellbeweglichkeit
Plate115_M19				
Plate121_J14				
Plate129_M02				
Plate029_P03				Contig 14: Thymosin Beta4 Kardiomyocytenwanderung, Überleben und Reparatur
Plate041_I01				
Plate041_M15				
Plate046_F06				

Abb.16: Grafische Darstellung im regenerierenden Herzen stark exprimierter cDNS-Sequenzen, deren Contigsequenzen Ähnlichkeiten zu Komponenten des Zytoskelettes, der Extrazellulären Matrix, dem Chromatinumbau Entzündungsreaktionen, Zellüberleben oder zu Transkriptionsfaktoren aufweisen. Die je acht Einzelexperimente pro Regenerationszeitpunkt wurden als „Combine 7T, Combine 14T und Combine 21T“ zusammengefasst. Die linke Spalte zeigt die Plattenkoordinaten der einzelnen Sequenzen. Die roten Balken zeigen eine starke Expression der entsprechenden Transkripte gegenüber der Expression in scheinoperierten Kontrollherzen an. Die grünen Balken indizieren eine schwache Genexpression. Die rechte Spalte enthält die Contignummern, sowie eine kurze Beschreibung zu welchen Sequenzen das jeweilige Contig Homologien aufweist und deren biologischen Funktionen.

3.3.3 cDNS-Subtraktion

Für die präferenzielle Anreicherung von Transkripten die während der Regeneration differentiell exprimiert werden, wurde eine cDNS-Subtraktion von mRNS aus ungeschädigten und mRNS aus Herzen 14 Tage nach der Schädigung des Ventrikels durchgeführt. Die in cDNS konvertierten Transkripte wurden im Verlauf zweier Hybridisierungsschritte voneinander subtrahiert und anschließend exponentiell amplifiziert. Die auf diesem Wege angereicherten cDNS dienten im Folgenden als Grundlage für die Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die Hybridisierung der Koloniefilter.

3.3.3.1 Hybridisierung der Koloniefilter mit radioaktiv markierten subtrahierten cDNS-Sonden

Die zwei aus der cDNS-Subtraktion resultierenden Proben wurden radioaktiv markiert und als Sonden für die Hybridisierungen der Koloniefilter eingesetzt. Dabei enthielt die eine Probe cDNS von Transkripten die während der Regeneration nach 14 Tagen stark angereichert wurden und die andere entsprechend cDNS von Transkripten die im regenerierenden Herzen nicht präsent sind. Um die komplette 100.000 Klone umfassende Bibliothek berücksichtigen zu können, mussten die 7 Filtersets mit beiden Proben einzeln hybridisiert werden. Die anschließende Auswertung der Signale auf den Koloniefiltern ergab 59 positive Signale für die Hybridisierung mit der Sonde, die Transkripte enthalten sollte, welche im regenerierenden Herzen häufig vorkommen. Mit der anderen Probe konnten ca. 490 positive Signale detektiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sind bisher nur die 59 Signale aus der einen Subtraktionsrichtung weiter analysiert worden. In Abb.17 sind zwei hybridisierte Filter als Beispiel dargestellt. Zunächst wurden entsprechend der zuvor bestimmten Koordinaten der Signale auf den Filtern die Koordinaten der Klone in den 384er-Platten ermittelt. Anschließend wurden aus den Glycerolstocks der identifizierten Klone Übernachtskulturen inokuliert und die entsprechenden Plasmid-DNS isoliert. Die Plasmide wurden sowohl mit dem Restriktionsenzym *Sfi*I fragmentiert als auch sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden zunächst mit Einträgen aus den Datenbanken (BLASTn und BLASTx) verglichen und entsprechend ihrer Sequenzhomologien untereinander zusammengefasst.

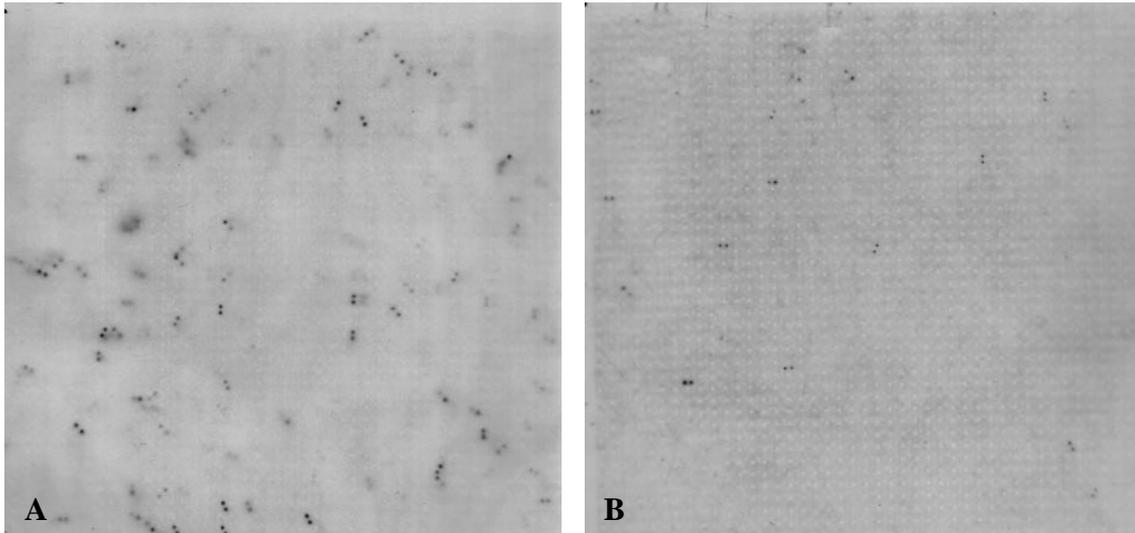


Abb.17: Beispiel von zwei Koloniefiltern, die jeweils mit zwei verschiedenen radioaktiv markierten cDNS-Sonden hybridisiert wurden **A** verwendete Sonde enthält Transkripte die im regenerierenden Herzen unterrepräsentiert sind; **B** verwendete Sonde basiert auf Transkripten die während der Regeneration angereichert wurden

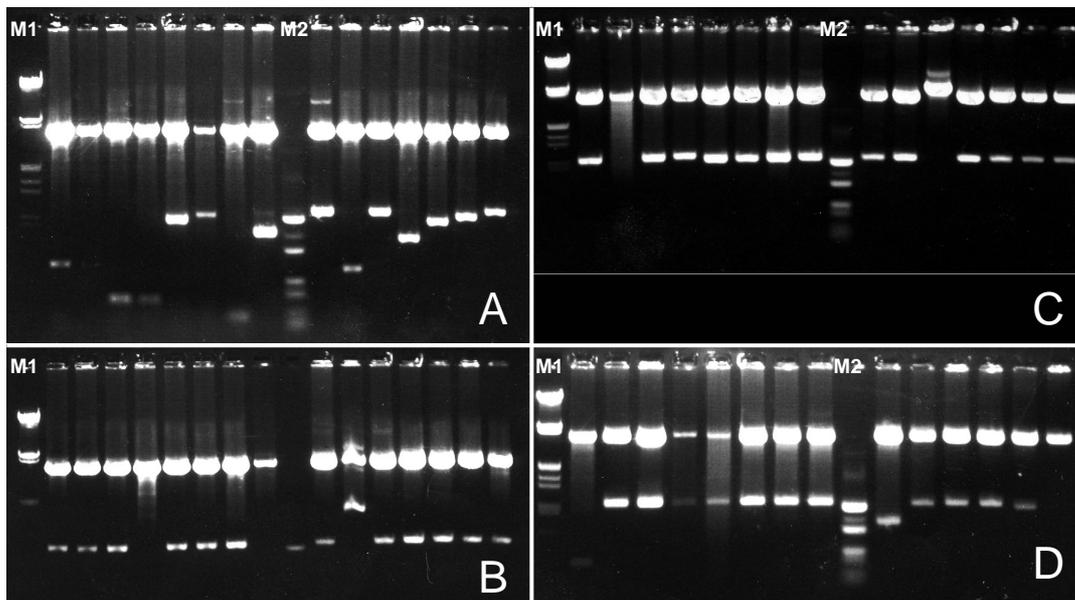


Abb.18: SfiI-Restriktionsverdau der Filterklone

Hier dargestellt sind die Klone, die aus der Hybridisierung mit der cDNS-Subtraktions-Sonde, die mit cDNS aus geschädigten Herzen angereichert wurde. **A** zeigt die verdaute Plasmid-DNS der Klone TB1-TB15; **B** zeigt die verdaute Plasmid-DNS der Klone TB16-TB30; **C** zeigt die verdaute Plasmid-DNS der Klone TB31-TB45; **D** zeigt die verdaute Plasmid-DNS der Klone TB46-TB59 M1: λ -EcoRI/HindIII DNS-Größenstandard; M2: pUC18-Sau3A DNS-Größenstandard

Klon	Fragmentgröße	Ergebnisse des Blastn
TB1	0,3 kb	<i>Macaca mulatta</i> Major Histocompatibility Complex BAC MMU065H09, complete 118-138 Tetraodon nigroviridis full-length cDNA 54-148
TB2	0,3 kb	keine Homologie
TB3	none	nur Vektor
TB4	none	nur Vektor
TB5	0,9 kb	Danio rerio troponin T2, cardiac (tnnt2), mRNA 1-29 + 460-509 Danio rerio troponin T3a, skeletal, fast, mRNA 39-140
TB7	0,15 kb	<i>N. viridescens</i> mitochondrial gene for 16S ribosomal RNA 50nt 92% bp 5-53 des Inserts 152-204 von <i>N. viridescens</i>
TB8	~ 1,1kb	<i>Bos taurus</i> NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, mRNA 85-107 + 204-226 + 273-398 85% homolog
TB10	0,35 kb	<i>Trichosurus vulpecula</i> beta-actin mRNA, complete cds 7-40 97% Homologie
TB13	~ 0,95 kb	<i>X. laevis</i> mRNA for myosin light chain 266 82%
TB19	?	keine Homologie
TB25	~ 1,5 kb	<i>Sus scrofa</i> four and a half LIM domains 1 protein, isoform C (FHL1C), 281nt /79%
TB32	0,15 kb	keine Sequenz
TB46	0,23 kb	keine Homologie
TB54	~ 0,6 kb	<i>Ambystoma mexicanum</i> Hb-b mRNA for beta globin chain 83% (37-101)
TB59	0,500 kb	<i>Xenopus laevis</i> ribonucleoprotein mRNA 197nt/ 91% 129-411
div TBs (insgesamt 44) TB14	0,5-1,1kb	Mouse Myosin regulatory light chain A, smooth muscle homolog

Tab.11: Zusammenfassung der Subtraktionsklone mit Informationen über ihre Fragmentgröße und Homologie zu anderen bekannten Sequenzen. Die blau markierten Klone sind weiter analysiert worden.

3.3.3.2 Expressionsanalyse der Filterklone mittels RT-PCR auf cDNS aus verschiedenen Geweben des Molches

Die Überprüfung der differentiellen Expression der Filterklone TB1, 2, 5, 8, 10, 13, 19, 25, 46, 54, 59 sowie der m-MRLC-Klone wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Die Auswahl geeigneter Oligonukleotide basierte auf den zuvor ermittelten Sequenzinformationen. Zuerst wurde die Spezifität der Oligonukleotide sowie deren geeigneten Anlagerungstemperatur auf der jeweiligen Plasmid-DNS getestet. Ergaben die Kontroll-PCRs ein Produkt der erwarteten Größe, konnten die Oligonukleotide auf den verschiedenen cDNS getestet werden. In Tab.12 sind die Ergebnisse zusammengefasst worden.

Klon	Expression im geschädigten Herzen im Vergleich zur Kontroll-cDNS	Magen-cDNS	Skelettmuskel
TB1	↔	nicht untersucht	nicht untersucht
TB2	↑	+	-
TB5	↔	-	schwach
TB8	↑	+	+
TB10	↑	-	-
TB13	↔	-	-
m-MRLC (TB14)	↑	+	-
TB19	↑	+	+
TB25	↔	nicht untersucht	nicht untersucht
TB46	↔	nicht untersucht	nicht untersucht
TB54	↔	nicht untersucht	nicht untersucht
TB59	↔	nicht untersucht	nicht untersucht

Tab.12: Überprüfung der differentiellen Genexpression einiger Filterklone mittels RT-PCR aus cDNS aus geschädigtem Herzen (14d postop) vs. ungeschädigtem Herzen, Magen und Skelettmuskel

↔ : kein Unterschied
amplifiziert
↑ : im geschädigten Herzen stärker expremiert
+ : PCR-Produkt
- : kein PCR-Produkt

Für die Klone TB 2,5,8,10,19 und m-MRLC konnte das Ergebnis der Filterhybridisierung mittels semiquantitativer RT-PCR reproduziert werden. Die übrigen Klone zeigten keine differentielle Genexpression. Die Oligonukleotide für die m-MRLC Klone sind für Glattmuskelzellen spezifisch, da nur mit der Magen-cDNS und nicht mit der Skelettmuskel-cDNS ein entsprechendes Produkt detektiert werden konnte.

3.4 *In situ* Hybridisierungen auf Paraffinschnitten von geschädigten und scheinoperierten Herzen

3.4.1 *In situ* Hybridisierungen mit *in situ* Proben von verschiedenen Subtraktionsklonen auf Paraffinschnitten

In situ Hybridisierungen bieten neben der Möglichkeit zur Untersuchung differentieller Genexpression zusätzlich die Möglichkeit der genaueren Lokalisation der m-RNS-Expression im untersuchten Gewebe oder Organismus. Aufgrund der verifizierten differentiellen Genexpression der Klone TB8, TB10, TB14, TB19 mittels RT-PCR, bzw. wegen der Homologie von TB25 zum Fhl1-Gen und dessen bekannter Beteiligung an der Entwicklung von Herzschädigungen (Chu et al., 2000; Gaussin et al., 2003), wurden von diesen Klonen *sense* und *antisense* RNS-Proben hergestellt. Dafür wurden die entsprechenden Fragmente zunächst mittels *Sall/XbaI*-Doppelverdau aus dem pDNRLib-Vektor herausgeschnitten und gerichtet in einen gleichermaßen vorgeschneitenen pSK bzw. pKS-Vektor kloniert. Im pSK/pKS-Vektor wurden die klonierten Fragmente von zwei verschiedenen Promotoren für RNS-Polymerasen flankiert. Diese ermöglichten somit die Herstellung von *sense* und *antisense* RNS-Proben.

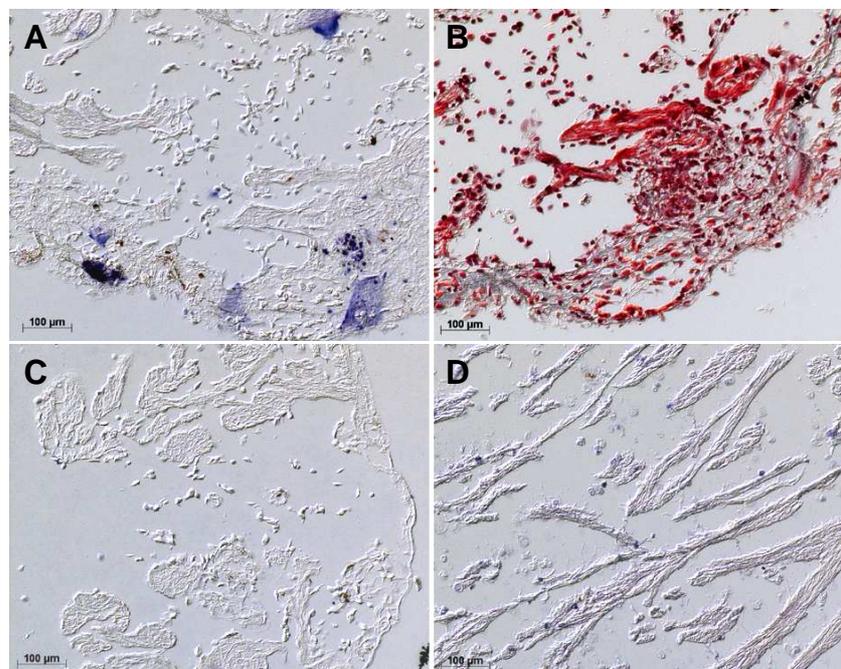


Abb.19: Expression des Subtraktionsklons TB8 im geschädigten (14d postop) und scheinoperierten Herzen A: TB8-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) B: Trichrome-gefärbter Nachbarschnitt C: TB8-s Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) D: TB8-as Probe auf scheinoperiertem Herzen

Die *in situ*-Proben bestanden aus den kompletten Inserts und nicht nur aus den zu bekannten Sequenzen homologen Bereichen. Analysiert wurden die Expressionsmuster auf 10µm dünnen, frontal geschnittenen Paraffinschnitten von Molchherzen 14 Tage nach Schädigung und scheinoperierten (Sham) Herzen.

Die *in situ* Hybridisierungen mit sense (s) und antisense (as) RNS-Proben gegen den Subtraktionsklon TB8 (mit einer Homologie zur NADH-Dehydrogenase) zeigten wie bei der RT-PCR auch auf Paraffinschnitten eine differentielle Expression. Im Vergleich mit einem trichromgefärbten Nachbarschnitt vgl. Abb.19 (B) wurde deutlich, dass die Expression innerhalb eines geschädigten Areals auftrat vgl. Abb.19 (A). Die sense Probe, die als Kontrolle diente, zeigte keine Färbung Abb.18 (C). Im scheinoperierten Herzen fand man ebenfalls keine Expression Abb.19 (D).

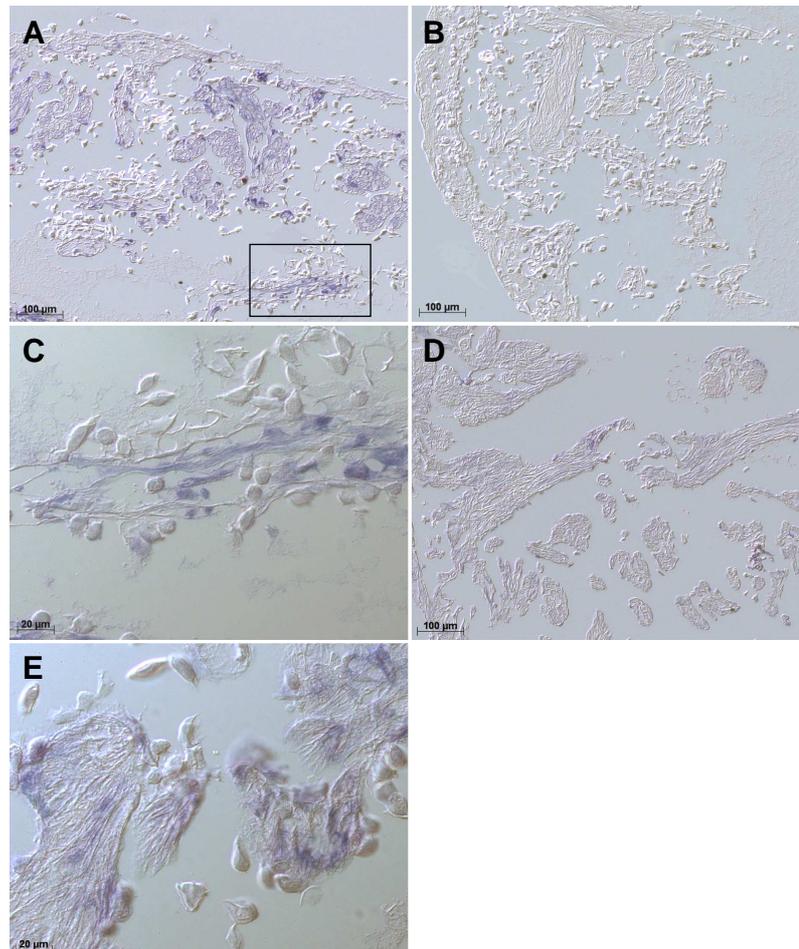


Abb.20: Expression des Subtraktionsklons TB10 im geschädigten (14d postop) und scheinoperierten Herzen **A:** TB10-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **B:** TB10-s Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **C:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild A –TB10-Expression in einem geschädigtem Areal **D:** TB10-as Probe auf scheinoperiertem Herzen **E:** Vergrößerte Aufnahme der TB10-Expression in ungeschädigtem Bereich 14d postop

Die *in situ* Hybridisierungen zur Expressionsanalyse des Subtraktionsklones TB10 (Mit einer Homologie zu β -Aktin) zeigten wie im Falle von TB8 nur positive Färbungen auf den Paraffinschnitten von geschädigten Molcherzen Abb.20 (A, C, E). Dabei traten Signale sowohl innerhalb von scheinbar intakten Trabekeln (E) als auch innerhalb geschädigter/regenerierender Areale (C) auf. Die Negativkontrolle (sense Probe) fiel auch hier positiv aus, d.h. es waren keine Signale detektierbar Abb.20 (B).

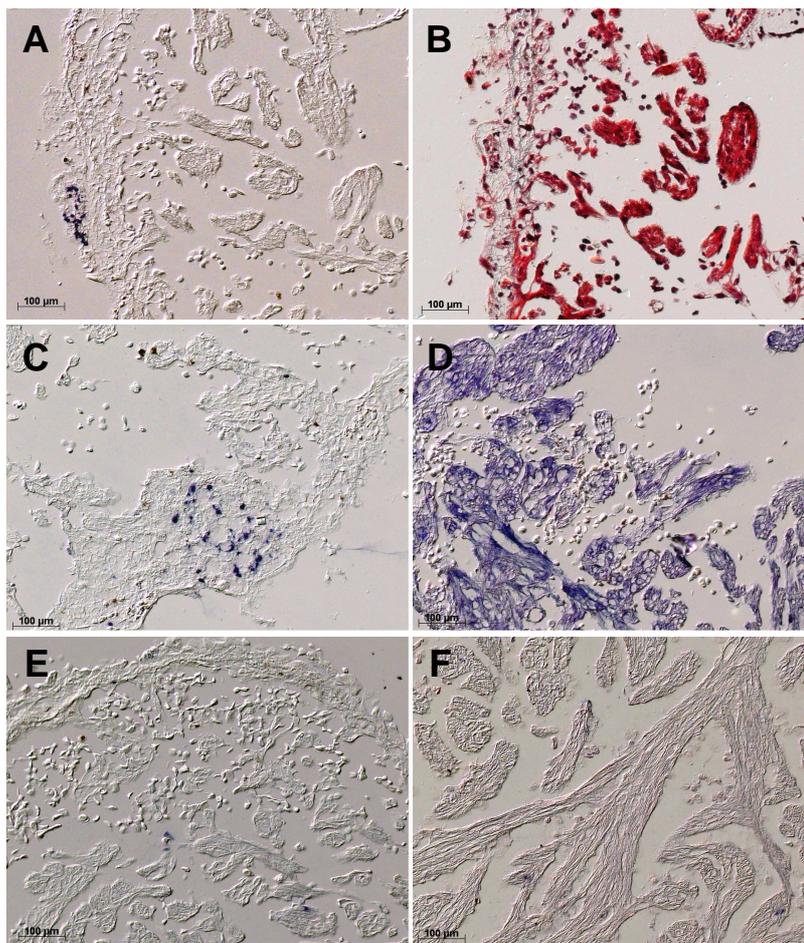


Abb.21: Expression des Subtraktionsklons TB14 im geschädigten (14d postop) und scheinoperierten Herzen **A:** TB14-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **B:** Trichrome-gefärbter Nachbarschnitt **C:** TB14-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **D:** TB14-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **E:** TB14-s Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **F:** TB14-as Probe auf scheinoperiertem Herzen.

Die Expression des Subtraktionsklons TB14 (mit einer Homologie zur sm-MRLC) auf Paraffinschnitten von geschädigten Herzen trat sowohl in Form von distinkten Signalen in geschädigten Regionen Abb.21 (A, C) als auch in Form von einer großflächigen, myokardialen Expression (D) auf. Die Negativkontrolle mit der sense Probe fiel positiv

Abb.21 (E) aus und im scheinoperierten Herzen konnten keine Expression von TB14 nachgewiesen werden (F).

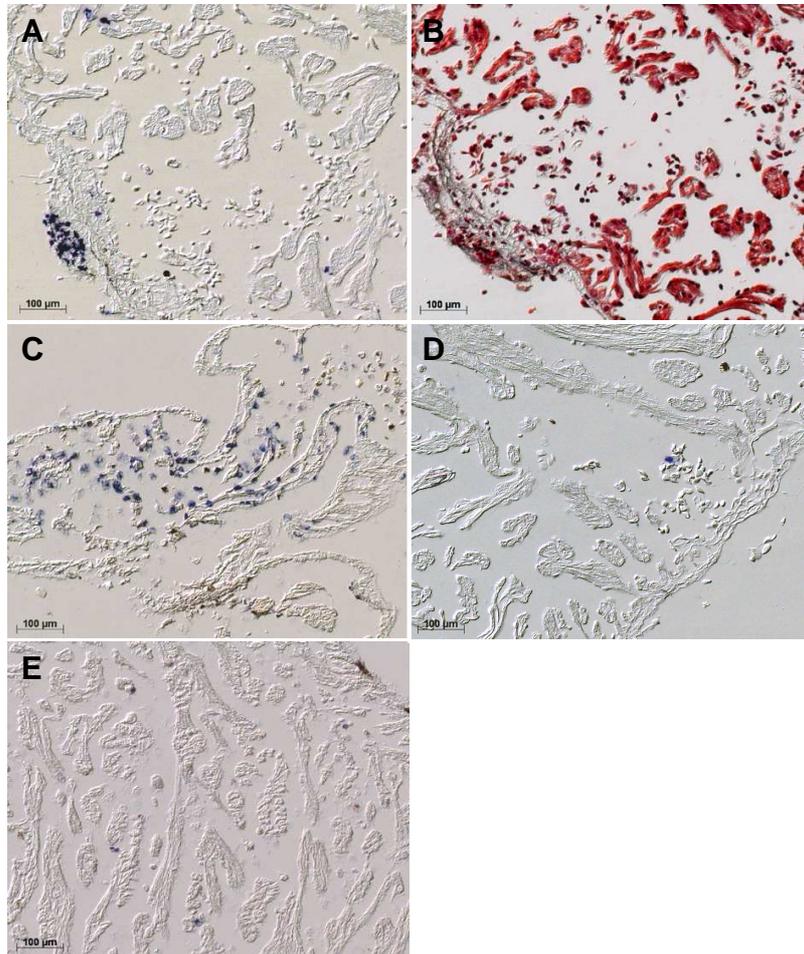


Abb.22: Expression des Subtraktionsklons TB19 im geschädigten (14d postop) und scheinoperierten Herzen **A:** TB19-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **B:** Trichrome-gefärbter Nachbarschnitt **C:** TB19-Expression im Atrium eines scheinoperierten Herzens (14d postop) **D:** TB19-s Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **E:** TB19-as Probe auf scheinoperiertem Herzen

Die Expression des Subtraktionsklons TB19 (ohne Homologie) verhielt sich im geschädigten Herzen wie die von TB8 und TB10, also stark begrenzt auf geschädigte Regionen s. Abb.22 (A). Allerdings lies sich für TB19 auch eine punktförmige Expression im Atrium Abb.22 (C) jedoch nicht im Ventrikel (E) des scheinoperierten Herzens nachweisen. Die Negativkontrolle fiel ebenfalls positiv aus.

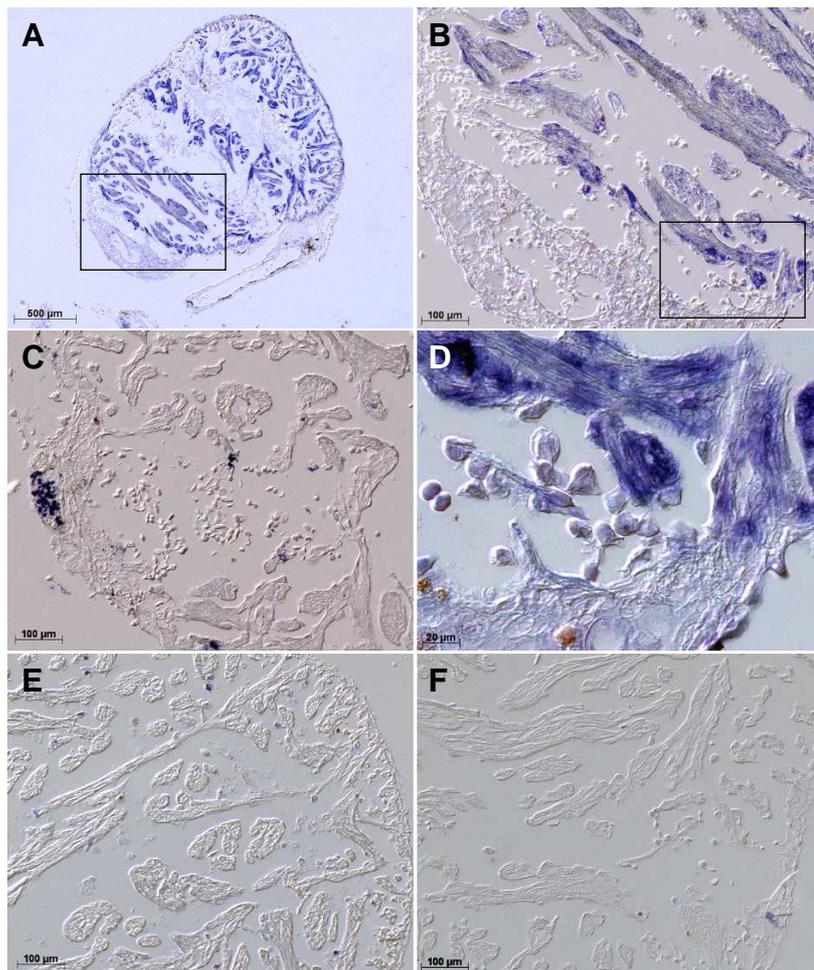


Abb.23: Expression des Subtraktionsklons TB25 im geschädigten (14d postop) und scheinoperierten Herzen A: TB25-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop)-Übersicht über die Expression im kompletten Ventrikel B: Vergrößerter Ausschnitt von Bild A C: TB25-as Probe auf einem anderen geschädigten Herzen (14d postop) D: Vergrößerter Ausschnitt von Bild B E: TB25-as Probe auf scheinoperiertem Herzen F: TB25-s Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop)

Die Expression des Subtraktionsklons TB25 (mit Homologie zum Fhl-1) zeigte ein ähnliches Bild wie die des Klons TB14. Es waren entweder nur distinkte Areale wie in Abb.23 (C) gefärbt oder großflächige Bereiche im ungeschädigten oder regenerierenden Myokard (siehe Abb.23 (A, B, D)). Im scheinoperierten Herzen und auf der Negativkontrolle war keine Färbung detektierbar.

3.4.2 Untersuchung der Expression ausgewählter Gene im geschädigten Molchherzen mittels *in situ* Hybridisierung

Die lokale Genexpression von den Molchhomologen zu Thymosin β 4, Zytokeratin 18 und α -Glattmuskel-Aktin wurde zum einen basierend auf den Ergebnissen der Chiphybridisierungen (verstärkte Expression im geschädigten Herzen), und zum anderen aufgrund ihrer bereits beschriebenen Relevanz innerhalb von regenerativen Prozessen, untersucht.

Thymosin β 4 ist ein Peptid, das an das monomere G-Aktin bindet und dadurch dessen Polymerisation zu Mikrofilamenten verhindert. Thymosin β 4 wird in die Wundflüssigkeit sekretiert. Es unterstützt die kardiale Zellmigration, das Überleben und die Reparatur (Bock-Marquette et al., 2004). Außerdem wird Thymosin β 4 auch während der Herzregeneration im Zebrafisch im Bereich der Wunde und im umgebenden kompakten Myokard exprimiert (Lien et al., 2006).

Keratine sind im herkömmlichen Sinne Marker für epitheliale Differenzierung. In niedrigeren Organismen findet man diese aber auch in nicht epithelialen Zellen, vorwiegend in mesenchymalen Vorläuferzellen während der Regeneration von Organstrukturen. Die Expression von Zytokeratin 18 konnte bereits nach drei bis fünf Tagen im Stumpfblastem des Molches nachgewiesen werden. Experimente mit *antisense* Oligonukleotiden gegen Zytokeratin 18 in kultivierten Blastemzellen deuteten darauf hin, dass Zytokeratin 18 möglicherweise dem Erhalt des undifferenzierten, proliferationsaktiven Status der mesenchymalen Vorläuferzellen dient (Corcoran and Ferretti, 1997).

α -Glattmuskelaktin wurde als ein Vertreter der Glattmuskel-Gene, deren starke Präsenz sowohl innerhalb der aus der cDNS-Subtraktion hervorgegangenen Klone, als auch bei der Chiphybridisierung auffällig war, gewählt.

Basierend auf den Blast-Ergebnissen der sequenzierten Klone eines Teils der cDNS-Bibliothek, konnten Oligonukleotide mit großer Homologie zu den ausgewählten cDNS-Sequenzen abgeleitet werden, die zur PCR-Amplifikation genspezifischer Fragmente aus cDNS von geschädigten Herzen 14 Tage nach Schädigung verwendet wurden. Die Fragmente wurden in einen T-Vektor kloniert und mittels *in vitro* Transkription *sense* und *antisense* Proben hergestellt. Die Expression wurde auf 10 μ m dünnen, frontal geschnittenen Paraffinschnitten von Herzen 14 Tage nach Schädigung im Vergleich mit Schnitten von scheinoperierten Herzen untersucht.

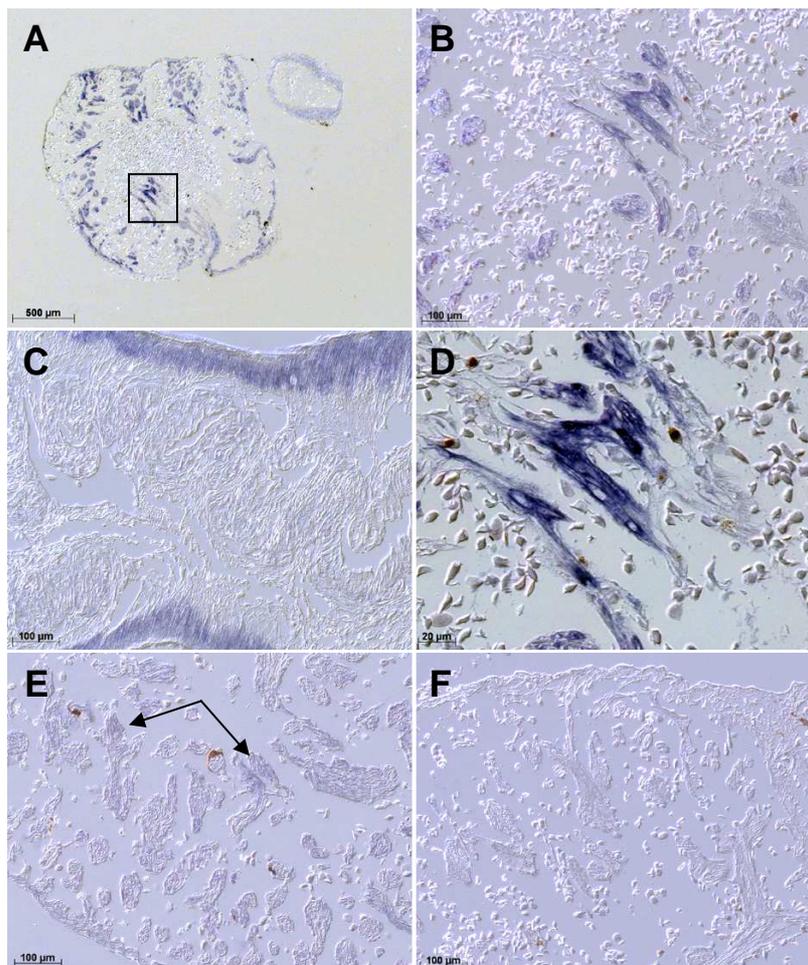


Abb.24: *In situ* Hybrisisierung mit sense und antisense Proben gegen α -Glattmuskelaktin auf Paraffinschnitten von geschädigten Herzen (14d postop), von scheinoperierten Herzen sowie und Darmgewebe **A:** α -Glattmuskelaktin-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) Gesamtübersicht **B:** Vergrößerter Ausschnitt aus A **C:** α -Glattmuskelaktin -as Probe auf einem Darmschnitt **D:** Vergrößerter Ausschnitt aus B **E:** α -Glattmuskelaktin -as Probe auf scheinoperiertem Herzen; Pfeile weisen auf schwache Expressionen hin **F:** α -Glattmuskelaktin-sense Probe geschädigtem Herzen (14d postop)

In situ Hybridisierungen mit antisense und sense Proben gegen α -Glattmuskelaktin zeigten im Bereich der Trabekel teilweise sehr starke Expressionen (vgl. Abb.24 (A, B, D)). Auch auf der Positivkontrolle, einem Darmschnitt (s. Abb.24 (C)) konnten Signale detektiert werden. Im Myokard von scheinoperierten Herzen konnte eine sehr schwache Expression beobachtet werden (s. Abb.24 (E)). Die sense Probe diente wiederum als Negativkontrolle und erzeugte keine Signale (vgl. Abb.24 (F)).

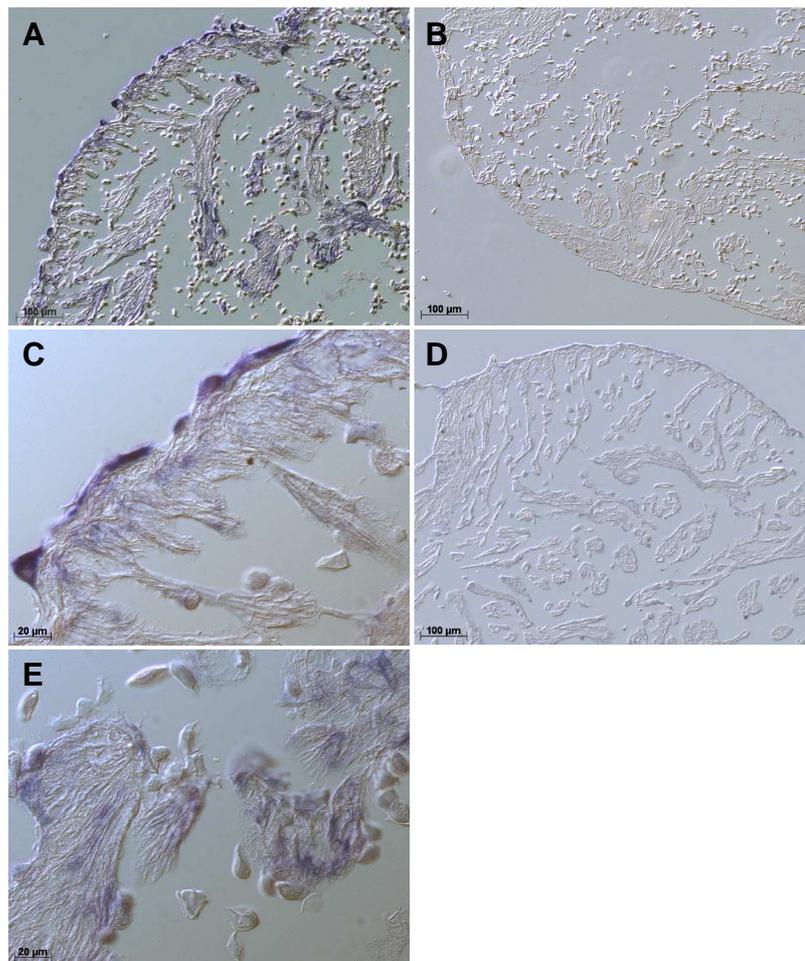


Abb.25: *In situ* Hybridisierung mit sense und antisense Proben gegen Zytokeratin 18 auf Paraffinschnitten von geschädigten Herzen (14d postop), von scheinoperierten Herzen sowie und Darmgewebe **A:** Zytokeratin18-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **B:** Zytokeratin18-sense Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **C:** vergrößerter Ausschnitt aus A zeigt positive Signale im Epikard **D:** α -Glattmuskelaktin -as Probe auf scheinoperiertem Herzen **E:** vergrößerter Ausschnitt aus A zeigt positive Signale in Trabekeln

Zytokeratin 18-mRNS konnte nur im regenerierenden Herzen detektiert werden. Positive Signale traten besonders stark im Epikard (s. Abb.25 (A, C)), aber auch innerhalb einiger Trabekel (vgl. Abb.25 (B)) auf. Im scheinoperierten Herzen konnten dagegen keine Zytokeratin 18-Transkripte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 24 (D)). Die Negativkontrolle (s. Abb.25 (B)) blieb ungefärbt.

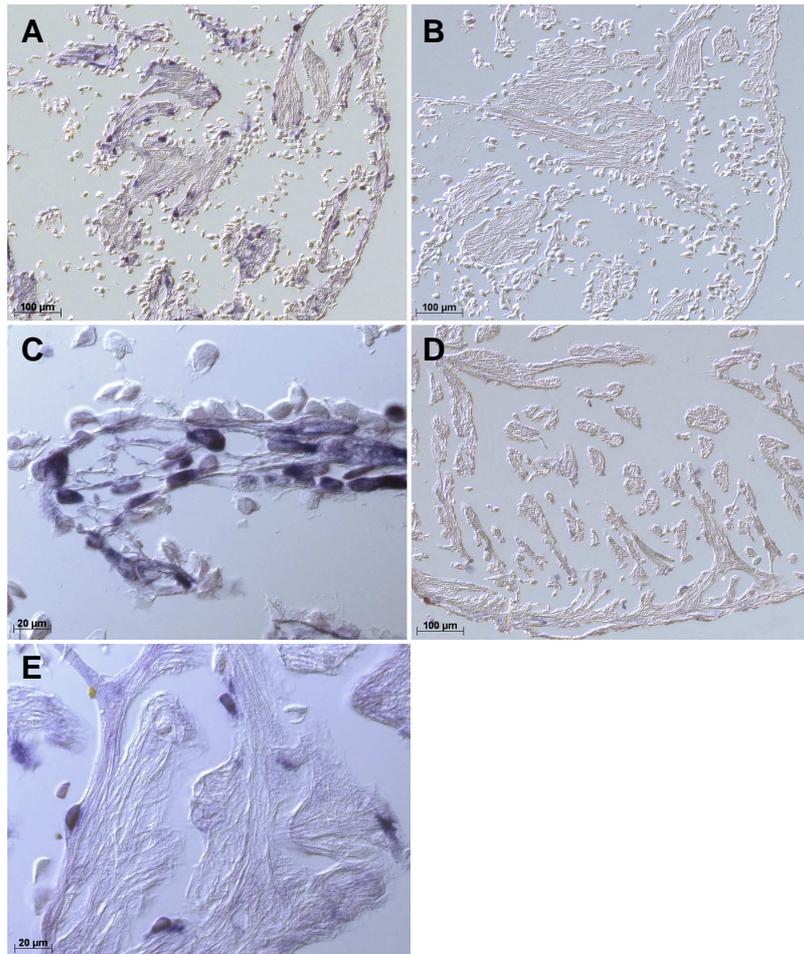


Abb.26: *In situ* Hybrisierung mit sense und antisense Proben gegen Thymosin β 4 auf Paraffinschnitten von geschädigten Herzen (14d postop), von scheinoperierten Herzen sowie und Darmgewebe **A:** Thymosin β 4-as Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **B:** Thymosin β 4-sense Probe auf geschädigtem Herzen (14d postop) **C:** Vergrößerter Ausschnitt aus A zeigt positive Signale in geschädigten Bereichen **D:** Thymosin β 4-as Probe auf scheinoperiertem Herzen **E:** Vergrößerter Ausschnitt aus A zeigt positive Signale in Zellen die intakte Trabekel säumen.

Thymosin β 4-Transkripte konnten vorwiegend in einzelnen Zellen die direkt mit dem Trabekel assoziiert zu sein schienen, nachgewiesen werden (s. Abb.26 (A, E)). Die Thymosin β 4-positiven Zellen säumten nicht nur intakte Trabekel sondern waren auch in geschädigten bzw. regenerierenden Regionen (vgl. Abb.26 (C)) zu finden. Auch hier wiesen die Negativkontrolle und der Schnitt vom scheinoperierten Herzen keine positiven Signale auf.

3.5 Immunfluoreszenzfärbungen auf Gefrierschnitten

3.5.1 Reduktion der Expression von Sarkomerproteinen während der Herzregeneration im Molch

Für alle im Folgenden dargestellten Immunfluoreszenzfärbungen wurden, wenn nicht anders angegeben 6 μm dicke, transversale Gefrierschnitte verwendet.

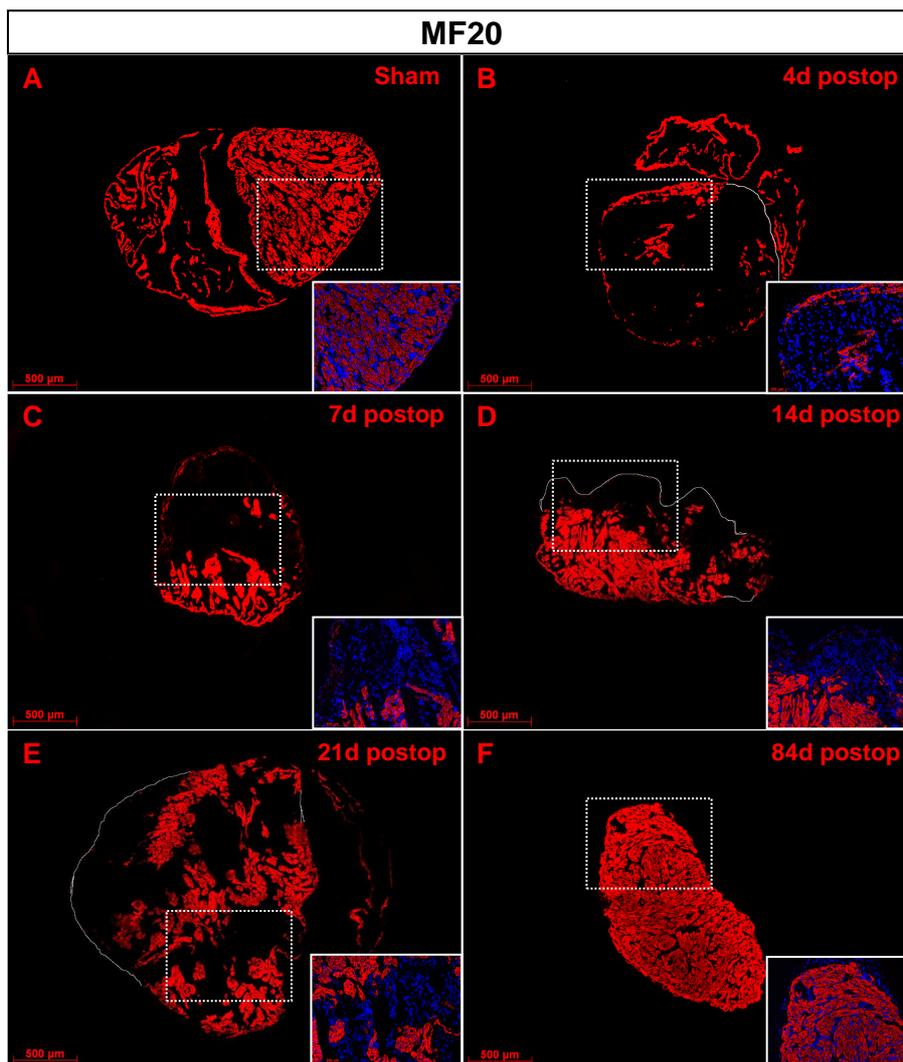


Abb.27: Transiente Reduktion der MyHC (MF20)-Expression nach mechanischer Schädigung des Ventrikels. Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen MyHC (rot), Dapi-Kernfärbung (blau) auf scheinoperierten Herzen (A), vier (B), sieben (C), 14 (D) und 21Tage (E) nach Herzschädigung. Die gestrichelten Rechtecke markieren die Region, aus der der jeweilige vergrößerte Ausschnitt stammt (weiße Rechtecke)

Die Immunfluoreszenzfärbungen unter Verwendung von Antikörpern gegen Sarkomerproteine wie Myosin-Schwere-Kette (MF20), α -Aktinin (detektiert Stressfasern und Z-Scheiben) und Myomesin (detektiert M-Banden) zeigten deutlich, dass kurz nach

der mechanischen Ventrikelschädigung die Expression von Sarkomerproteinen in geschädigten Bereichen sehr stark abnahm. Im Verlauf der ersten drei Wochen nach der Schädigung nahm die Expression allmählich wieder zu und die Areale ohne Reexpression von Sarkomerproteinen wurden deutlich kleiner. Nach 84 Tagen schien die Ventrikelstruktur in Bezug auf die Expression der Sarkomerproteine vollständig wiederhergestellt. In Abbildung 27 ist die Expression von MyHC zu den Zeitpunkten 4d, 7d, 14d, 21d, und 84d nach Herzschädigung im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle (Sham) dargestellt. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen, dass es sich bei den MyHC-negativen Bereichen nicht um Artefakte, sondern um intaktes von Zellen besiedeltes Gewebe handelt, in dem vorübergehend kein MyHC mehr exprimiert wurde.

Abbildung 28 zeigt die Expression von Myomesin (A, C) und α -Aktinin vier und 21 Tage nach Herzschädigung. Auch hier spiegeln sich die für die Expression von MyHC gemachten Beobachtungen wieder. Die Abb.28 (E, F) zeigen die für die Antikörper spezifischen quergestreiften Färbungen der M-Banden (E) und der Z-Scheiben (F) deutlich.

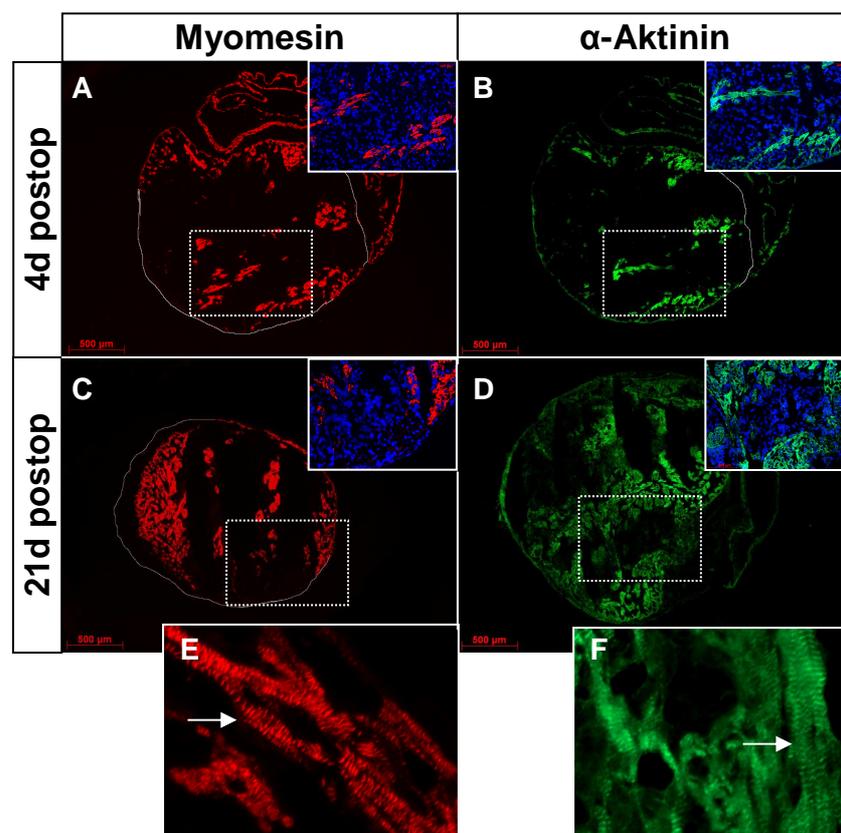


Abb.28: Transiente Reduktion der Expression von Myomesin und α -Aktinin nach mechanischer Schädigung des Ventrikels. Immunfluoreszenzen mit Antikörpern gegen Myomesin (rot) (A, C), α -Aktinin (grün) (B, D) und Dapi- Kernfärbung (blau) vier Tage bzw. 21 Tage nach Herzschädigung. Die 40-fachen Vergrößerungen zeigen die spezifische Anfärbung der M-Banden (E) durch Myomesin und der Z-Scheiben (F) durch α -Aktinin.

3.5.2 Die Neubildung des Myokards nach mechanischer Schädigung des Ventrikels wird von Extrazellulären Matrix-Proteinen wie Fibronektin und KollagenVI unterstützt

Im scheinoperierten ungeschädigten Herzen setzt sich die Myozyten umgebende Extrazelluläre Matrix hauptsächlich aus KollagenVI-Proteinen und zu einem geringeren Anteil aus Fibronektin zusammen (vgl. Abb.29 (A); Abb.30 (A)). Im Verlauf der Regeneration bildeten sich jedoch schlauchförmige, netzartige Strukturen, bestehend aus Fibronektin und KollagenVI, aus. Innerhalb dieser Strukturen nahm die Expression von muskelspezifischen Zytoskelettproteinen wie Myosin-Schwere-Kette und F-Aktin im Verlauf der Regeneration wieder zu. Die Zu- bzw. Abnahme der Fibronektinexpression spiegelt die Umgestaltung des geschädigten Myokards wieder. Allerdings konnten auch 84 Tage nach der Schädigung noch kleine Fibronektinrückstände in kleinen Regionen im ansonsten normal erscheinenden Myokard detektiert werden (Abb.29 (B)).

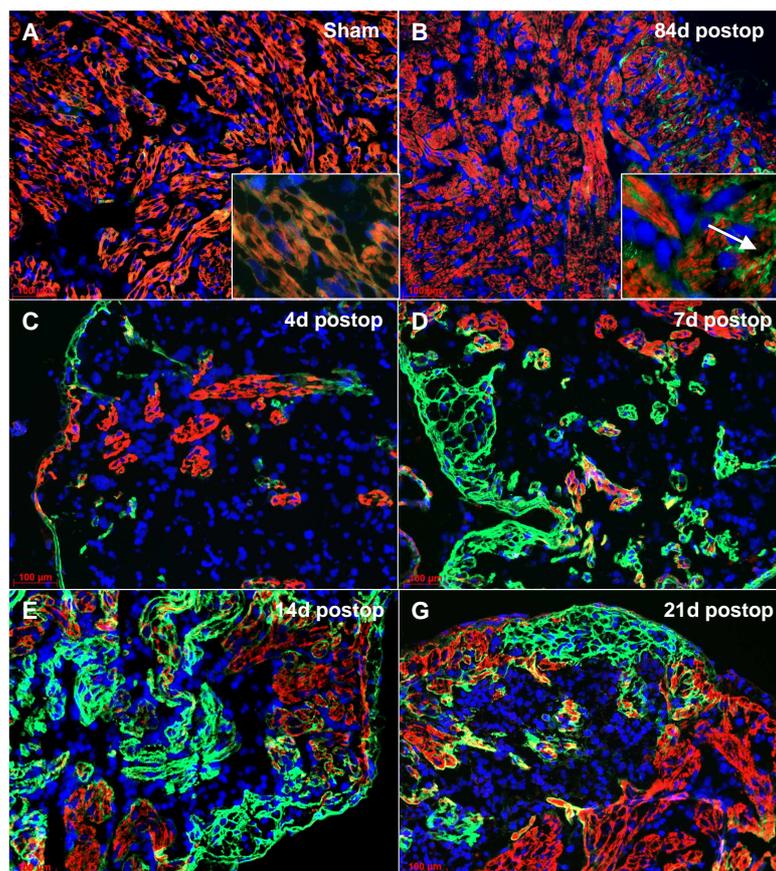


Abb.29: Die Zu-bzw. Abnahme der Expression von Fibronektin kennzeichnet den Verlauf der Regeneration Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Fibronektin (grün) sowie Phalloidin färbung von F-Aktinen (rot) und Dapi-Kernfärbung (blau) im scheinoperierten Herzen (A), 84d (B), 4d (C), 7d (D), 14d (E) und 21d (G). Der weiße Pfeil im vergrößerten Ausschnitt von (B) weist auf Fibronektinrückstände hin.

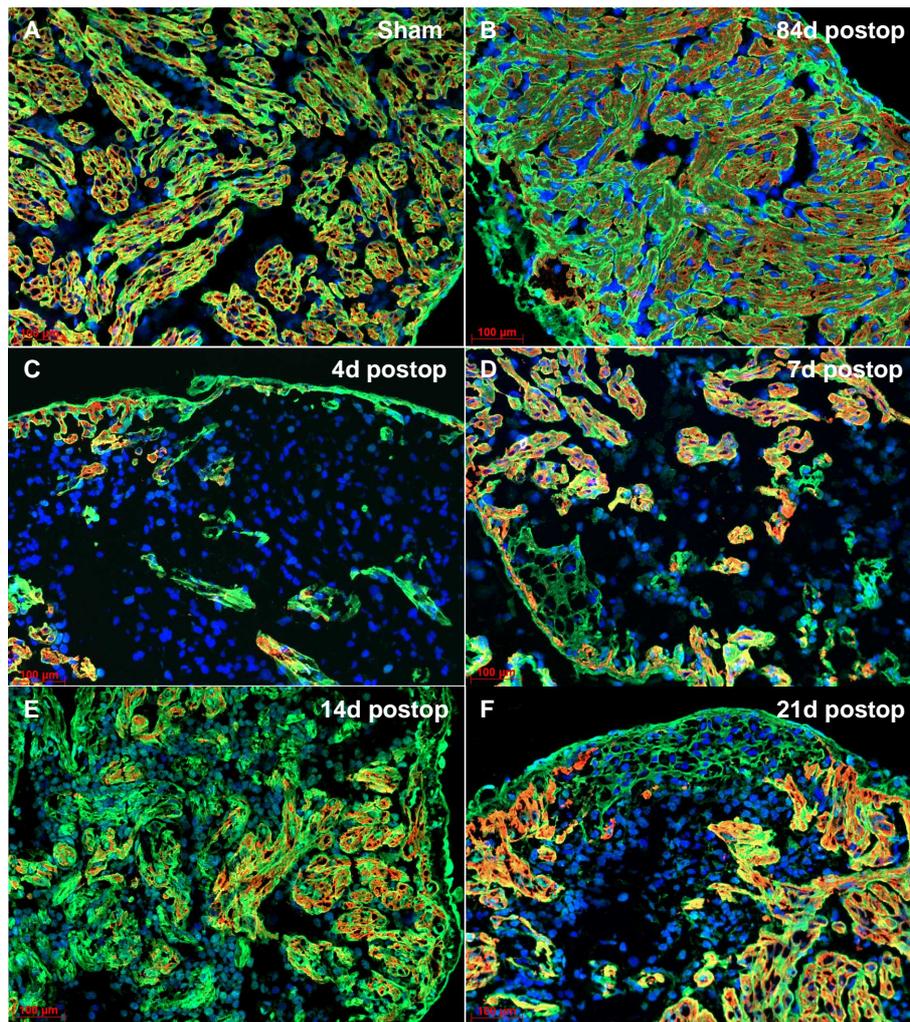


Abb.30: Veränderungen der KollagenVI-Expression im Verlauf der Regeneration des Herzens
 Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörpern gegen KollagenVI (grün) sowie MyHC (rot) und Dapi-Kernfärbung (blau) im scheinoperierten Herzen (A), 84d (B), 4d (C), 7d (D), 14d (E) und 21d (F).

Die Expressionen von Fibronectin und F-Aktin überschneiden sich kaum. In Abb.31 (A) kann man die Ausbildung von netzartigen Strukturen sieben Tage nach Schädigung gut erkennen. Regenerierende Trabekel die bereits wieder F-Aktin positiv waren, exprimierten nur noch in Randbereichen Fibronectin (s. Abb.31 (B, D, F)).

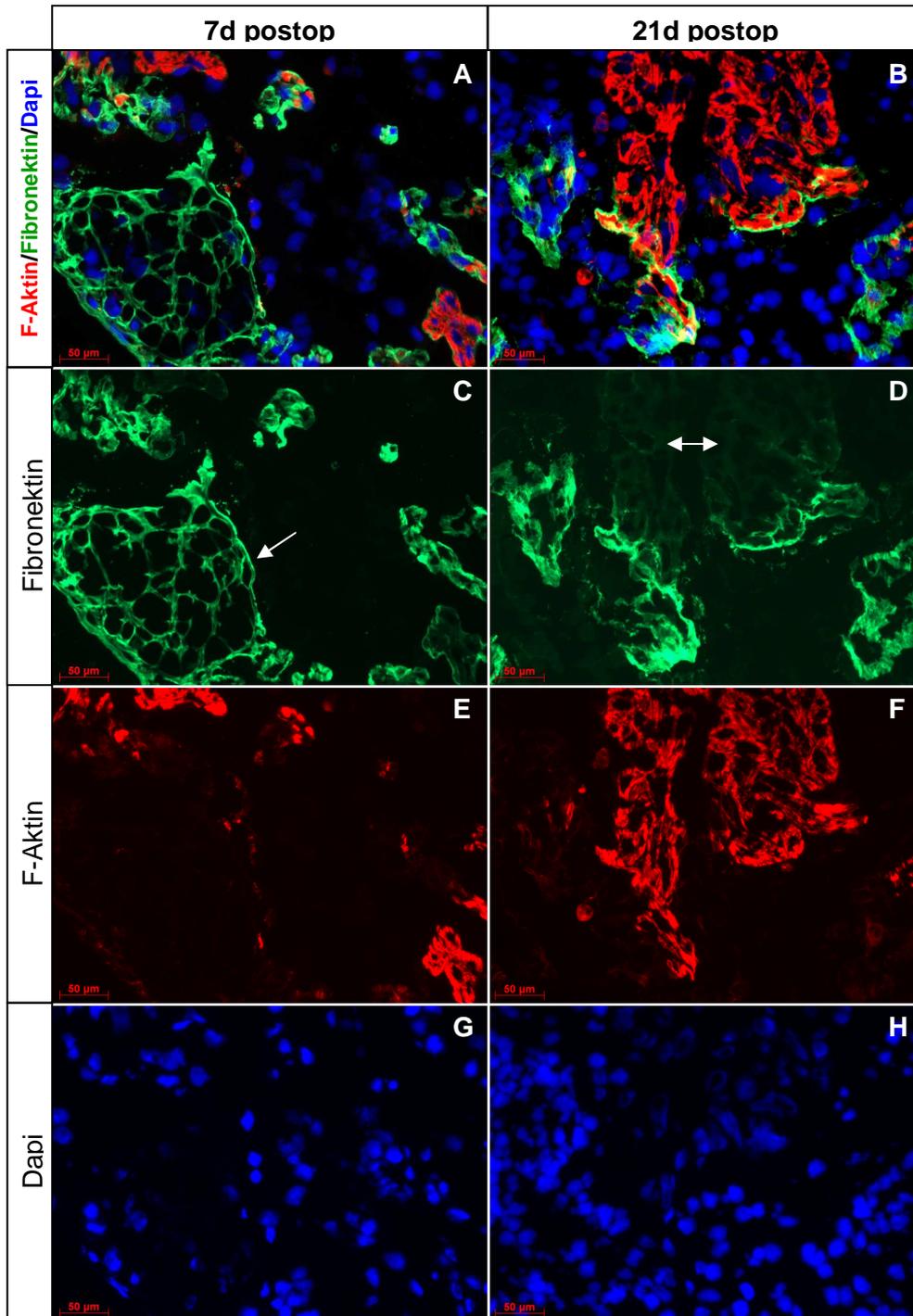


Abb.31: Ausprägung der Expression von Fibronektin und F-Aktin 7d und 14d nach der Herzschädigung Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen Fibronektin (grün) sowie Phalloidin färbung von F-Aktinen (rot) und Dapi-Kernfärbung (blau). Die linke Spalte zeigt die Färbungen 7d, die rechte Spalte 21d nach Herzschädigung. Überlagerungsbilder (A, B) 21d. Einzelbilder der Fibronektinfärbungen (grün) (C, D), Einzelbilder der F-Aktinfärbung (E, F) und der Dapi-Kernfärbung (G, H).

3.5.3 Zunahme der Expression von glattmuskelspezifischen Proteinen und von Thymosin β 4 im Verlauf der Herzregeneration

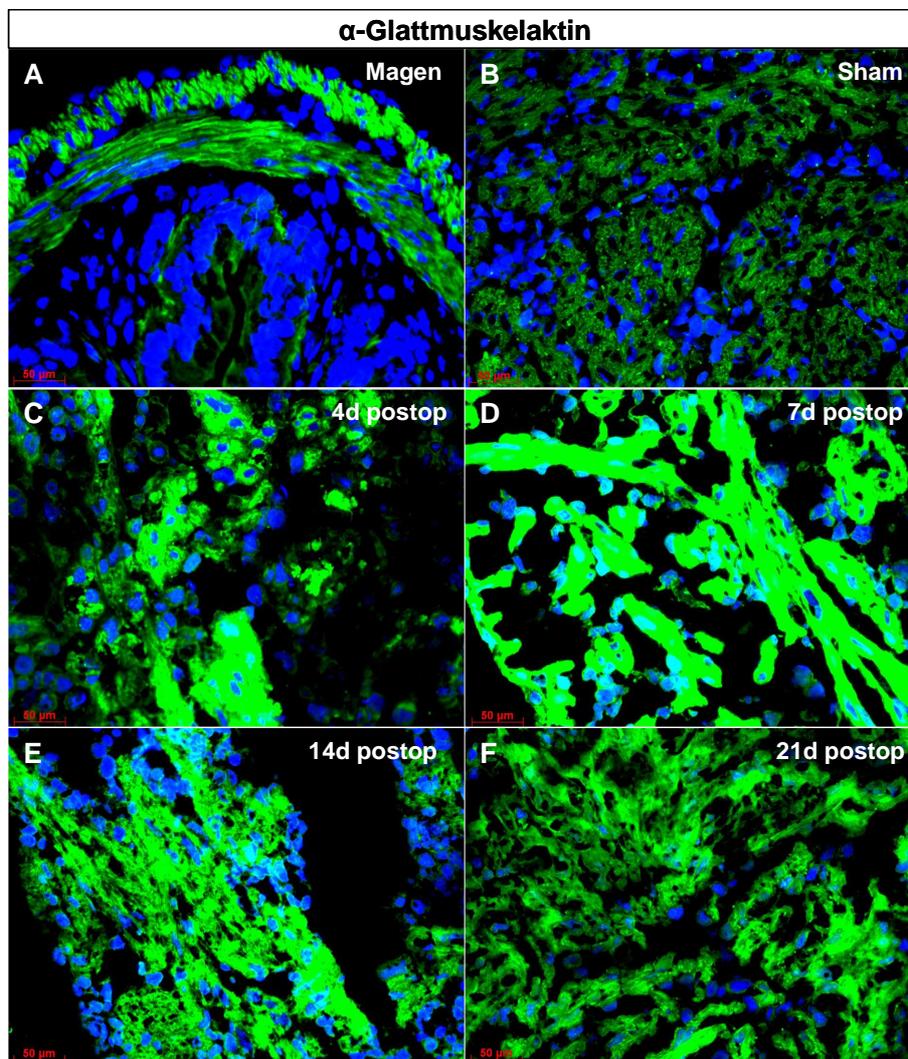


Abb.32: Zunahme der α -Glattmuskelaktinproteinexpression in den ersten drei Wochen der Herzregeneration Immunfluoreszenzfärbung für α -Glattmuskelaktin (grün), Dapi- Kernfärbung (blau) im Magen (A) scheinoperierten Herzen (B), vier (C), sieben (D), 14 (E) bzw. 21 Tage nach Schädigung des Herzens (F).

Immunfluoreszenzfärbungen mit einem Antikörper gegen α -Glattmuskelaktin zeigten auf der Positivkontrolle (vgl. Abb.32 (A)) die gewünschte Spezifität für glatte Muskulatur. Die Färbungen auf geschädigten Herzen ergaben eine starke Zunahme, der im scheinoperierten Herzen sehr schwachen Proteinexpression (B) von α -Glattmuskelaktin. Bereits vier Tage nach der Schädigung des Ventrikels konnten Areale die für α -Glattmuskelaktin stark positiv sind detektiert werden (C). Die Expression dehnte sich innerhalb der ersten 7 Tage weiter aus (D) und blieb auch zwei Wochen nach der Herzschiidigung noch bestehen (E). Nach 21 Tagen nahm die Expression allmählich wieder ab. Sie blieb jedoch noch stärker als im ungeschädigten Herzen. Ein vergleichbares

Muster zeigten auch die Immunfluoreszenzfärbungen mit einem anderen glattmuskelspezifischen Antikörper, dem Caldesmon, in Abb.33.

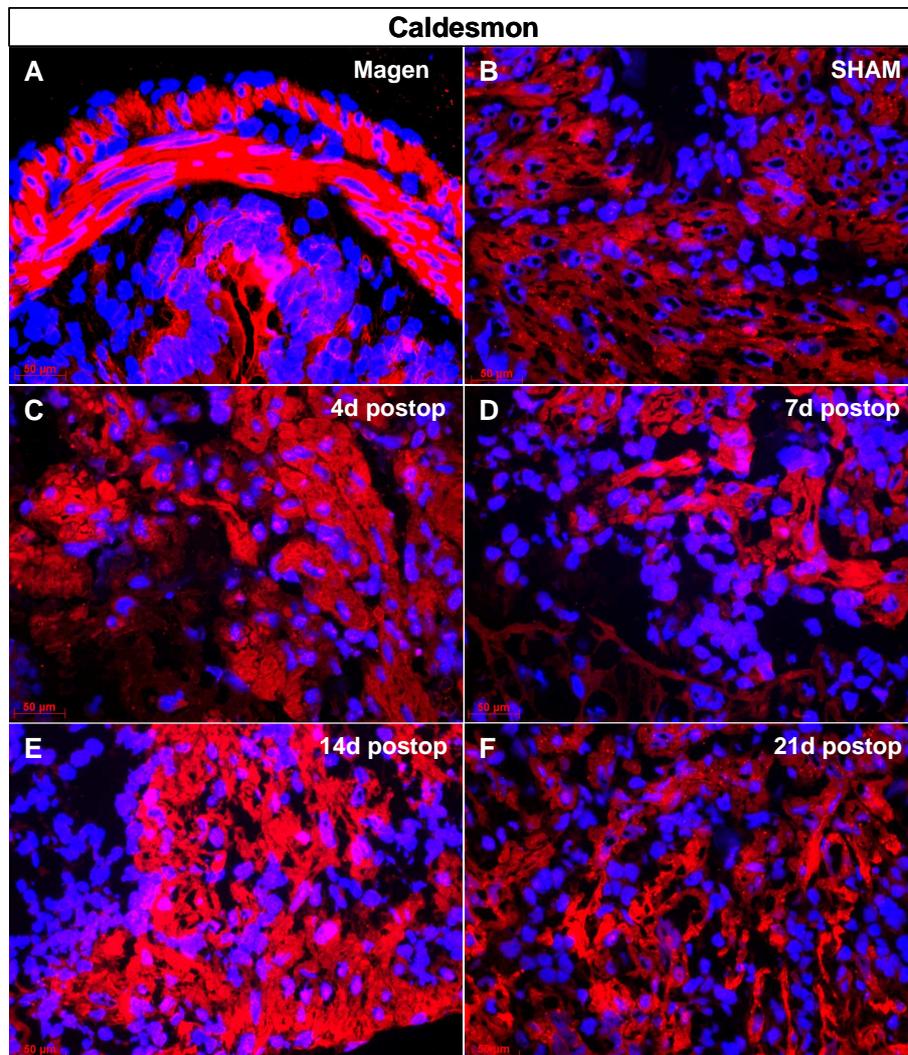


Abb.33: Zunahme der Caldesmonproteinexpression in den ersten drei Wochen der Herzregeneration Immunfluoreszenzfärbung für Caldesmon (rot), Dapi- Kernfärbung(blau) im Magen (A) scheinoperierten Herzen (B), vier (C), sieben (D), 14 (E) bzw. 21 Tage nach Schädigung des Herzens (F).

Doppelfärbungen mit anti- α -Glattmuskelaktin und anti-Caldesmon Antikörpern ergaben die erwartete Koexpression von Caldesmon und α -Glattmuskelaktin (vgl. Abb.34 (B)). Doppelfärbung mit α -Glattmuskelaktin und MyHC resultierten häufig in doppelt positiven Arealen (Abb.34 B; E; H). Dennoch konnten auch Bereiche detektiert werden die in erster Linie für α -Glattmuskelaktin positiv waren (Abb.34, A, D, G).

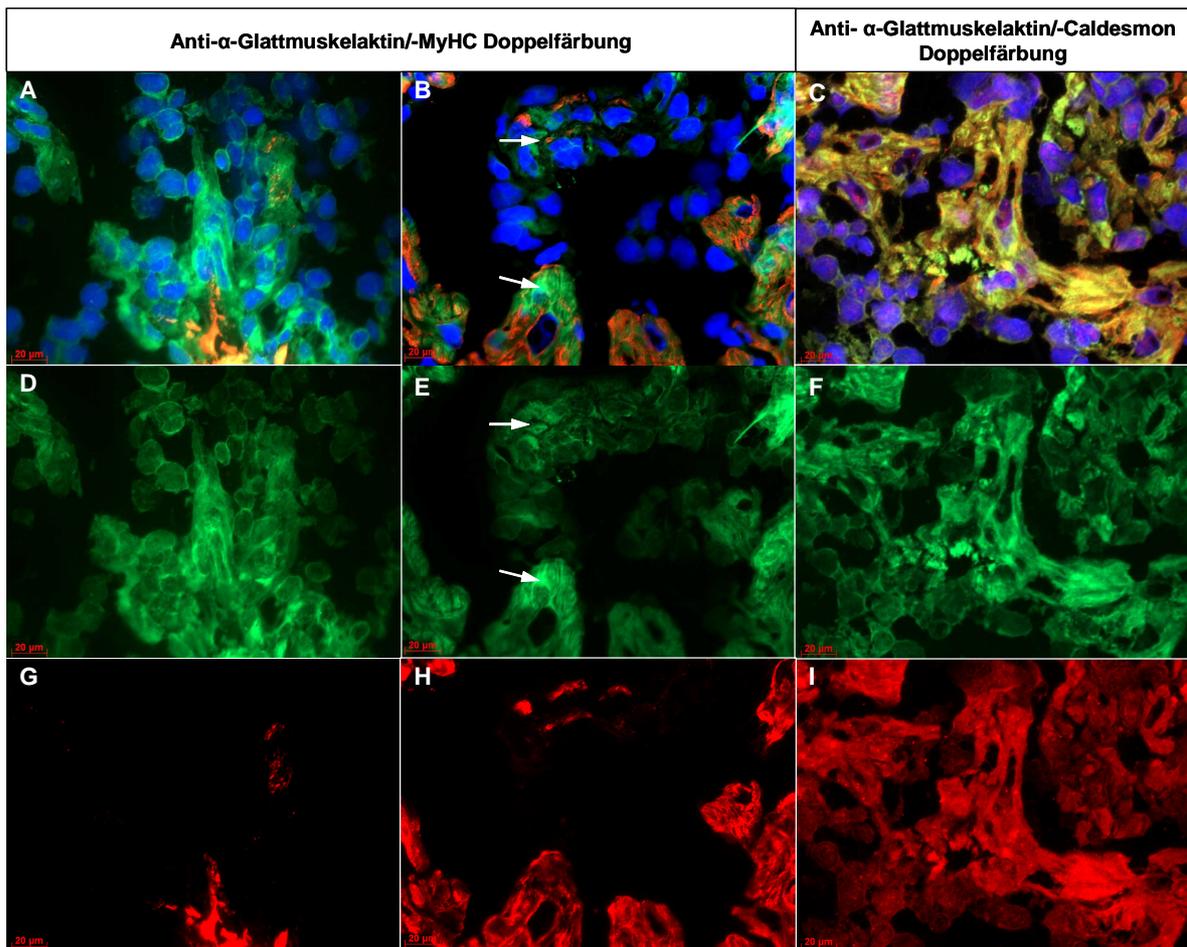


Abb.34: Doppelfärbungen von α -Glattmuskelaktin mit MyHC und Caldesmon Immunfluoreszenzfärbungen für α -Glattmuskelaktin (grün), MyHC bzw. Caldesmon (rot), Dapi-Kernfärbung (blau). Die Ausschnitte **A**, **B** und **C** stellen Überlagerungsbilder dar. Die weißen Pfeile in **B** und **E** weisen auf Bereiche hin, in denen nur α -Glattmuskelaktin exprimiert wird.

Die Proteinexpression von Thymosin β 4 nahm wie die von Caldesmon und α -Glattmuskelaktin im Verlauf der Regeneration zu (vgl. Abb. 35). Auch im scheinoperierten Kontrollherzen ist Thymosin β 4 bereits schwach detektierbar (Abb.35 (A)). Besonders stark erschien die Thymosin β 4-Expression innerhalb der ersten beiden Wochen nach der Schädigung des Ventrikels (C, D). Sie nahm nach 21 Tagen bereits wieder ab und erreichte nach 84 Tagen wieder das Expressionsniveau von scheinoperierten Herzen. Zur genaueren Lokalisation der Thymosin β 4-Expression wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen α -Glattmuskelaktin und α -Aktinin durchgeführt. Diese ergaben eine weitestgehende Kolokalisation von Thymosin β 4 sowohl mit α -Glattmuskelaktin, als auch mit α -Aktinin (s. Abb.36). Thymosin β 4 konnte nicht nur im Zytoplasma, sondern wie bereits beschrieben (Bock-Marquette et al., 2004) auch im Kern detektiert werden (vgl. Abb.35 (D))

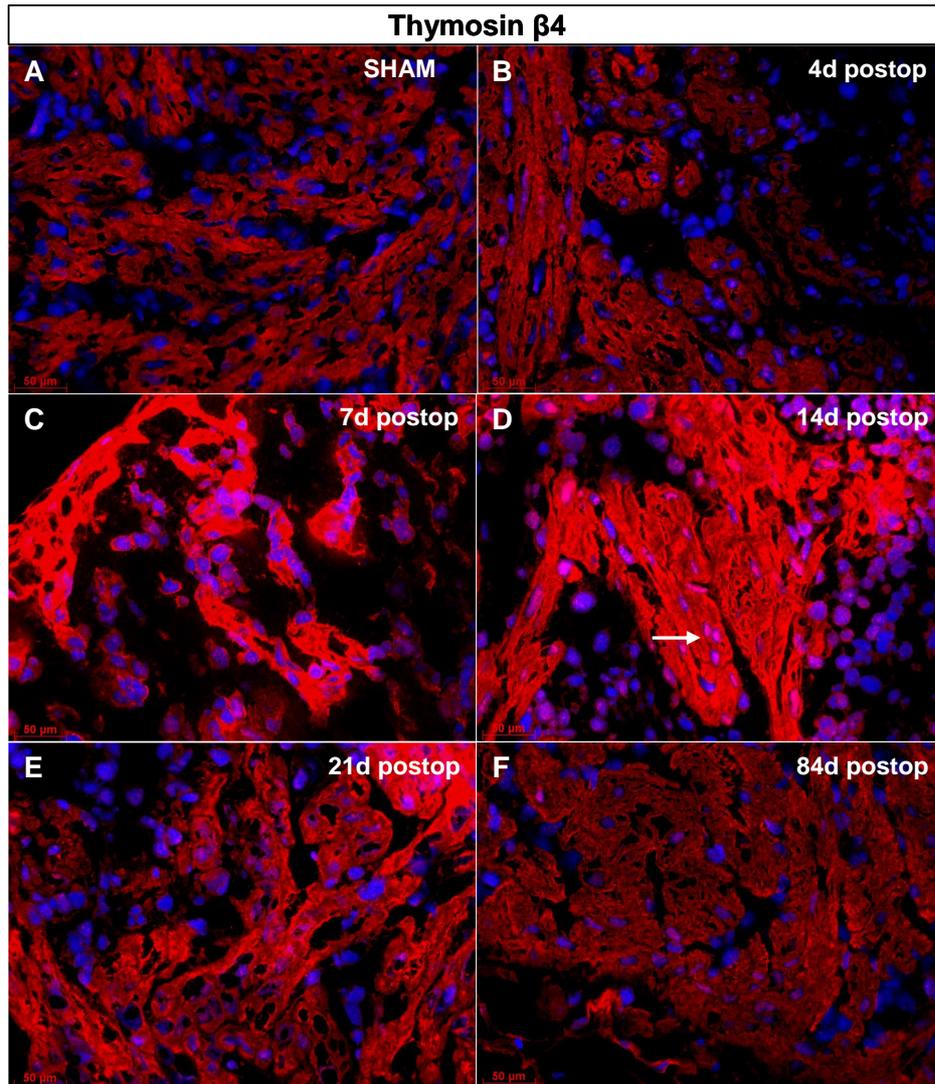


Abb.35: Zunahme der Thymosin β 4-Proteinexpression in den ersten drei Wochen der Herzregeneration Immunfluoreszenzfärbung (rot), Dapi- Kernfärbung (blau) im scheinoperierten Herzen (A), vier (B), sieben (C), 14 (D) bzw. 21 Tage (E) und 84 Tage nach Schädigung des Herzens (F). Der weiße Pfeil in (D) weist auf Thymosin- β Färbung in den Kernen hin.

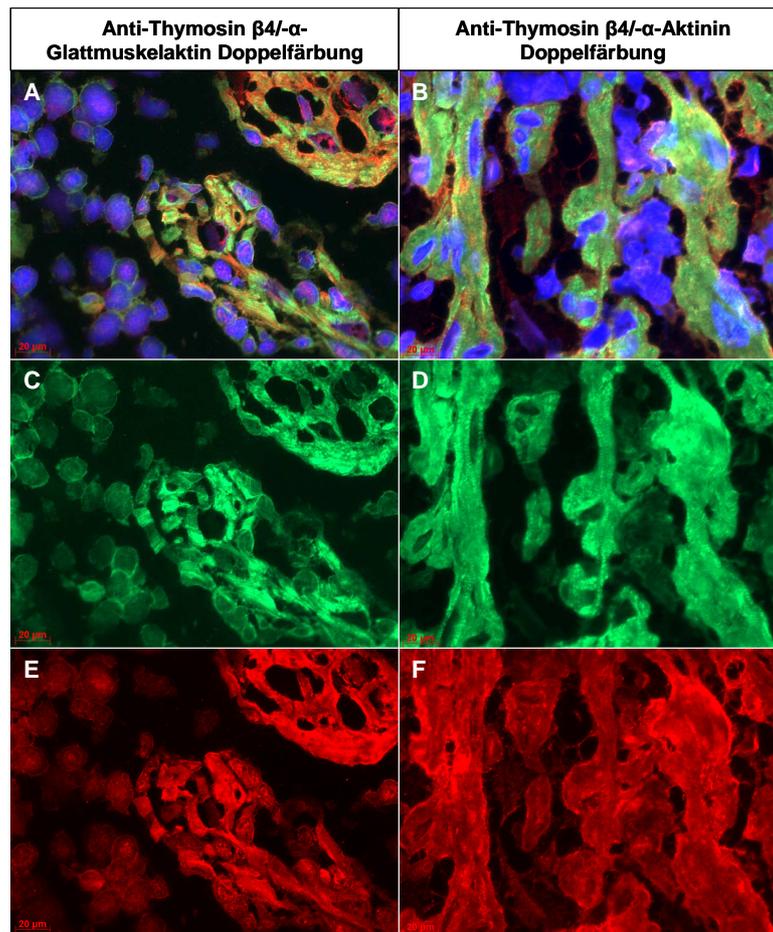


Abb.36: Kolokalisation der Proteinexpression von Thymosin β 4 mit MyHC und Caldesmon Immunfluoreszenzfärbungen für Thymosin β 4 (rot), α -Glattmuskelaktin bzw. α -Aktinin (grün), Dapi-Kernfärbung (blau). Die Ausschnitte **A** und **B** stellen Überlagerungsbilder dar.

3.5.4 Expression des regenerations-assoziierten Antigens 22/18 in regenerierenden Herzen

Der monoklonale Antikörper 22/18 konnte durch Immunisierung einer Maus mit Zellen aus einem “mid-bud Blastem” des Molches isoliert werden. Der Antikörper färbt vor allem Zellen innerhalb des Stumpfblastems beginnend 4 Tage nach Amputation. Nach zehn Tage ist ein großer Teil der Blastemzellen positiv, danach nimmt die Färbung sukzessive wieder ab (Kintner and Brockes, 1984). Das detektierte Antigen ist intrazellulär und filamentös. Auch in Zellkulturen aus verschiedenen Geweben des Molches, wie aus dem Stumpfblastem, dem Herzen und der Leber, wurde dieses Antigen in verschiedenem Ausmaß exprimiert. (Ferretti and Brockes, 1988; Ferretti and Brockes, 1990). Die Expression des regenerations-assoziierten Antigens 22/18 konnte vier, sieben, vierzehn und 21 Tage nach der Schädigung innerhalb des Ventrikels detektiert werden. Dabei nahm die Expressionsstärke im Verlauf der Regeneration zu. Vier Tage nach der Schädigung

konnten nur ganz vereinzelt positive Signale detektiert werden. Vierzehn Tage nach der Schädigung konnte die stärkste Expression beobachtet werden. Sie nahm nach 21 Tagen bereits wieder ab. Im scheinoperierten Ventrikel konnte keine Expression beobachtet werden. In Abb.36 ist die Expression von 22/18 im scheinoperierten Herzen (A) bzw. sieben (B) vierzehn (D) und 21 Tage nach Schädigung dargestellt. Die Färbung eines Schnittes von einem Stumpfblastem 12 Tage nach der Amputation diente als Positivkontrolle. Der gegen MyHC angefärbte Parallelschnitt (F) eines ähnlichen Ausschnittes wie in (D) weist daraufhin, dass es sich bei den positiven Zellen um MyHC-negative, undifferenzierte Zellen handeln könnte.

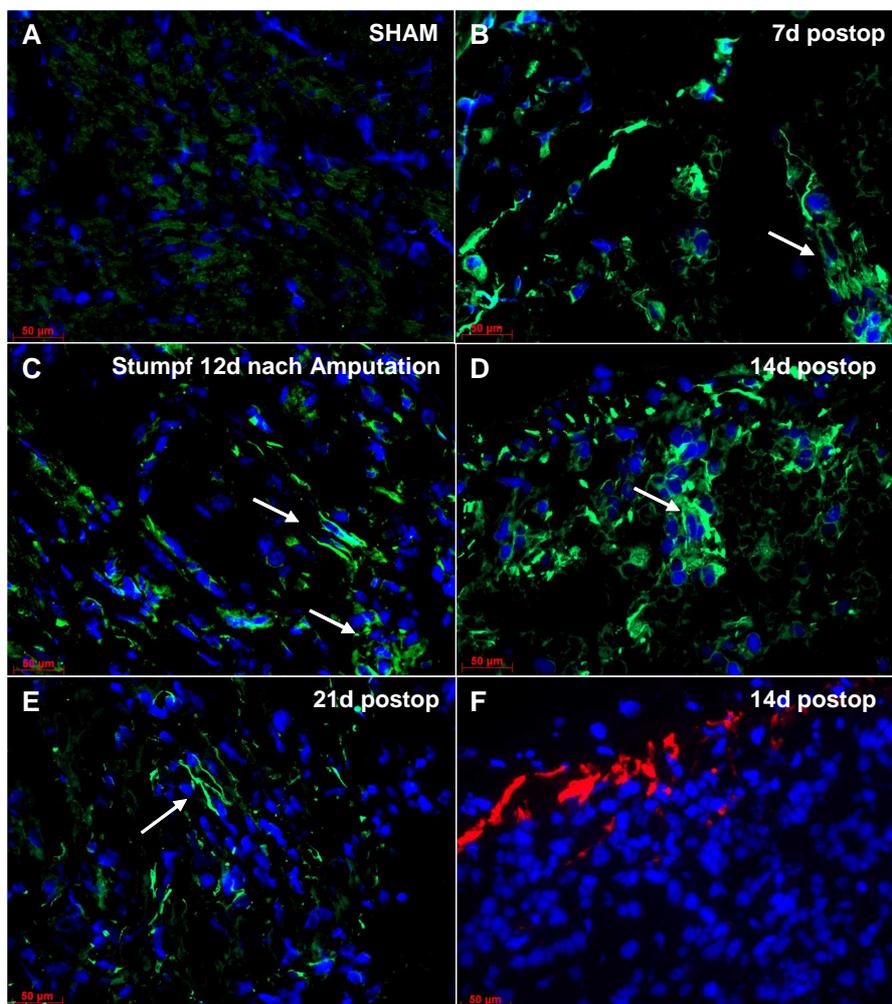


Abb.37: Expression des regenerationsassoziierten Antigens 22/18 im regenerierenden Molchherzen. Die Immunfluoreszenzfärbung für das 22/18 Antigen ist grün, die Dapi-Kernfärbung: blau. (A) scheinoperiertes Herz; (B) Herzschnitt 7 Tage nach der Schädigung; (C) Schnitt durch einen Extremitätenstumpf 12 Tage nach Amputation, (D) Herzschnitt 14 Tage nach der Schädigung, (E) Herzschnitt 21 Tage nach der Schädigung; (F) MyHC-Immunfluoreszenzfärbung (rot) eines Parallelschnittes.

3.6 Analysen der Proteinexpressionen während der Herzregeneration mittels Western Blots

3.6.1 Veränderungen des Phosphorylierungsstatus verschiedener Enzyme kurze Zeit nach der Schädigung des Herzens

Phosphorylierungen von Enzymen zählen zu den weitverbreiteten Mechanismen, die der Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymen dienen. Die Herstellung spezifischer Antikörper die einzelne Phosphorylierungsstellen erkennen, ermöglicht die Detektion verschiedener Phosphorylierungszustände. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Herzen 10, 30 Minuten und zwei Stunden nach der mechanischen Schädigung des Ventrikels entnommen. Aus diesen Proben wurden Proteine extrahiert und jeweils 10 µg Proteinextrakt auf einer denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennt. Die auf eine Nitrocellulose-Membran transferierten Proteineextrakte wurden anschließend mit verschiedenen primären Antikörpern inkubiert und schließlich mit entsprechenden sekundären Antikörpern nachgewiesen. Dabei wurden Komponenten verschiedener Signaltransduktionswege, die bekanntermaßen in Stressantworten, Differenzierungsprozesse, Zellteilungen, Zellwachstum etc. involviert sind, untersucht.

Bei der in dieser Arbeit untersuchten Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen activated kinase) p38 handelt es sich um ein Enzym innerhalb einer Signalkaskade, die für die Kontrolle der zellulären Antwort auf Zytokine und Stress zuständig ist. In Abb. 36 wird deutlich, dass bereits 10 Minuten nach Schädigung beide vom verwendeten P-p38-Antikörper detektierten Phosphorylierungsstellen (Thr 180/Tyr 182) stark phosphoryliert wurden, während in den scheinoperierten oder nicht operierten Kontrollen teilweise keine bzw. nur sehr schwache Phosphorylierungen erkennbar waren. Die beobachtete Aktivierung mittels Phosphorylierung blieb auch noch 30 min bzw. zwei Stunden nach der Schädigung bestehen.

Auch die JNK/SAPK (stress activated protein kinase), ist ein Enzym, das Stress-Wachstums- und Differenzierungssignale auf Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF-2 u. a. überträgt. Die SAPK wurde in Folge der Schädigung besonders stark nach zwei Stunden an dem Threoninrest 183 und den Tyrosinrest 185 phosphoryliert.

Die Aktivierung der Proteinkinase C gehört zu den ersten Ereignissen in einer Kaskade von Reaktionen, die zu einer Vielzahl von zellulären Antworten wie Sekretion, Genexpression, Proliferation und Muskelkontraktion führen. Die Isoformen der Proteinkinase C werden in drei Klassen unterteilt, und werden entweder in einer Ca²⁺

abhängigen oder unabhängigen Weise von Phosphatidylserin, Diacylglycerol und Phorbolestern aktiviert. Eine andere Klasse benötigt weder die einen noch die anderen Stimuli für ihre Aktivierung. In diesem Experiment schienen die ζ -Threonin 404-Reste der detektierten PKCs nach 10 min noch nicht aktiviert zu werden. Nach 30 min bzw. zwei Stunden war eine leichte Zunahme der Phosphorylierung zu beobachten.

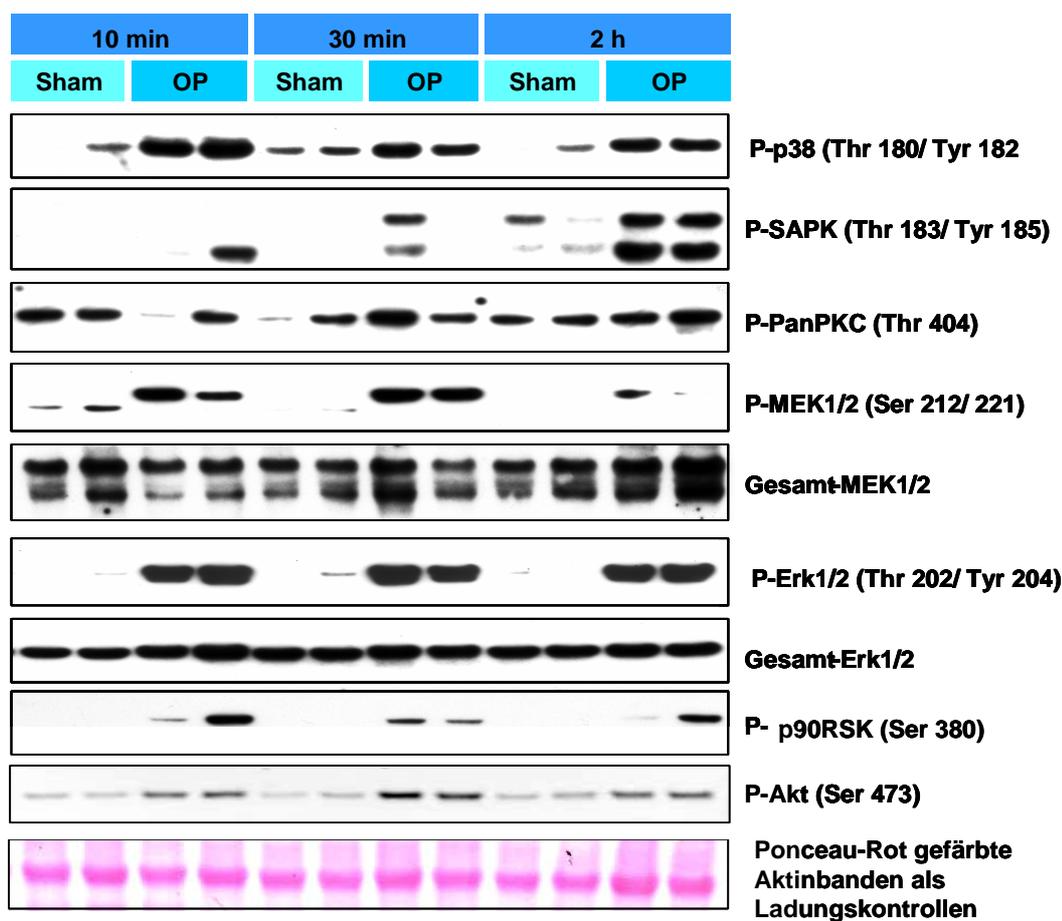


Abb.38: Westernblotanalyse der Phosphorylierungszustände verschiedener Kinasen 10, 30 und 120 min nach der Schädigung des Ventrikels im Vergleich mit scheinoperierten (Sham) Herzen

Die MAP-/Erk-Kinase MEK1 und MEK2 sind Bestandteile der Mitogen aktivierten Proteinkaskade, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung kontrollieren. MEK1 und MEK2 werden ihrerseits von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, sowie mittels Membrandepolarisationen oder Kalziumeinströmungen stimuliert. Raf-ähnliche Moleküle aktivieren MEK1/2 durch Phosphorylierungen an den Serinresten 212 und 221. Auch die Kinasen MEK1/2 wurden 10 bzw. 30 min nach Herzschädigung stark phosphoryliert. Die Phosphorylierung wurde nach zwei Stunden bereits wieder schwächer. Vergleicht man die Gesamtmenge an MEK1 und MEK2 sind zwar Unterschiede zwischen

den einzelnen Proben erkennbar, diese allein scheinen jedoch nicht für die eindeutige Aktivierung nach Herzschädigung verantwortlich gemacht werden zu können.

Die Aktivierung von MEK1/2 führte ihrerseits zur Aktivierung der extracellulär-signal-responsive-Kinasen Erk1 und Erk2 (auch p44 und p42 MAP-Kinasen genannt) durch Phosphorylierungen an dem Threoninrest 202 und dem Tyrosinrest 204. Bereits 10 min nach Schädigung hatte die Aktivierung der MEK1/2-Kinasen eine Aktivierung der Erk1/2 Kinasen zur Folge, die auch noch zwei Stunden nach der Schädigung bestehen blieb. Die Gesamtmenge an Erk1/2 hatte leicht zugenommen im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollherzen.

p90-RSK gehört zur Familie der weitverbreiteten 90 kDa ribosomalen S6 Serin/Threonin-Kinasen. Die p90-RSK wird von Erk1/2 mittels Phosphorylierung an verschiedenen Phosphorylierungsstellen aktiviert. Der hier verwendete Antikörper erkennt die Phosphorylierung an dem Serinrest 380. Die im Zellkern lokalisierte aktivierte Form der p90-RSK phosphoryliert verschiedene Transkriptionsfaktoren wie CREB, c-Fos und SRF. Wie zu erwarten hatte die schädigungsbedingte Aktivierung von MEK1/2 und Erk1/2 auch eine Aktivierung von p90-RSK an allen drei untersuchten Zeitpunkten zur Folge.

Die Proteinkinase Akt spielt eine kritische Rolle für das Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Apoptose. Akt wird von Insulin und verschiedenen Wachstums- und Überlebensfaktoren aktiviert. Die Aktivierung von Akt führt ihrerseits zur Inhibition der Apoptose durch Phosphorylierungen verschiedener Zielproteine wie Bad, c-Raf, Caspase-9 etc.. Außerdem hat Akt Einfluss auf die Glycogensynthese und das Zellwachstum. Auch im Fall der Proteinkinase Akt führte die Schädigung zur verstärkten Phosphorylierung des Serinrestes 473 während aller untersuchten Zeitpunkte. Nach 30 min war die Aktivierung am stärksten.

3.6.2 Untersuchung des Einflusses des MEK1/2 Inhibitors U0126 auf die Herzregeneration

Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen ergaben eine eindeutige und massive Aktivierung des MAP-Kinase Signalweges innerhalb der ersten zwei Stunden nach Herzschädigung. Die Aktivierung konnte anhand von Phosphorylierungen dreier miteinander agierender Kinasen gezeigt werden. Aus dieser Beobachtung ergab sich die Fragestellung, welche Auswirkung die Inhibition eines der stark aktivierten Enzyme auf den Regenerationsverlauf haben würde. Der kommerziell erhältliche, hochselektive

Inhibitor der MEK1/2-Kinase U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio] butadien) erschien für die Untersuchung dieser Fragestellung geeignet (Favata et al., 1998).

Zunächst wurden drei Konzentrationen des Inhibitors (5, 10, 20 µg/g Körpergewicht) auf ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit im *in vivo* Experiment getestet. Dafür wurde jeweils die entsprechende Menge der in Methanol gelösten, 10mM U0126-Stocklösung mit Amphibien-PBS (A-PBS) verdünnt und den zuvor narkotisierten Molchen intraperitoneal gespritzt. Zwei Stunden später wurden die Tiere erneut narkotisiert und der Ventrikel mittels Quetschung mechanisch geschädigt. Die Entnahme der Herzen erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten. Der inhibitorische Effekt des U0126 wurde mittels Westernblot unter Verwendung des P-MEK1/2- und des P-Erk1/2 Antikörpers untersucht. Eine Konzentration von 20µg/g Körpergewicht zeigte hierbei eine effektive Inhibition (Dr. Thomas Kubin, persönliche Mitteilung) und wurde in allen weiteren Experimenten verwendet. Kontrolltiere erhielten anstelle des Inhibitors Injektionen von einem Gemisch aus 42% Methanol/ 58% A-PBS, welches der Lösungsmittelzusammensetzung mit Inhibitor entsprach.

3.6.2.1 Die biochemische Inhibition der MEK1/2-Kinase durch den Inhibitor U0126 ist in den ersten 30 min nach der Herzschädigung detektierbar

In diesem Experiment wurden den Versuchsgruppen zwei Stunden vor der Herzschädigung intraperitoneal 20µg/g Körpergewicht U0126 bzw. das verdünnte Lösungsmittel (42% Methanol/ 58% A-PBS) injiziert. Nach der Herzschädigung bzw. nach der Scheinoperation, bei der lediglich der Korpus geöffnet und wieder verschlossen wurde, wurden die Herzen 10 min, 30 min oder 24 h später entnommen.

Bereits 10 min nach der Herzschädigung wurde die Phosphorylierung der MEK1/2-Kinasen sowohl in den scheinoperierten, als auch in den geschädigten Herzen nach Inhibitorgabe stark verringert, die Gesamtmenge der Kinasen blieb unverändert.

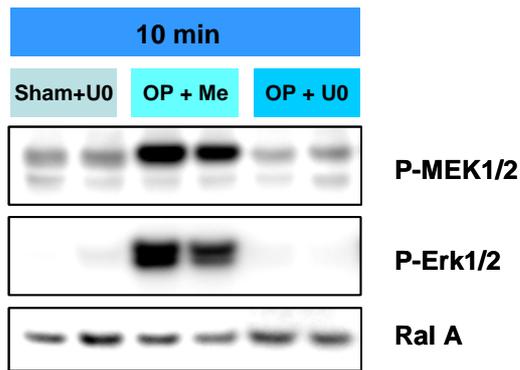


Abb.39: Inaktivierung der MEK1/2 und Erk1/2-Kinasen nach i.p. Injektion des Inhibitors U0126 in scheinoperierte Herzen und in Herzen 10 min nach Schädigung.

Für das Zielenzym der MEK1/2-Kinase die Erk1/2-Kinase konnte auch noch nach 30 min keine Phosphorylierung detektiert werden. Die 90kDa S6-Kinase, die von der aktivierten Erk1/2-Kinase phosphoryliert wird, zeigte auch hier eine deutlich schwächere Phosphorylierung. Einen Tag nach Herzschädigung und Inhibitorbehandlung waren keine Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren in Bezug auf die hier untersuchten Phosphorylierungsstellen mehr detektierbar. Der Phosphorylierungsstatus erreichte in den meisten Fällen wieder das Niveau der ungeschädigten Herzen. Die Detektion des GTP-bindenden Proteins Ral A, einem Mitglied der Ras-Superfamilie diente hier und im Folgenden zum quantitativen Vergleich der einzelnen Proben sowie die Ponceau-Rot gefärbten Membranausschnitte.

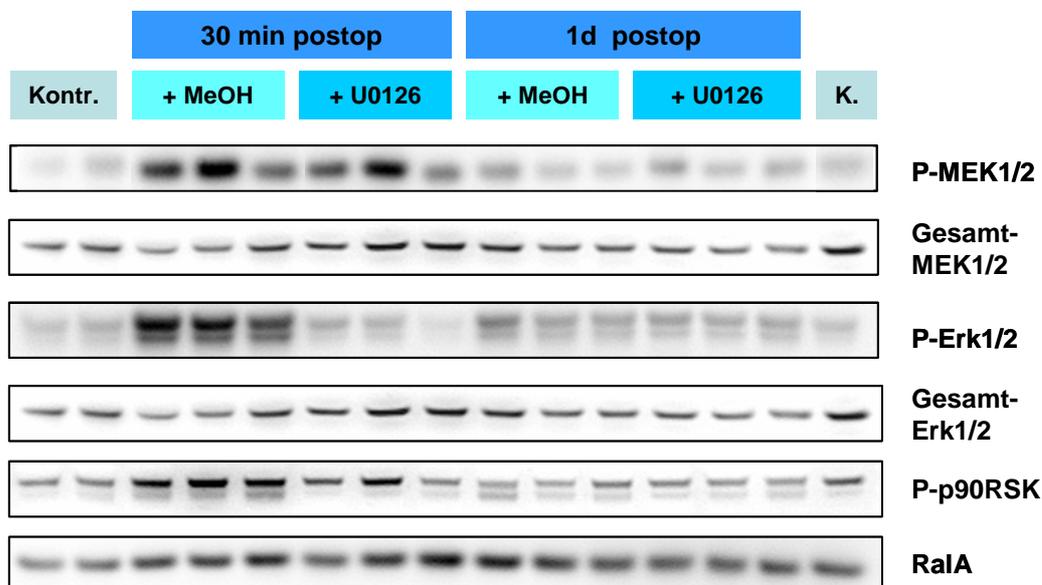


Abb.40: Untersuchung des Inhibitoreinflusses 30 min und einen Tag nach der Herzschädigung auf die Phosphorylierungen der MEK1/2, Erk1/2 und p90-RSK- Kinasen. Kontr. bzw. K. kennzeichnet im Folgenden Proteinextrakte aus normalen, ungeschädigten Herzen.

3.6.2.2 Stärkere Aktivierung der Akt-Kinase nach Inhibition der MEK1/2-Kinase durch den Inhibitor U0126

Zur Überprüfung ob sich, durch die Inaktivierung des MAPK-Signalweges auf der Stufe der MEK1/2-Kinase, der Phosphorylierungsstatus anderer Signalwege verändert, wurden die Phosphorylierungen der Akt-Kinase und der p38-MAP-Kinase ebenfalls untersucht. Für die Phosphorylierungsstellen Serin 473 und insbesondere Threonin 308 der Akt-Kinase konnte nach 30 min eine stärkere Phosphorylierung in den Proteinextrakten der mit U0126 behandelten Tieren detektiert werden. Im Fall der p38-MAP-Kinase konnten hingegen keine eindeutigen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Einen Tag später verhielten sich beide Versuchsgruppen wieder gleich.

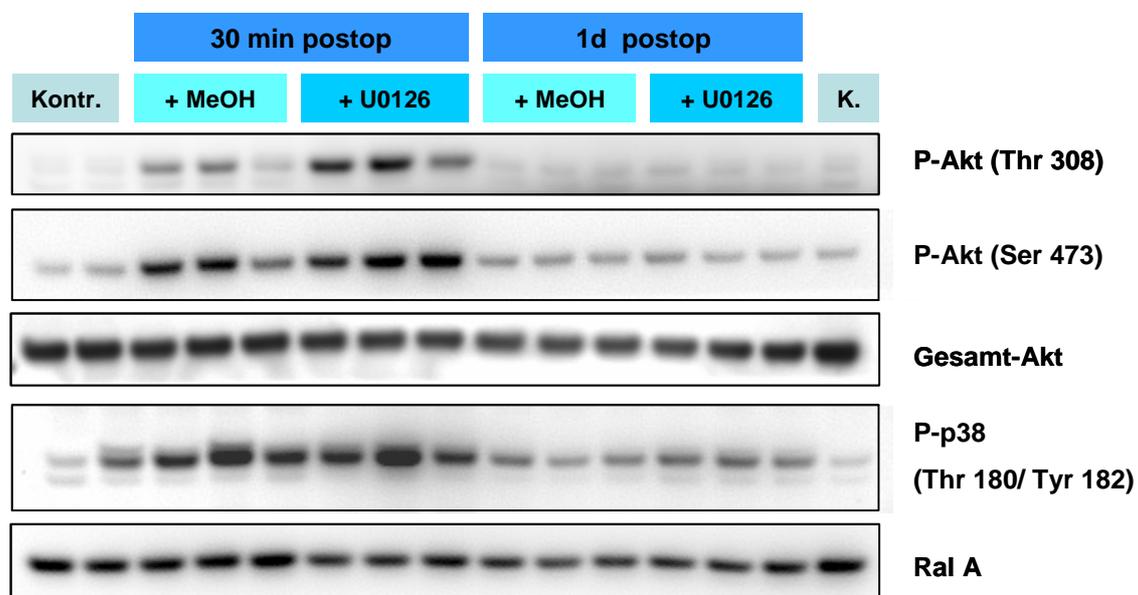


Abb.41: Stärkere Aktivierung der Akt- gegenüber p38-MAP-Kinase nach Inhibitorinjektion

3.6.2.3 Weitere Substratproteine des MAPK-Signalweges und/oder Akt-Signalweges zeigen keine eindeutige Deregulation nach U0126-Injektionen

Neben den bereits erwähnten Substratproteinen der MEK1/2-Kinase sind weitere Substratproteine der p90 RSK und der Erk-Kinase in Bezug auf Veränderungen ihrer Phosphorylierungstati nach 10 min bzw. zwei Stunden im geschädigten im Vergleich mit scheinoperierten Herzen untersucht worden. Für den Zeitpunkt 30 min nach der Herzschädigung wurden zusätzlich die Auswirkungen der präoperativen U0126-Injektion untersucht.

Dabei zeigte die von Mitogenen und Stressfaktoren aktivierte Kinase MSK1, die sowohl von Erk als auch von der p38 MAPK phosphoryliert wird, eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung an dem Serinrest 376 30 min und auch noch zwei Stunden nach der Herzschädigung. Allerdings schien in diesem Fall die präoperative U0126-Injektion nicht zu einer schwächeren Phosphorylierung wie im Fall der p90 RSK zu führen. Das gleiche Bild zeigte auch ein weiteres Zielgen der MSK, das Histon 3. Die Phosphorylierung des Serinrestes 10 des Histons 3 spielt eine wichtige Rolle bei der Chromosomenkondensation während der Mitose.

Die Untersuchung von weiteren Substratproteinen der Erk bzw. der p90 RSK wie der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und CREB lieferte für beide Transkriptionsfaktoren keine eindeutigen Befunde.

Der Komplex aus Tuberin, einem Produkt des Tumorsuppressorgens TSC2, und Hamartin (TSC1) wird durch Phosphorylierungen an Threonin 1462 und 1571 des Tuberins von der Akt-Kinase reguliert. Die Phosphorylierungen führen zur Hemmung der mTOR/FRAP-Kinase (mammalian target of rapamycin). Diese führt wiederum zum Ausbleiben der Hyperphosphorylierung des 4EBP-1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1), einem Inhibitor des Translationsstarts. Ohne Hyperphosphorylierung bleibt 4E-BP1 an eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) gebunden und inhibiert dadurch die cap-abhängige Translation, indem er die Bindung von eIF4E an die cap-Struktur der m-RNS verhindert. 30 min nach der Herzschädigung nahm die Phosphorylierung am Threoninrest 1571 des Tuberins leicht zu. Die mit dem MEK1/2-Inhibitor behandelten Herzen zeigten aber keine signifikanten Unterschiede.

Im Fall des bereits erwähnten 4E-BP1 bereiten die Phosphorylierungen an den Threoninresten 37/46 die nachfolgenden Phosphorylierungen an dem Serinrest 65 und Threoninrest 70 vor. Sie alleine sind jedoch nicht ausreichend um die Bindung mit eIF4E aufzuheben. Auch hier waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Nach U0126 –Behandlung konnte jedoch eine etwas stärkere Phosphorylierung an den hier untersuchten Aminosäureresten des 4E-BP1 beobachtet werden. Dieser Umstand könnte auf eine erhöhte Translationsaktivität hinweisen.

Die mitogenaktivierte p70 S6 Kinase wird für Zellwachstumsprozesse und den Ablauf der G1-Phase des Zellzyklus benötigt. Die Aktivität der p70 S6 Kinase wird mittels multipler Phosphorylierungen reguliert. Sie stellt sowohl innerhalb des Akt-Signalweges ein Zielprotein der mTOR-Kinase, als auch der Erk1/2-Kinase dar. Die p70 S6 Kinase phosphoryliert ihrerseits das S6-Protein der 40S ribosomalen Untereinheit und ist somit in

die Translationskontrolle involviert. Die untersuchten Proben zeigten untereinander für die drei untersuchten Phosphorylierungsstellen ein sehr heterogenes Muster und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine sehr schwache Zunahme. Am stärksten war die Zunahme der Phosphorylierungen der Serinreste 240/244 des S6 ribosomalen Proteins erkennbar. Aber auch hier sind die Unterschiede zwischen unbehandelten (OP+MeOH) und behandelten (OP+U0126) nicht eindeutig.

Die GSK-3 (Glykogensynthase-Kinase-3) phosphoryliert und inaktiviert in Abhängigkeit von der vorherrschenden Insulinkonzentration die Glykogensynthase. Des Weiteren ist sie auch noch in die Regulation der Proteinsynthese, des Cyclin D1-Abbaus etc. involviert. Zudem ist sie ein Bestandteil des Wnt-Signalweges. Die von Akt vermittelte Phosphorylierung von GSK3- β an dem Serinrest 9 führt zu ihrer Inaktivierung. Zwei der drei mit Inhibitor behandelten Proben zeigten eine leicht erhöhte Phosphorylierung des Serinrestes im Vergleich zu den ungeschädigten Kontrollen und zu den nur Lösungsmittel behandelten Kontrollen.

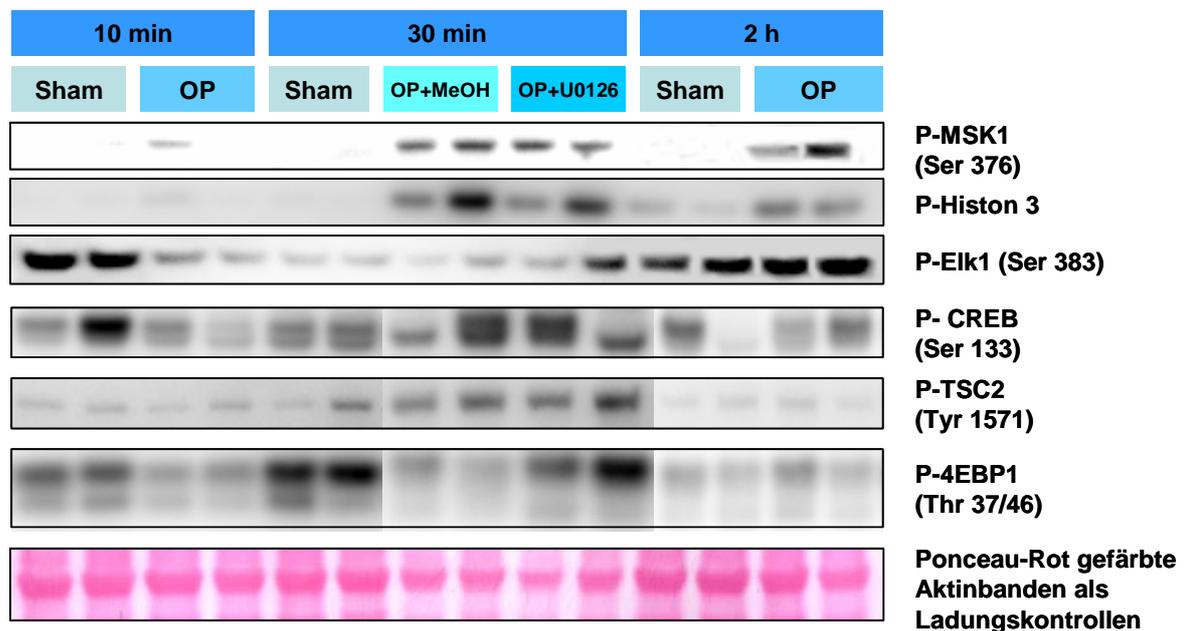


Abb.42a: Untersuchung weiterer Zielproteine innerhalb des MAPK- und Akt- Signalweges auf mögliche durch den Inhibitor induzierte Deregulationen 30 und 120 min nach der Herzschiädigung.

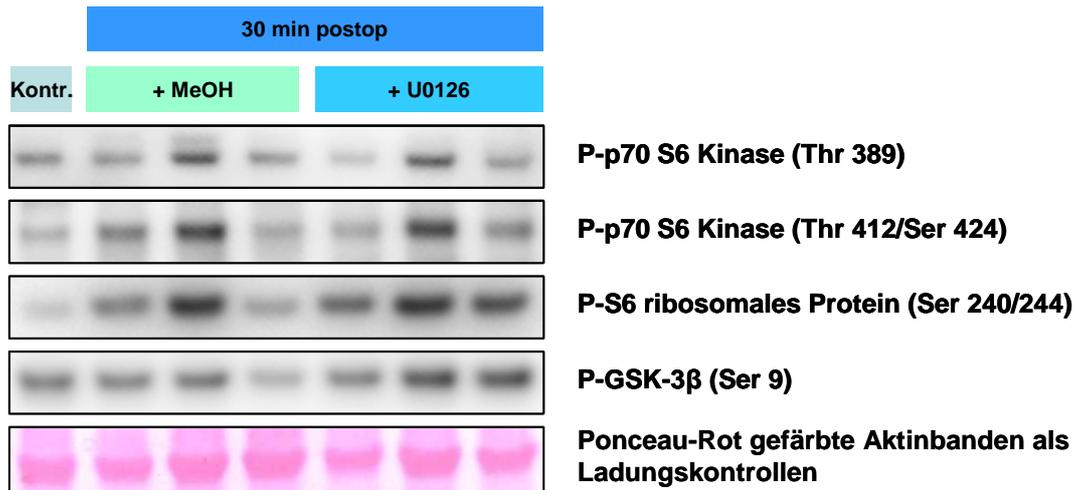


Abb.42b: Untersuchung weiterer Zielproteine innerhalb des MAPK- und Akt- Signalweges auf mögliche durch den Inhibitor induzierte Deregulationen 30 und 120 min nach der Herzschädigung.

3.6.2.4 Untersuchung des Einflusses der U0126-Behandlungen auf die Proteinexpression von Zytoskelettproteinen und Mitose- bzw. S-Phasen Markern in geschädigten Herzen

Für die vier, sieben, und 14-Tage Versuchsgruppen erhielten die Molche wie bereits beschrieben zunächst zwei Stunden vor der Herzschädigung i.p. Injektionen des Inhibitors bzw. des Lösungsmittels. An den darauffolgenden Tagen wurden sie jeweils einmal täglich injiziert. Den 4 Tage-Gruppen wurden die Herzen am Tag nach der 4. Injektion entnommen, der 7-Tage-Gruppe drei Tage später und der 14 Tage-Gruppe zehn Tage später. Auffällig war die stärkere Myosin-Schwere-Kette-Expression in den U0126-Proben vier Tage nach Herzschädigung. Die MyHC-Expression zeigte sieben Tage später keine großen Unterschiede mehr zu der nur mit Lösungsmittel behandelten Gruppe. 14 Tage später war die Expression in den Kontrolltieren stärker als in den mit U0126 behandelten Tieren. Die Expression von Troponin T schien im Gegensatz zu MyHC kaum dereguliert zu sein.

Die Phosphorylierung des Serinrestes des Histons 3 begann nach sieben Tagen anzusteigen und wurde nach 14 Tagen am stärksten. Ein ähnliches Ergebnis ergab auch ein Marker der S-Phase des Zellzyklus der Antikörper gegen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen).

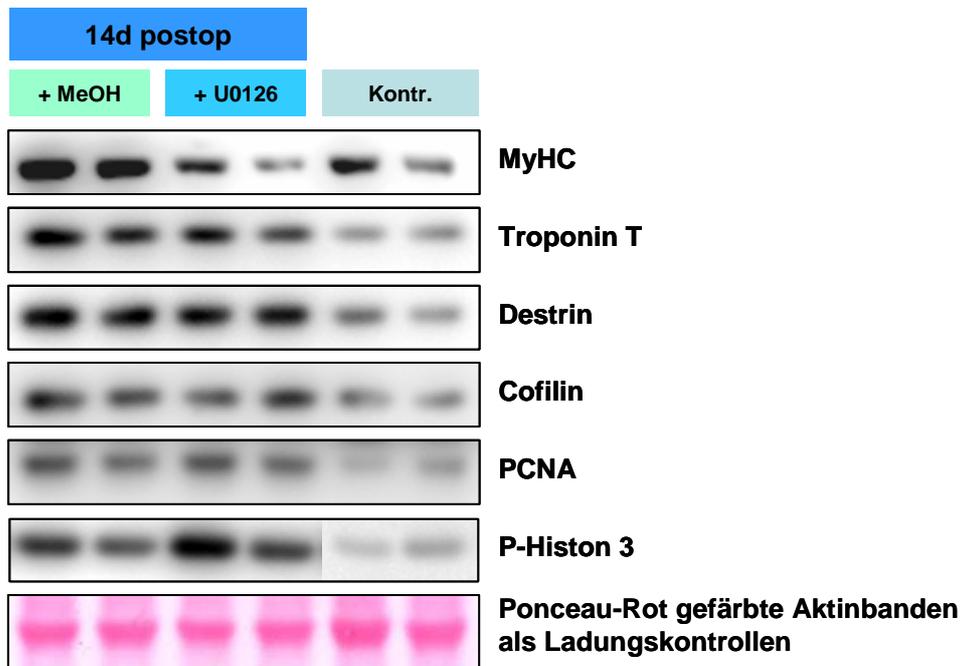
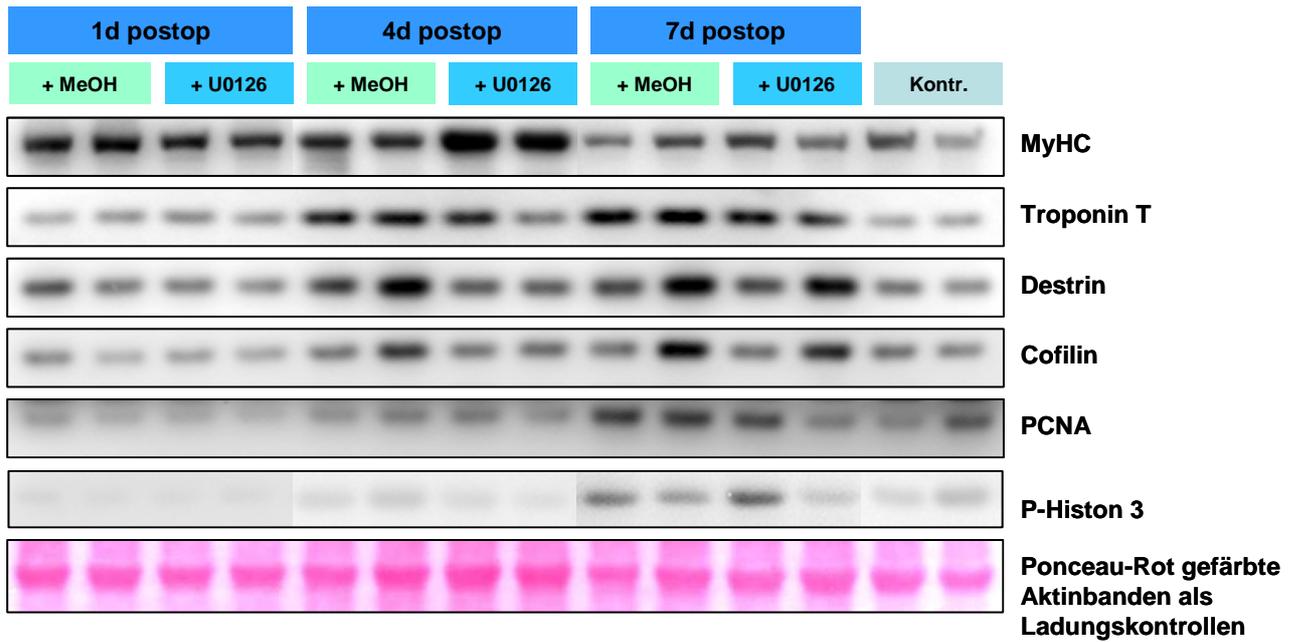


Abb.43: Westernblotanalyse zur Proteinexpression verschiedener Zytoskelettkomponenten und Proliferationsmarkern 1, 4, 7 und 14 Tage nach der Herzschädigung

3.6.2.5 Verringerte Expression der Aktin-Depolymerisationsfaktoren Cofilin und Destrin in U0126 injizierten Herzen vier Tage nach der Herzschädigung

Eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedlichen Mengen an MyHC nach vier und 14 Tagen nach Herzschädigung könnte ein veränderter Ablauf der Umbauprozesse des Zytoskelettes, die im Rahmen der Regeneration stattfinden, darstellen. Aus diesem Grund wurde die Expression zwei bekannter Aktin-Depolymerisationsfaktoren im Verlauf der Regeneration und der U0126-Behandlung untersucht. Als Antwort auf entsprechende Stimuli unterstützt Cofilin unter anderem die Regeneration von Aktinfilamenten durch das Auflösen bestehender Filamente. Auch Destrin gehört zur Familie der Aktin-Depolymerisationsfaktoren und bewirkt ebenfalls die Depolymerisation von Aktinfilamenten und ist in Vorgänge wie Zellmobilität und Zytokinese involviert. Ab dem vierten Tag nach der Herzschädigung stieg die Proteinexpression von Cofilin und Destrin in den geschädigten Kontrollherzen (+ MeOH) leicht an und verstärkte sich innerhalb der untersuchten 14 Tage Herzproben. Die mit dem MEK1/2-Inhibitor behandelten Herzen hatten vier Tage nach Herzschädigung ein ähnliches Expressionsniveau wie die ungeschädigten Kontrollherzen. In den Inhibitor-injizierten Herzen stieg die Expression nach sieben bzw. 14 Tagen deutlich an, ohne sich jedoch von den geschädigten Kontrollherzen (+ MeOH) zu unterscheiden.

3.6.2.6 Die transiente oder kontinuierliche Injektion von U0126 hat keinen Einfluss auf die Expression bzw. Phosphorylierung von Erk1/2, Histon 3 oder MyHC

Die beiden in Abb. 44 dargestellten Versuchsgruppen unterscheiden sich lediglich in der Dauer der Gabe des MEK1/2-Inhibitors. Dabei wurde in dem einen Fall (14d postop; 4 Injekt.) wie bereits beschrieben die erste Injektion 2 Stunden vor der Herzschädigung durchgeführt. Darauf folgten an den nächsten drei Tagen weitere drei Injektionen und nach weiteren zehn Tagen, ohne erneute Injektionen, schließlich die Herzentnahme. Bei der zweiten Versuchsgruppe erhielten die Molche insgesamt 14 Injektionen, die ebenfalls täglich verabreicht wurden. Wie bereits beschrieben, hielt die durch den Inhibitor ausgelöste verringerte Phosphorylierung der Erk1/2-Kinase noch nicht einmal 24 Stunden an (vgl. Abb.40), und wurde auch durch die täglichen Injektionen nicht wieder ausgelöst. Die Erk-Kinase schien sogar im Gegenteil auch 14 Tage nach der Herzschädigung noch stärker aktiviert zu sein als in den ungeschädigten Kontrollherzen. Auch die

Proteinexpressionen des MyHC und P-Histon 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen der transienten oder der kontinuierlichen Inhibitorinjektion.

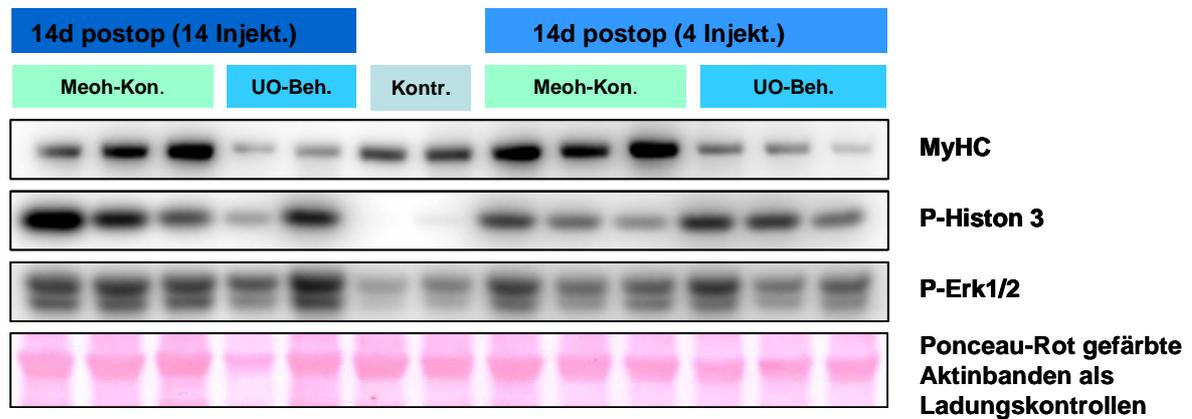


Abb.44: Vergleich zwischen transienter (viermalige Injektion) und kontinuierlicher (vierzehnmalige) Inhibitorgabe auf die Phosphorylierung bzw. Expression verschiedener Proteine 14 Tage nach der Herzschädigung.

3.7 Untersuchungen des Einflusses des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf Primärkulturen aus ungeschädigten Molchherzen

Zur weiteren Analyse des *in vivo* beobachteten Effektes von U0126 auf die Herzregeneration wurden Primärkulturen aus ungeschädigten Herzen generiert. Diese Kulturen zeigten morphologisch unterschiedliche Zelltypen. Wurden die Zellen längere Zeit kultiviert, bildeten sie dreidimensionale Cluster. Manche dieser Cluster kontrahierten gelegentlich. Da die Zellen in Kultur proliferierten, ließen sie sich mehrfach passagieren.

Für das im Folgenden beschriebene Experiment wurden Zellen aus der fünften Passage verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von sieben Tagen mit reinem Methanol, 10 μ M oder 80 μ M U0126 inkubiert. Dabei wurde pro Konzentration zwei Kammern behandelt. Jeden zweiten Tag, also insgesamt 3 Mal wurde, das Medium unter Zusatz des Lösungsmittels bzw. des Inhibitors erneuert.

Im Hellfeld waren zunächst keine Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen erkennbar. Die Immunfluoreszenzfärbungen gegen das Sarkomer- und Stressfaserprotein α -Aktinin und den Mitosemarker phosphoryliertes Histon 3 zeigten deutliche Unterschiede.

3.7.1 Blockierung der Mitoserate nach Inkubation von primären Molchherzzellen mit U0126

Die kontinuierliche Inkubation mit U0126 führte zu einer deutlichen Abnahme von für den Mitose-Marker Phospho-Histon 3 positiven Zellen. Dabei schienen bei einer geringen U0126-Konzentration (10 μ M) α -Aktinin positive Zellen sensitiver auf den Inhibitor zu reagieren als die α -Aktinin negativen Zellen. Allerdings zeigte die α -Aktinin-Färbung in Zellen deren Kerne auch für das phosphoryliertes Histon 3 positiv waren keine geordnete Anfärbung von Z-Scheiben, sondern eher das Erscheinungsbild von Stressfasern (vgl. Abb. 47 (D)). Bei einer Konzentration von 80 μ M U0126 sind sowohl die α -Aktinin positiven, als auch die α -Aktinin negativen Zellen in ihrer Teilungsfähigkeit gehemmt worden.

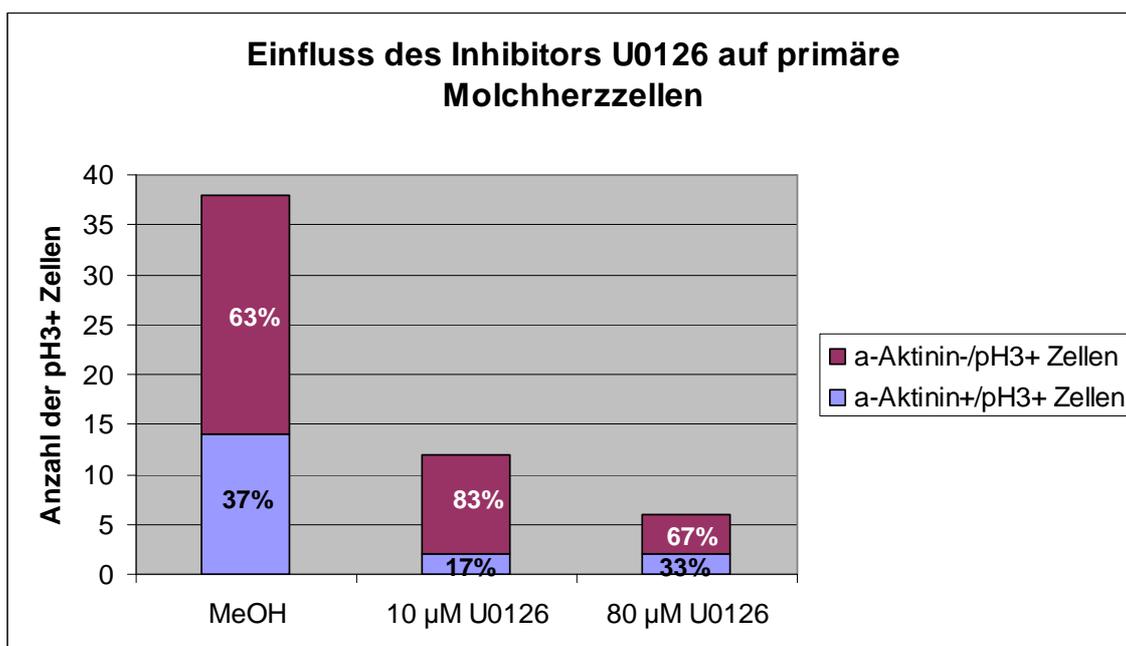


Abb.45: Einfluss des Inhibitors U0126 auf die Mitoserate von primären Molchherzzellen

3.7.2 Verringerung der Anzahl an α -Aktinin positiven Zellen nach Behandlung mit dem Inhibitor U0126

Ca. 18% der Zellen aus der Passage 5 waren α -Aktinin positiv. Mit Zunahme der U0126-Konzentration nahm nicht nur die Kernteilungsrate, sondern auch die Anzahl α -Aktinin-exprimierender Zellen ab. Sie sank auf ca. 7% bei Verwendung von einer Inhibitorkonzentration von 80 μ M.

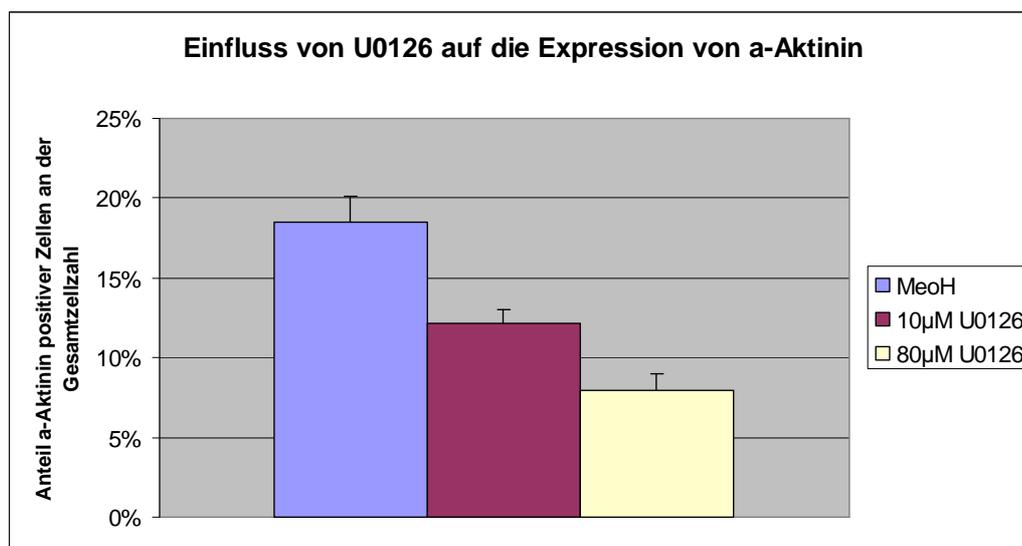


Abb.46: Grafische Darstellung der Abnahme der Anzahl α -Aktinin positiver Zellen nach Behandlung mit dem MEK 1/2 Inhibitor U0126 Der Fehlerbalken gibt den Standardfehler an.

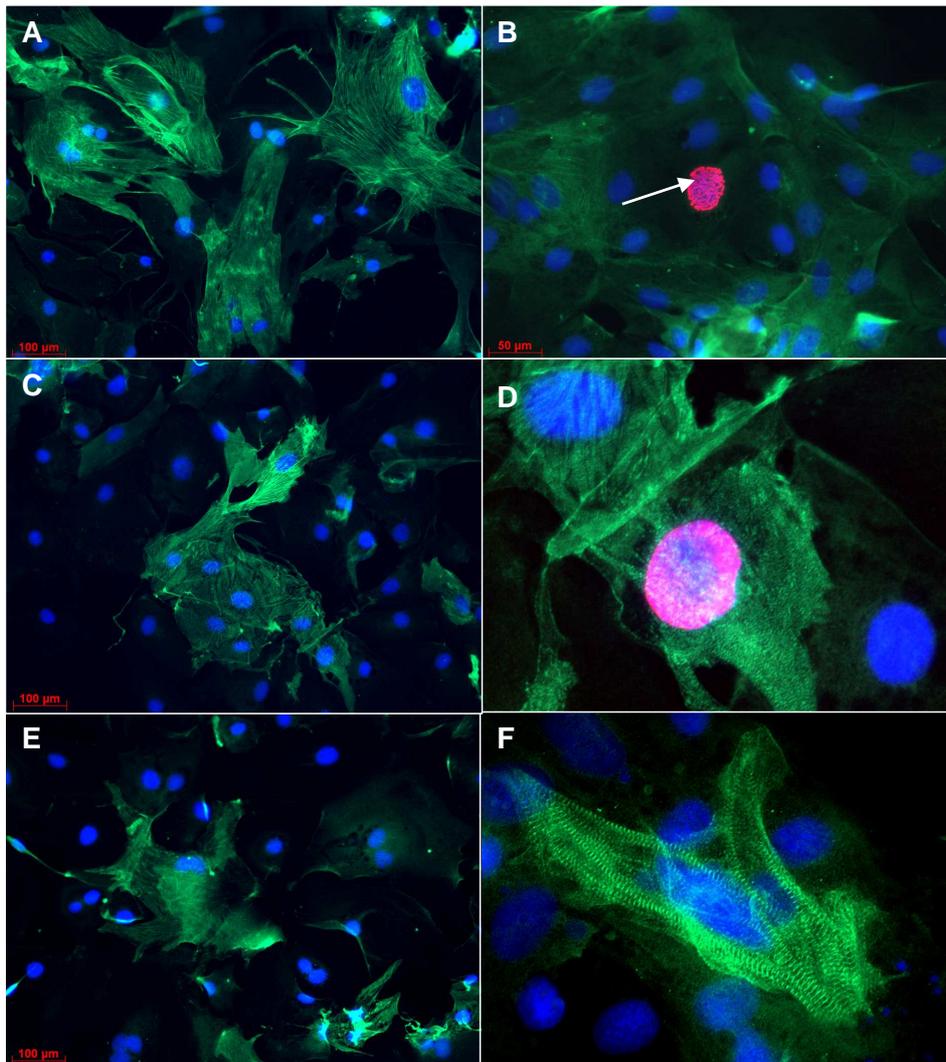


Abb.47: Immunfluoreszenzfärbungen von primären Molchherzzellen in der Passage 5 mit Antikörpern gegen α -Aktinin und phosphoryliertes Histon 3 Immunfluoreszenzen gegen α -Aktinin (grün), gegen phosphoryliertes Histon 3 (rot) und Dapi-Kernfärbung (blau). (A) 10-fache Vergrößerung von primären Herzzellkulturen die nur mit Methanol behandelt wurden. (B) 20-fache Vergrößerung eines P-Histon 3-positiven Zellkerns einer α -Aktinin-negativen Zelle. (C) 10-fache Vergrößerung von primären Herzzellkulturen die mit $10\mu\text{M}$ U0126 behandelt wurden. (D) Vergrößerter Ausschnitt einer 40-fachen Vergrößerung von einem eines P-Histon 3-positiven Zellkerns einer α -Aktinin-positiven Zelle. Der weiße Pfeil markiert den positiven Zellkern und die diffuse α -Aktinin-Färbung. (E) 10-fache Vergrößerung von primären Herzzellkulturen die mit $80\mu\text{M}$ U0126 behandelt wurden. (F) Vergrößerter Ausschnitt einer 40-fachen Vergrößerung von α -Aktinin -positiven Zellen mit Querstreifung durch Anfärbung des α -Aktinins in den Z-Scheiben.

4. Diskussion

Säugetiere sind nicht in der Lage größere Verletzungen des Herzens zu regenerieren. Im Gegensatz dazu besitzen bestimmte Nicht-Säugetier Vertebraten wie der Zebrafisch (*Danio rerio*) oder der Molch (*Notophthalmus viridescens*) die Fähigkeit ihr Herz ohne funktionelle Einbußen zu reparieren. Bei den Säugetieren führt die Reparatur des geschädigten Gewebes vorwiegend zu Fibrosen und Vernarbung. Zebrafische und Molche können hingegen kontraktiles Gewebe durch neugebildetes Myokard mit geringer oder ganz ohne Narbenbildung ersetzen. Ein besseres Verständnis der Mechanismen die der Regeneration zu Grunde liegen stellt eine wichtige Grundlage für eine erfolgreiche Manipulation oder Aktivierung von regenerativen Prozessen im menschlichen Herzen dar.

4.1 Vor- und Nachteile der Verwendung des Molches als Modellorganismus für die Analyse der Herzregeneration

Das breite Spektrum von regenerationsfähigen Organen bzw. Organstrukturen wie den Extremitäten, dem Schwanz, dem Gehirn und dem Rückenmark, den Linsen und der Retina, den Haarzellen des sensorischen Epithels im Innenohr, den Kiefern und dem Herzen machen den adulten Molch zum Champion der Regenerationsfähigkeit. Die Entschlüsselung der der Regenerationsfähigkeit zu Grunde liegenden Mechanismen stellt ein wichtiges und attraktives Forschungsgebiet dar. Die komplizierte und uneffektive Züchtung der Molche unter Laborbedingungen behindern oder verhindern bisher sogar den Einsatz von in anderen Modellorganismen etablierten genetischen Analysen wie die einfache Herstellung von transgenen oder knock-out-Tieren. Darüber hinaus werden die Möglichkeiten standardisierte Versuchsbedingungen innerhalb der einzelnen Versuchstiergruppen anzuwenden dadurch erschwert, dass die in der freien Wildbahn eingefangenen Tiere unterschiedlich alt sind und häufig Pathogene etc. mit in die Versuchstierhaltung einschleppen. Darüber hinaus sind der Lieferumfang und die Lieferzeiten stark von den lokalen Witterungsbedingungen abhängig. Das Geschlecht der Molche kann nur während der Paarungszeit eindeutig unterschieden werden. Methoden zur funktionellen genetischen Analyse sind noch wenig etabliert und das Molchgenom nicht sequenziert. Erst einer Arbeitsgruppe gelang bisher die erfolgreiche Herstellung eines transgenen Molches der Gattung *Cynops pyrrhogaster* zur Untersuchung der Regeneration

der Linse (Ueda et al., 2005). Des Weiteren gibt es nur wenig Sequenzinformationen und spezielle molchspezifische Antikörper. Trotz dieser Hindernisse stellt die Aufklärung der effektiven Regenerationsmechanismen im Molch eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung therapeutisch anwendbarer Strategien für die Regeneration diverser Organe im Menschen dar.

4.2 Vor- und Nachteile der mechanischen Ventrikelschädigung

Da von Molchen bisher keine natürlich auftretende Herzschädigung beschrieben wurde, kann kein solches Krankheitsbild als Vorbild für eine künstliche Schädigungsmethode dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Herzschädigung mittels 15-facher Quetschung des Ventrikels mit feinen Pinzetten erzeugt. Ein Vorteil dieser Methode liegt in der Vermeidung starker Blutungen, wie sie zum Beispiel bei Amputationen der Herzspitze auftreten. Dadurch konnte eine bessere Überlebensrate als bei den initialen Amputationsversuchen erzielt werden. Außerdem blieb bei dieser Methode die äußere Morphologie des Ventrikels erhalten, währenddessen große Teile des innenliegenden Myokards zerstört wurden. Diese Schädigungsmethode wie auch eine partielle Amputation des Ventrikels lässt sich natürlich nicht 1:1 mit dem bei Säugetieren angewendeten Infarktmodell, in dem beispielsweise mittels Ligation bestimmter Koronararterien gezielt ein Infarkt induziert werden kann, vergleichen. Die künstliche Ligation kann den natürlich auftretenden thrombotischen Gefäßverschluss zum Beispiel gut simulieren. Da die Molche keine Koronargefäße besitzen, schied diese Schädigungsmethode für die Analyse der Herzregeneration im Molch aus. Die mechanische Quetschung des Ventrikels im Molch verursacht mehrere auf den gesamten Ventrikel verteilte geschädigte Areale und nicht einen klar begrenzten Wundbereich wie im Fall der Ligation, Kryoschädigung oder Amputation. Dies macht eine genaue Quantifizierung und Lokalisation der Schädigung auf Gewebeschnitten schwierig. Trotzdem ließen sich qualitative Unterschiede im Verlauf der Regeneration gut analysieren. Die Ergebnisse der Westernblotanalysen, die sich jeweils auf Proteinextrakte aus einzelnen Herzen bezogen, haben sich in den meisten Fällen sehr homogen verhalten. Dies spricht für eine gute Reproduzierbarkeit dieser Schädigungsmethode zumindest dann, wenn der komplette Ventrikel in die Analyse miteinbezogen werden kann.

4.3 Mitotisch aktive Kardiomyozyten- ein entscheidender Vorteil von Molchen und Zebrafischen gegenüber Säugetieren ?

Generell stellt die Teilungsfähigkeit von Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Erneuerung von geschädigtem Gewebe dar. Frühe Arbeiten von Oberpriller et al. konnten mittels Autoradiographien nach H³-Thymidininjektionen und elektronenmikroskopischen Analysen bereits zeigen, dass infolge der Amputation kleiner Teile des Atriums zehn Tage bzw. 20 Tage nach partieller Amputation des Ventrikles in den Randzonen der Wunde eine maximale DNS-Syntheserate und Mitoserate innerhalb der Kardiomyozyten beobachtet werden konnte. Die DNS-Syntheserate betrug für Kardiomyozyten in der Randzone des geschädigten Atriums 9,8 % und die Mitoserate betrug 0,2 %. Für die ventrikulären Kardiomyozyten konnten DNS-Syntheseraten von ebenfalls ~ 10% und 0,9 % mitotisch aktive Myozyten ermittelt werden (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974). In einem etwas veränderten Experiment, in dem das amputierte Gewebe der Ventrikelspitze zur Vergrößerung des reaktiven Wundbereichs zunächst zerkleinert und anschließend auf die Wunde zurückgegeben wurde, konnte sich ein kleiner Teil des Herzmuskeltransplantats in die Wunde integrieren. Die stärkste proliferative Aktivität der retransplantierten Kardiomyozyten konnte mit ~24,3 % DNS-Syntheserate und ~ 2,61 % Mitoserate 16 Tage nach der Amputation beobachtet werden (Bader and Oberpriller, 1979).

Ein Fall, in dem Zellteilungen von adulten Säuger-kardiomyozyten dokumentiert werden konnten, stammt von Engel et al. Dieser Gruppe gelang es in adulten Rattenkardiomyozyten mittels chemischer Inhibierung der MAP-Kinase p38 und zusätzlicher Stimulation der Zellkultur mit dem Wachstumsfaktor FGF1 sowohl Karyo-, als auch Zytokinesen zu stimulieren (Engel et al., 2005). Allerdings bleibt dies bei einer Mitoserate von 0,14% unter diesen speziellen Zellkulturbedingungen ein seltenes Ereignis. Das postnatale Rattenherz besteht zwölf Tage nach der Geburt zu ca. 90% aus binukleären Kardiomyozyten (Li et al., 1996). Auch im geschädigten Säugerherz konnten DNS-Synthesen und Kernteilungen detektiert werden (Capasso et al., 1992). Diese resultieren jedoch meistens in der Entstehung von binukleären Zellen, in denen eine vollständige Zytokinese unterblieben ist. Demgegenüber sind embryonale Kardiomyozyten in der Lage sich zu teilen und gleichzeitig die Pumpaktivität des sich entwickelnden Herzens aufrechtzuerhalten. Mittels konfokaler Mikroskopie von dreifach gefärbten primären embryonalen Kardiomyozyten und *whole mount* Kulturen von embryonalen Mäuseherzen

konnte gezeigt werden, dass differenzierte embryonale Kardiomyozyten proliferieren können. Dafür ist jedoch die Deassemblierung von Myofibrillen, den kontraktile Elementen der Kardiomyozyten, notwendig. Diese Deassemblierung beginnt bei den Z-Scheiben und den dünnen Aktinfilamenten und wird dann bei den M-Streifen und dicken Myosinfilamenten fortgesetzt. Nach der Zytokinese reassemblieren die Proteinkomponenten der Myofibrillen wieder (Ahuja et al., 2004). Es herrschen kontroverse Ansichten über die Gründe für die Unfähigkeit von adulten Säuger-kardiomyozyten *in vivo* auf Herzschädigungen mittels vollständigen Zytokinesen reagieren zu können. Ahuja et al. konnten einerseits zwar einen Anstieg der Expression von Proteinen die in den Prozess der Zellteilung involviert sind im adulten hypertrophierten Mäuseherzen beobachten. Andererseits blieben vollständige Zellteilungen jedoch aus, obwohl eben diese Proteine auch im embryonalen Herzen besonders zu den Zeitpunkten, an denen noch Zytokinese stattfindet, stark exprimiert werden. Als mögliche Ursachen für die im adulten Herzen unvollständigen Zellteilungen wurde zum einen das Vorkommen von komplexen, geordneten und funktionellen Sarkomeren im adulten Myokard und zum anderen ineffizientere Abbaumechanismen als die, die in embryonalen, differenzierten Kardiomyozyten die Zellteilung mittels Auflösung der Myofibrillen erleichtern, postuliert (Ahuja et al., 2007).

Eine andere Gruppe untersuchte die Lokalisation von Anillin, einem bekannten Regulator der Spaltungsfurche, in sich vollständig teilenden gegenüber binukleären Rattenkardiomyozyten in Kultur. Sie entdeckten dabei, dass binukleäre Zellen dann entstehen, wenn es zu einer fehlerhaften Fokussierung von Anillin in der Zellteilungsebene kommt (Engel et al., 2006).

Im Gegensatz zu den Kardiomyozyten der Säugetiere, besteht das Amphibienherz hauptsächlich aus diploiden mononukleären Zellkernen (Matz et al., 1998; Oberpriller et al., 1988; Tate et al., 1987). Untersuchungen mittels Time-Lapse-Mikroskopie von primären Kardiomyozytenkulturen des Molches ergaben, dass 80 % der mitotischen, mononukleären Myozyten auch mononukleäre Tochterzellen hervorbrachten (Matz et al., 1998). Diese Beobachtungen und ähnliche Resultate aus weiteren Time-Lapse-Analysen stellen ein wichtiges Indiz dafür dar, dass Kardiomyozyten von Molchen nicht nur die Fähigkeit zur Karyokinese, sondern auch für eine vollständige Zytokinese besitzen.

Für die in dieser Arbeit eingesetzte Schädigung des Ventrikels mittels mechanischer Quetschung, konnte 14 Tage nach Schädigung die höchste Mitoserate innerhalb der Kardiomyozyten ermittelt werden. Diese lag bei $6,6 \pm 1,05$ Mitosen pro mm^2 Gewebe.

Neben den Kardiomyozyten zeigten auch andere Zelltypen, deren Identitäten noch einer genauen Bestimmung bedürfen, 14 Tage nach der Schädigung die stärkste mitotische Aktivität. Auch wenn Kardiomyozyten nicht die am stärksten proliferierende Zellpopulation darstellen, scheinen sie dennoch im Vergleich zu Kardiomyozyten von Säugetieren ein deutlich größeres Potential für erfolgreiche Kernteilungen zu besitzen. Interessant erscheint das häufige Auftreten von Mitosen innerhalb der als trabekel-assoziierten Zellen bezeichneten Zellen, für die leider bisher noch kein geeigneter Marker gefunden werden konnte. Immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen Marker von Endothelzellen wie Tie2 und eNOS blieben bisher erfolglos. Die genaue Charakterisierung dieser Zellen stellt einen wichtigen Schritt für das Verständnis des Regenerationslaufes im Molchherzen dar. Bei diesen könnte es sich zum Einen um „normale“ endokardiale Zellen, oder aber um dedifferenzierte Zellen wie z.B. Kardiomyozyten handeln, die zunächst einen schlauchförmigen „unreifen Trabekel“ bilden.

4.4 Histologische Untersuchungen belegen eine erfolgreiche Regeneration des Molchherzens innerhalb von 12 Wochen

Entgegen der früheren Behauptungen, dass die Herzen von Molchen zwar ein gewisses regeneratives Potenzial besitzen, aber trotzdem die Wunde letztendlich mittels Ausbildung einer Narbe verschlossen wird (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974) resultierte die in dieser Arbeit verwendete Methode der mechanischen Quetschung in einer nahezu kompletten Wiederherstellung der ursprünglichen Morphologie des Ventrikels. Einzig minimale Fibronektinrückstände konnten gelegentlich noch in Herzen 84 Tage nach der Schädigung detektiert werden. Es kam auch bei Anwendung dieser Schädigungsmethode im Verlauf des Regenerationsprozesses zu vermehrten Expressionen von Proteinen, die die Extrazellulären Matrix bilden, wie Kollagen VI und Fibronektin. Die Umgestaltung und Ausdehnung der Extrazellulären Matrix scheint aber im Molchherzen eher vorübergehenden Stützfunktionen zu dienen und ganz im Gegenteil die Neubildung von funktionsfähigem Myokard nicht zu be- oder verhindern. Die bereits sehr kurz nach der Amputation detektierbare Fibronektinexpression im Stumpfblastem suggeriert eine mögliche Funktion des Fibronektins als einem Substrat für die Migration und Akkumulation von

dedifferenzierenden Zellen des Stumpfgewebes (Nace and Tassava, 1995). Eine solche Funktion des Fibronektins wäre auch während der Herzregeneration denkbar.

4.5 Herstellung einer cDNS-Bibliothek und die Analyse differentiell exprimierter Gene

Da die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten im Molch ein wichtiger Vorteil gegenüber den Kardiomyozyten der Säugetiere darstellt, wurde die für die in dieser Arbeit verwendete Schädigungsmethode ermittelte maximale Mitoserate von 14 Tagen nach der Schädigung als ein geeigneter Zeitpunkt für die Herzentnahmen zur Herstellung einer cDNS-Bibliothek angenommen. Auch die Analysen anderer Arbeitsgruppen, die eine Schädigung durch partielle Amputation verursachten, ergaben wie bereits erwähnt, maximale Proliferationsraten innerhalb der ersten 10-20 Tage nach der Schädigung (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974).

Zudem spielen zu diesem Zeitpunkt Inflammation und Nekrose keine so große Rolle mehr. Stattdessen ist die strukturelle Neugestaltung in vollem Gange und die Proliferation der Kardiomyozyten erreicht ihren Höhepunkt. Da sich die geschädigten Herzen sowohl aus geschädigten/ regenerierenden Arealen als auch aus ungeschädigtem, voll intaktem Gewebe zusammensetzte, konnten in der cDNS-Bibliothek sowohl für die Schädigung spezifische Transkripte, als auch Transkripte die in ungeschädigten Herzen exprimiert werden, angereichert werden. Als möglichen Hinweis auf verstärkte Proliferationsaktivität würde man insbesondere eine Deregulation von Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren erwarten. Die Sequenzierung von ca. 10 % der Klone der nicht-normalisierten cDNS-Bibliothek ergab eine Redundanz von ~70 %. Die hohe Redundanz ist ein Indiz für eine präferenzielle Anreicherung von häufig exprimierten Transkripten im Vergleich zu weniger präsenten mRNS, wie denen von Zellzyklusregulatoren und Transkriptionsfaktoren, die unter den Sequenzen kaum vertreten waren.

Würde man eine neue cDNS-Bibliothek generieren wollen, könnte man basierend auf den bisher gewonnen Erkenntnissen effektive Methoden zur Anreicherung von seltenen Transkripten bei gleichzeitiger Subtraktion stark abundanter Transkripte anwenden. Laveder et al. entwickelten beispielsweise eine Strategie zur Herstellung von subtrahierten cDNS-Bibliotheken in der in einem ersten Schritt ein Oligo-dirigierter RNase H-Verdau und in einem zweiten Schritt eine Hybridisierung mit Proben aus einer 3`-Enden EST-Sammlung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit erhalten wurde, durchgeführt wurde. Dadurch

gelang es ihnen die Anreicherung von gewebespezifischen stark abundanten Transkripten wie mitochondrialen RNS etc. stark zu verringern (Laveder et al., 2002). Kommerzielle Hersteller verwenden für die Normalisierung von cDNS-Bibliotheken eine ähnliche Strategie. Hierbei wird basierend auf den unterschiedlichen Hybridisierungskinetiken abundanter und seltener Transkripte eine thermostabile duplexspezifische Nuklease (DSN) verwendet welche selektiv Hybride aus doppelsträngiger cDNS (vorwiegend abundanter Transkripte) zerschneidet. Anschließend werden nur die einzelsträngigen Transkripte amplifiziert (Zhulidov et al., 2004).

4.5.1 Die Analyse differentiell exprimierter Gene ergab große Veränderungen innerhalb der Expression von Transkripten die für Zytoskelettproteine codieren

Die verschiedenen Hybridisierungsexperimente mit den Microarrays ergaben deregulierte Expressionen von Komponenten des Zytoskelettes. Innerhalb der ersten 21 Tage nach der Schädigung des Ventrikels wurden Transkripte mit Homologien zur Myosin-leichte-Kette-Kinase, ventrikulären alkalischen Myosin-Leichten-Kette-1 und Telethonin schwächer exprimiert als in den scheinoperierten Kontrollherzen. Telethonin ist ein Bestandteil der Z-Streifen. Für die sequenzierten Klone mit Homologien zu Desmin, Troponin C, MHC und kardialem Aktin konnte in den ersten zwei Wochen zunächst eine verringerte Expression detektiert werden. Diese stieg jedoch nach 21 Tagen bereits wieder auf ein stärkeres Expressionsniveau als in den Kontrollherzen an. Diese Beobachtungen lassen sich möglicherweise mit elektronenmikroskopischen Analysen von DNS-synthetisierenden proliferierenden Kardiomyozyten vergleichen. Diese werden häufig durch eine geringere Anzahl und kleinere Myofibrillen gekennzeichnet. In mitotischen Kardiomyozyten konnten keine Z-Scheiben beobachtet werden (Bader and Oberpriller, 1979; OBERPRIL.J and OBERPRIL.JC, 1971; Oberpriller and Oberpriller, 1974). Außerdem spiegeln sie die mittels Immunfluoreszenzfärbungen beobachtete vorübergehende Reduktion von Sarkomerproteinen wie Myosin-Schwere-Kette, α -Aktinin und Myomesin wider.

Andere Transkripte mit Homologien zu Zytoskelettproteinen wurden im Gegensatz dazu bereits nach sieben bzw. 14 Tagen wieder stärker exprimiert. Zu dieser Gruppe gehörten Sequenzen mit Homologien zu α -skelettalem Aktin, α -Aktin 2 (Glattmuskel, Aorta) und einem Transkript mit Ähnlichkeit zum Transgelin 2. Diese Proteine gehören nicht

unbedingt zu typischen Markern für reife Kardiomyozyten, sondern könnten unter der Annahme das die Regeneration des Herzens, ähnlich wie die der Extremitäten unter anderem auf Dedifferenzierung und Redifferenzierung beruht, auf neugebildete unreifere oder dedifferenzierte Kardiomyozyten hinweisen.

4.5.2 Zunahme der Expression von glattemuskelspezifischen Proteinen

Auffällig erscheint die Zunahme der Expression von glattemuskelspezifischen Transkripten wie α -Aktin 2 und Transgelin 2 im Falle der Chiphybridisierungen, sowie die ansteigende Expression von α -Glattemuskellaktin und Caldesmon bei den Immunfluoreszenzfärbungen. Außerdem wies die Mehrzahl der Signale bei der Hybridisierung der Koloniefilter mit markierten, im regenerierenden Herzen angereicherten Transkripten als cDNS-Sonde Homologien zu der Myosin-regulatorischen-leichten-Kette des Glattemuskels auf. Auch RT-PCRs mit spezifischen Oligonukleotiden gegen die cDNS von Myosin-regulatorischen-leichten-Kette des Glattemuskels zeigten nur eine Expression im geschädigten Herzen und in der aus Magen generierten cDNS.

Eine Expression von Glattemuskelpoteinen wie dem α -Glattemuskellaktin konnte beispielsweise auch im sich entwickelnden Mäuseherzen etwa 9,5 Tage p.c. beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die anderen im Säugetier bekannten Aktinisoformen, das α -skelettale und α -kardiale Aktin, im sich entwickelnden Herzen präsent. Die Expression von α -Glattemuskellaktin nahm ab E 17 p.c. wieder ab und konnte zwei Wochen nach der Geburt nur noch in Glattemuskelnzellen der Gefäße detektiert werden (Clement et al., 2007). Ähnliche Beobachtungen konnten auch im pränatalen Rattenherz gemacht werden (Ya et al., 1997). Bei der Entwicklung des Hühnerherzens wurde die Expression von α -Glattemuskellaktin vor der Expression des α -skelettalen Aktins detektiert und im weiteren Verlauf gemeinsam mit diesem in sich entwickelnden Sarkomeren exprimiert. Im Verlauf der Herzentwicklung beschränkte sich die Expression des α -Glattemuskellaktins dann auf den Ausflusstrakt (Sugi and Lough, 1992). *In vitro* Experimente mit Embryonalen Stammzellen zeigten, dass eine Intervention oder Suppression der α -Glattemuskellaktinexpression die kardiale ES-Zelldifferenzierung beeinträchtigt (Clement et al., 2007). Primäre adulte Rattenkardiomyozyten machen während ihrer Kultivierung große morphologische Veränderungen durch, die unter anderem von dem Abbau und der Regeneration des Kontraktionsapparates begleitet

werden. Die adulten Kardiomyozyten exprimieren mit zunehmender Zeit, in der sie kultiviert werden, in einer zunehmenden Anzahl der Kardiomyozyten α -Glattmuskelaktin. Dabei ist die Expression hauptsächlich in stressfaserähnlichen Strukturen an Stelle von Myofibrillen zu finden (Eppenberger-Eberhardt et al., 1990). Diese Beobachtungen deuten auf eine besondere Rolle von Glattmuskelproteinen während der Entwicklung und Regeneration von Kardiomyozyten hin. Für die Regeneration des Molchherzens scheinen sie ebenfalls von Bedeutung zu sein, da Glattmuskelproteine und Transkripte der entsprechenden Gene wie bereits erwähnt in verschiedenen Experimenten stark exprimiert wurden. Dabei spiegelt die Expression keine Neoangiogenese im regenerierenden Molchherzen wider, da der Molch im Herzen keine Blutgefäße besitzt (Dr. Sawa Kostin, persönliche Mitteilung). Ähnlich wie für die Herzentwicklung vermutet (Sugi and Lough, 1992), könnten die α -Glattmuskelaktin Filamente auch während der Herzregeneration im Molch als eine Art Gerüst für die Deposition der skelettalen und kardialen Filamente dienen und oder die Kontraktilität der Kardiomyozyten regulieren. In den Immunfluoreszenzfärbungen konnte die Expression von α -Glattmuskelaktin sowohl in Bereichen, die auch für Myosin-Schwere-Kette und Myomesin (Daten nicht gezeigt) positiv waren als auch in Regionen, die für diese Muskelmarker negativ waren, detektiert werden.

4.5.3 Zunahme der Expression von HSP-27 im regenerierenden Molchherzen

Des Weiteren wurde das Hitzeschockprotein HSP-27 21 Tage nach der Schädigung stark exprimiert. Die Expression von Hitzeschockproteinen werden vor allem durch Stressfaktoren wie oxidativen/ischämischen Stress, Inflammation u.ä induziert. Sie verhindern als molekulare Chaperone fehlerhafte Faltungen und unterstützen die Reparatur oder den Abbau nicht-nativer Proteine. Für verschiedene Hitzeschockproteine konnten schon kardioprotektive Effekte in Bezug auf Zellüberleben und Zelladaptation beobachtet werden (Benjamin and McMillan, 1998). Die transgene Überexpression von HSP-27 in einem mittels Doxorubicin induzierten Herzscheidigungsmodell der Maus führte zu verbesserten Überlebenschancen, verminderten Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies, verringerten Apoptoseraten und morphologischen Veränderungen in den Mitochondrien (Liu et al., 2007). Darüber hinaus konnten Makino et al. in einem chemischen Mutagenese-Screening nach Flossenregenerationsmutanten im Zebrafisch eine

Mutation in einem anderen Hitzeschockprotein dem HSP-60 als den maßgeblichen Defekt für eine fehlerhafte Bildung des Regenerationsblastems identifizieren. Die HSP-60 Mutanten wiesen außerdem einen Regenerationsdefekt im Herzen auf (Makino et al., 2005). Auch das HSP27 des Zebrafisches konnte bereits kloniert werden und entsprechende Transkripte dieses Gens kommen am häufigsten im adulten Skelettmuskel und im Herzen vor (Mao et al., 2005). Die bereits bekannten Eigenschaften des HSP-27 könnten auch bei der Regeneration im Herzen des Molches eine Rolle spielen. Warum die vermehrte Expression allerdings erst nach 21d zu beobachten war, bleibt noch zu klären. Denn im Fall des mutierten *hsp60*-Gens im Zebrafisch scheint eine Beteiligung dieses Hitzeschockproteins in einem sehr frühen Stadium der Blastembildung essenziell zu sein.

4.5.4 Zunahme der Expression von Thymosin β 4 im regenerierenden Molchherzen

Ein weiterer Faktor dessen mRNA- und Proteinexpression im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist das Peptid Thymosin β 4. Eine seiner Funktionen besteht darin, globuläres Aktin (G-Aktin) zu binden und somit dessen Polymerisation zu filamentösem Aktin (F-Aktin) zu verhindern. Die Genexpressionsanalyse ergab einen kontinuierlichen Anstieg der Expression von sieben bis 21 Tage nach der Herzscheidung. Auch *in situ* Hybridisierungen auf transversalen Herzschnitten 14 Tage nach der Schädigung zeigten eine Anfärbung sowohl in geschädigten Regionen, als auch in ungeschädigten Bereichen. Keine Thymosin β 4-mRNA konnte hingegen im scheinoperierten Herzen nachgewiesen werden. Auf Proteinebene konnte ebenfalls eine Zunahme der Thymosin β 4 Expression im Verlauf der Regeneration beobachtet werden. Dabei konnte das Peptid teilweise auch im Zellkern detektiert werden und eine gewisse basale Proteinexpression konnte im scheinoperierten Herzen beobachtet werden.

Interessant ist die Expression von Thymosin β 4 im regenerierenden Molchherzen, da Thymosin β 4 auch im regenerierenden Zebrafischherzen drei und sieben Tage nach Amputation der Herzspitze in der Wunde und im angrenzenden Myokard detektiert werden konnte (Lien et al., 2006). In *in vitro* Versuchen mit murinen embryonalen Herzexplantaten führte die Zugabe von Thymosin β 4 zur Migration von Muskelaktin-positiven schlagenden Zellen aus dem Explantat. In Kulturen von neonatalen Rattenkardiomyozyten führte Thymosin β 4 ebenfalls zu erhöhter Migration und zu längerem Überleben in der Kultur. Auch im Fall der Regeneration des Molchherzens wäre

ein Einfluss von Thymosin β 4 auf die zelluläre Beweglichkeit vorstellbar. Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von Thymosin β 4 neben seiner bereits bekannten Aktinbindung ergab eine Affinität zu den Proteinen PINCH und ILK. Diese sind ihrerseits Komponenten eines größeren Komplexes, der in Interaktionen zwischen Zellen und Extrazellulärer Matrix involviert ist und unter dem Namen Fokaler-Adhäsions-Komplex bekannt ist (Bock-Marquette et al., 2004). PINCH und ILK unterstützen die Phosphorylierung der Serin-/Threonin Kinase Akt und spielen wie Akt eine zentrale Rolle in verschiedenen Signaltransduktionswegen, die für Zellwachstum, Zellbeweglichkeit und Zellüberleben verantwortlich sind (Fukuda et al., 2003). Neben den positiven Effekten von Thymosin β 4 *in vitro*, führte auch die intrakardiale und oder intraperitoneale Injektion von Thymosin β 4 in infizierte Mäuseherzen zu einer verringerten Narbenbildung, besseren echokardiografischen Messwerten für die Ejektionsfraktion (EF) und die systolische Druckmesserverkürzung (fractional shortening, FS). Darüber hinaus konnte die Zelltodrate 24 Stunden nach der Ligation erfolgreich gesenkt werden (Bock-Marquette et al., 2004). Thymosin β 4 ist ein sowohl im Säugetierherz als auch im Zebrafisch- und Molchherzen vorkommendes Peptid, welches über ein großes Potenzial für die Unterstützung der Herzregeneration verfügt. Dieses in verschiedenen Organismen natürlich vorkommende Peptid hat im geschädigten Säugerherzen positive Wirkungen. Diese positiven Effekte von Thymosin β 4 sind im Säugerherzen scheinbar nicht ausreichend, um eine effektive Herzregeneration, wie sie im Zebrafisch und im Molch möglich ist, zu bewirken. Auch in den beiden zuletzt genannten Organismen ist Thymosin β 4 ein Faktor unter vielen verschiedenen, der zu einer erfolgreichen Regeneration beitragen kann. Dennoch gibt das Auftreten des gleichen Peptids in regenerationskompetenten und –inkompetenten Organismen Anhaltspunkte dafür, dass Faktoren die während der Regeneration in Amphibien und im Zebrafisch eine Rolle spielen auch im Säugetier vorkommen und es sich scheinbar nicht um Faktoren handelt, die im Säugerorganismus überhaupt nicht gebildet werden. Nun gilt es die Mechanismen aufzuklären die dafür verantwortlich sind, dass das Potenzial solcher Faktoren nicht für eine vergleichbar effektive Regeneration im Säugetier ausreicht. Durch Thymosin β 4-Injektionen konnten wie bereits erwähnt schon positive Effekte erzielt werden. Experimente in denen die Thymosin β 4-Aktivität erfolgreich im Molchherzen geblockt werden kann, könnten Aufschluss über die genaue Funktion und Bedeutung dieses Peptids für die erfolgreiche Regeneration im Molchherzen geben.

4.6 Analyse der Subtraktionsklone

4.6.1 Dominanz der Expression der zu der glattmuskelspezifischen Myosin-regulatorischen-leichten-Kette homologen cDNS während der Macroarray-Hybridisierungen

Die starke Präsenz der Sequenz für die glattmuskelspezifische Myosin-regulatorische-leichte- Kette unter den Subtraktionsklonen (75 %) lässt sich zum einen anhand der starken Redundanz innerhalb der nichtnormalisierten cDNS-Bibliothek erklären. Das es sich bei dem identifizierten Transkript um einen falsch positiven, nicht subtrahierten Klon handeln könnte, widerlegen die Ergebnisse der RT-PCRs und der *in situ* Hybridisierungen. Hier konnte nur ein Produkt auf cDNS von geschädigten Herzen bzw. aus Magengewebe amplifiziert werden. Auch die *in situ* Hybridisierungen ergaben eine eindeutige differentielle Expression. Zum anderen könnten dieser Umstand wie auch die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen mit für andere Glattmuskelproteine spezifischen Antikörpern einen weiteren Hinweis auf die strukturellen Veränderungen der Molchkardiomyozyten während der Regeneration darstellen. Diese Veränderungen spielen möglicherweise eine entscheidende Rolle für die besondere Proliferationsfähigkeit und De- bzw. Redifferenzierungsfähigkeit der Kardiomyozyten des Molches.

4.6.2 Entstehung verschiedener Expressionsmuster bei den *in situ* Hybridisierungen mit den Subtraktionsklonen TB14 und TB25

Wie bereits erwähnt erfolgte die Herstellung der RNS-Proben für die *in situ* Hybridisierungen unter Einbeziehung der gesamten cDNS-Sequenz und nicht nur der homologen Regionen. Daher könnte die Hybridbildung theoretisch auch die Expression eines anderen Genes widerspiegeln. Die großflächigen, myokardialen Expression der Klone TB 14 und TB 25 scheinen die Expression der Myosin-regulatorischen-leichten-Kette bzw. des Fhl1-Gens widerzuspiegeln, wenn man diese beispielsweise mit der Proteinexpression von α -Glattmuskelaktin bzw. der beschriebenen Expression von Fhl1 vergleicht (Chu et al., 2000). Die unterschiedlichen Expressionsmuster lassen sich möglicherweise auch durch unterschiedliche Ausmaße der Herzschädigungen bzw. des zeitlichen Ablaufs des Regenerationsprozesses erklären. Die großflächige Expression von TB14 könnte beispielsweise eine Antwort auf die stärkere mechanische Beanspruchung

des geschädigten Myokards bei gleichzeitiger Erneuerung mittels Proliferation darstellen. Um welche Zelltypen es sich genau bei den positiven Signalen in distinkten geschädigten Arealen handelt, bedarf der weiteren Aufklärung.

4.6.3 *In situ* Hybridisierungen mit dem β -Aktin homologen Subtraktionsklon TB10

Vorausgesetzt die von dem Subtraktionsklon abgeleitete antisense RNS-Probe hybridisiert mit dem zu den zellulären β -Aktin Transkripten homologen Bereich, könnte die differentielle Expression in geschädigten und ungeschädigten Arealen des Ventrikels 14 Tage nach Schädigung des Herzens dem von anderen ebenfalls in zwei myokardialen Schädigungsmodellen beobachteten Anstieg der β -Aktin-Expression entsprechen (Carlyle et al., 1996). β -Aktin ist ein Protein des Zytoskelettes, das einen potenziellen Mediator für das Wachstum, die Signalweiterleitung und Wanderung sowie Umstrukturierungsprozesse von Zellen darstellt. β -Aktin wird hauptsächlich in Nichtmuskelzellen exprimiert. Die Veränderungen der β -Aktin-Expression begleiten möglicherweise die strukturellen Veränderungen die in Folge einer Schädigung des Myokards auftreten. Die Untersuchung der Lokalisation der veränderten β -Aktin-Expression im geschädigten Hundemyokard ergab eine innerhalb von 24 Stunden einsetzende und bis zu 90 Tagen anhaltende β -Aktin-Expression im myokardialen Interstitium. Dabei kolokalisiert β -Aktin mit dem Endothelzellmarker von Willebrand-Faktor (Tian et al., 1999). Die genaue Lokalisation der β -Aktin-Expression im geschädigten Molchherzen waren im Rahmen der *in situ* Hybridisierungen nicht möglich. Der Anstieg der Expression von Nichtmuskel-Proteinen im Molchherzen könnte auch ein weiteres Indiz für Dedifferenzierungsprozesse der Kardiomyozyten darstellen. Einzelfärbungen mit einem anti- β -Aktin Antikörper mittels DAB-Färbungen 14 Tage nach Herzschädigung ergaben eine positive Färbung in der Peripherie der einzelnen Trabekel (Daten nicht gezeigt). Somit könnte es sich auch um endokardiale, Trabekel-assoziierte Zellen handeln.

4.6.4 Distinkte Expression des NADH-Dehydrogenase Homologs TB8 ?

Da es sich bei der NADH-Dehydrogenase um ein wichtiges mitochondriales ubiquitär vorkommendes Enzym der Atmungskette handelt, könnte man in Folge der Herzschädigung einen allgemeinen Anstieg der Genexpression von Komponenten des zellulären Metabolismus annehmen. Eine derart spezifische und regional begrenzte Expression erscheint jedoch eher unwahrscheinlich. Aufgrund der Beschaffenheit der *in situ* Proben ist die Detektion einer anderen unbekanntenen mRNS, die nicht für die NADH-Dehydrogenase codiert, durchaus möglich und könnte das beobachtete Expressionsmuster erklären.

4.7 Das regenerationsassoziierte Antigen 22/18 und Zytokeratin 18 werden auch im regenerierenden Herzen exprimiert

Das regenerationsassoziierte Antigen 22/18 und Zytokeratin 18 sind Marker, deren Expressionen bisher vor allem während der Extremitäten- und Schwanzregeneration untersucht worden sind. Beide Antigene konnten im Rahmen dieser Arbeit auch im regenerierenden Herzen detektiert werden. Diese Umstände weisen auf mögliche Parallelen zwischen der Extremitäten- und Schwanzregeneration sowie der Herzregeneration hin. Eine solche Parallele könnte z.B. die Fähigkeit von terminal differenzierten Zellen im geschädigten Gewebe zu dedifferenzieren und anschließend entweder zu transdifferenzieren oder zu redifferenzieren sein.

Der monoklonale Antikörper 22/18 ist durch Immunisierung einer Maus mit Zellen aus einem "mid-bud" Blastem des Molches isoliert worden. Der Antikörper färbt vor allem Zellen innerhalb des Stumpfblastems, beginnend 4 Tage nach Amputation. Nach zehn Tagen ist ein großer Teil der Blastemzellen positiv für 22/18. Anschließend nimmt die Färbung sukzessive wieder ab. 14 Tage nach der Amputation konnten im Stumpf auch Zellen detektiert werden, die sowohl für den Antikörper 22/18, als auch für einen zweiten Antikörper 12/102, der spezifisch für den adulten Skelettmuskel des Molches ist, positiv waren (Kintner and Brockes, 1984). Das detektierte Antigen ist intrazellulär und filamentös. Auch in Zellkulturen aus verschiedenen Geweben des Molches, wie aus dem Stumpfblastem, dem Herzen und der Leber wurde dieses Antigen in verschiedenem Ausmaß exprimiert. (Ferretti and Brockes, 1988; Ferretti and Brockes, 1990). Darüber

hinaus resultierte die Transplantation markierter Kardiomyozyten in regenerierende Extremitäten in der Abnahme von Kardiomyozytenmarkern und Zunahme der 22/18 Expression (Laube et al., 2006).

Die Expression des regenerations-assoziierten Antigens 22/18 konnte im Rahmen dieser Arbeit vier, sieben, vierzehn und 21 Tage nach der mechanischen Schädigung innerhalb des Ventrikels detektiert werden. Dabei nahm die Expressionsstärke im Verlauf der Regeneration zu.

Keratine sind Intermediärfilamentproteine und im herkömmlichen Sinne Marker für die epitheliale Differenzierung. In niedrigeren Organismen findet man diese aber auch in nicht epithelialen Zellen vorwiegend in mesenchymalen Vorläuferzellen während der Regeneration von Organstrukturen. Die Expression von Zytokeratin 18 konnte bereits nach drei bis fünf Tagen im Stumpfblastem des Molches nachgewiesen werden. Experimente mit antisense Oligonukleotiden gegen Zytokeratin 18 in kultivierten Blastenzellen deuteten darauf hin, dass Zytokeratin 18 möglicherweise dem Erhalt des undifferenzierten, proliferationsaktiven Status der mesenchymalen Vorläuferzellen dient (Corcoran and Ferretti, 1997). Ferretti et al. haben unter anderem auch die Expression von Zytokeratin 18 in regenerierenden Ober- und Unterkiefern im Molch untersucht und konnten sowohl Zytokeratin 18 Transkripte, als auch Zytokeratin 18-Proteine in Blastenzellen detektieren (Ferretti and Ghosh, 1997). Während der Entwicklung des urodelen Nervensystems und während der Regeneration nach Amputation des Schwanzes konnten Expressionen von Zytokeratin 18 in dem regenerierenden ependymalen Schlauch beobachtet werden (Walder et al., 2003). Nicht nur in verschiedenen Organen des Molches sondern auch im Zebrafisch konnten Zytokeratinexpressionen detektiert werden. So tauchten in einem Screening nach Genen, die während der Flossenregeneration differentiell exprimiert werden auch diverse Zytokeratine auf. *In situ* Hybridisierungen mit antisense Proben gegen Zytokeratin 18 detektierten sowohl in Embryonen und Larven als auch ein Tag und 4 Tage nach der Flossenamputation Zytokeratin 18 (Padhi et al., 2004). Unter Verwendung der Methode des Differential Display zur Identifizierung weiterer differentiell exprimierter Transkripte, konnte eine Sequenz isoliert werden die Homologien zu den Keratinen 8 , 18, und 19 aufwies, wobei die Übereinstimmung mit dem Keratin 18 verschiedener Spezies am größten war (Dr. Rene Zimmermann, persönliche Mitteilung). Die klonierte cDNS diente als Grundlage für die Herstellung der Proben für die *in situ* Hybridisierungen und die Ableitung von Oligonukleotiden für RT-PCRs. Zytokeratin 18-mRNS konnte mittels *in situ* Hybridisierungen nur im regenerierenden Herzen 14 Tage nach der Schädigung

detektiert werden. Positive Signale traten besonders stark im Epikard aber auch innerhalb einiger Trabekel auf. Im scheinoperierten Herzen konnten dagegen keine Zytokeratin 18-Transkripte nachgewiesen werden. RT-PCRs mit spezifischen Oligonukleotiden ergaben nach 35 Zyklen nur ein Produkt auf cDNS aus Herzen 14 Tage nach Schädigung. Starke Expression konnten zudem im ungeschädigten Skelettmuskel und Magen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die genaue Funktion dieser beiden filamentösen „Regenerationsmarker“ lässt sich anhand der Expressionsdaten noch nicht bestimmen und bedarf weiterer funktioneller Analysen. Die überlappenden Expressionen in verschiedenen regenerationsfähigen Organen weisen aber auf die Existenz von zumindest partiell ähnlichen Regenerationsmechanismen hin.

4.8 Aktivierung verschiedener Signalkaskaden kurze Zeit nach Schädigung des Ventrikels

Innerhalb der ersten zwei Stunden nach der Schädigung konnten Veränderungen des Phosphorylierungsstatus verschiedener Enzymkinasen, die Bestandteile wichtiger Signalwege sind, beobachtet werden. So wurden die MAP-Kinase p38, die JNK/SAPK, die Kinase Akt und die MEK1/2 Kinase sowie deren Zielenzyme Erk1/2 und p-90RSK in geschädigten Herzen im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollherzen durch verstärkte Phosphorylierungen aktiviert. Die Aktivierung eben dieser Kinasen war zu erwarten, da sie entweder in zelluläre Stress- und Zytokinantwort (p-38 und JNK/SAPK) und oder Zellwachstums und Zelldifferenzierungsprozesse (MEK, Erk, p90RSK) bzw. in diverse andere Signalwege die unter anderem eine entscheidende Rolle für das Gleichgewicht zwischen Apoptose und Zellüberleben spielen (Akt) involviert sind.

4.9 Einfluss des MEK1/2 Inhibitors U0126 auf die Proteinexpressionen und Phosphorylierungen verschiedener Enzyme

Aufgrund der eindeutigen Aktivierung der Kinasen MEK, Erk und p90RSK innerhalb der ersten zwei Stunden nach Herzschädigung sollten im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen der Inhibition dieses Signalweges untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 20µg pro g Körpergewicht des chemischen Inhibitors U0126 eine effektive Hemmung der Phosphorylierung von MEK und Erk 10 min nach der

Herzschädigung hervorruft. Diese blieb im Fall der Erk auch noch 30 min nach der Schädigung bestehen und wirkte sich auf die p90-RSK gleichermaßen aus.

4.9.1 Stärkere Aktivierung der Akt-Kinase nach U0126 Injektion in geschädigte Herzen

In Folge der Inhibition von MEK1/2 konnte eine stärkere Aktivierung der Akt, nicht aber der p 38 MAP-Kinase 30 min nach der Schädigung detektiert werden. Da Stresssignale und Wachstumsfaktoren verschiedene Signalkaskaden aktivieren können und es teilweise zu Überlappungen zwischen einzelnen Signalwegen und Substratproteinen kommen kann, könnte die Akt möglicherweise die Inhibition von MEK1/2 teilweise kompensieren. Allerdings zeigten die bisher analysierten Substratproteine des Akt-Signalweges und/ oder des MEK/Erk-Signalweges keine eindeutige Deregulation im Vergleich zu den mit Lösungsmittel behandelten Kontrollherzen. Nur das 4EBP-1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1) scheint 30 min nach der Herzschädigung in den mit U0126 behandelten Herzen an den Threoninresten 37/46 stärker phosphoryliert worden zu sein. Diese Phosphorylierungen begünstigen nachfolgende weitere Phosphorylierungen die letztlich zum Start der Translation führen. Ob ein früherer Translationsstart im Herzen eine schnellere Regeneration ermöglicht oder eher schädliche Auswirkungen hat, lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht ableiten.

4.9.2 Zunahme der MyHC-Expression nach U0126 Behandlung

Die Analyse späterer Zeitpunkte nach der Herzschädigung ergab einen Anstieg der Myosin-Schwere-Kette-Expression in den mit dem Inhibitor behandelten Herzen. Sieben Tage nach der Herzschädigung war dieser Unterschied nicht mehr erkennbar. Nach vierzehn Tagen hatte sich das Verhältnis umgekehrt. Während die Myosin-Schwere-Kette-Expression in den mit dem Inhibitor behandelten Herzen 14 Tage nach Herzschädigung das Expressionsniveau der ungeschädigten Kontrollherzen erreicht hatte, zeigten die mit Lösungsmittel behandelten Herzen eine deutlich stärkere Expression. Die ebenfalls untersuchte Expression des Troponin T hat den Expressionsverlauf der Myosin-Schwere-Kette nicht widerspiegelt. Diese Beobachtungen könnten auf eine beschleunigte Regeneration und Redifferenzierung der Kardiomyozyten hinweisen. In Bezug auf die

Analyse der Expression von Proliferationsmarkern wie dem phosphorylierten Histon 3 und PCNA konnte die bei der Auszählung der Mitosen generell ermittelte Tendenz, dass die Proliferationsrate im Verlauf der Regeneration zunimmt und vierzehn Tage nach der Herzschädigung am höchsten ist, reproduziert werden. Zwischen den beiden Versuchsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

Eine mögliche Erklärung für die Detektion der unterschiedlichen Mengen des Proteins Myosin-Schwere-Kette nach vier und 14 Tagen nach Herzschädigung könnte ein veränderter Ablauf der Umbauprozesse des Zytoskelettes, die im Rahmen der Regeneration stattfinden, darstellen. Aus diesem Grund wurde die Expression zweier bekannter Aktin-Depolymerisationsfaktoren im Verlauf der Regeneration und der U0126-Behandlung untersucht. Ab dem vierten Tag nach der Herzschädigung stieg die Proteinexpression von Cofilin und Destrin in den geschädigten mit Lösungsmittel behandelten Kontrollherzen leicht an und verstärkte sich innerhalb der untersuchten 14 Tage Herzproben. Die mit dem MEK1/2-Inhibitor behandelten Herzen hatten vier Tage nach Herzschädigung ein ähnlich niedriges Expressionsniveau wie die ungeschädigten Kontrollherzen. In den Inhibitor-injizierten Herzen stieg die Expression nach sieben bzw. 14 Tagen deutlich an, ohne sich jedoch von den geschädigten mit Lösungsmittel behandelten Kontrollherzen zu unterscheiden. Diese Ergebnisse lassen sich auf Grund der nur sehr moderaten Unterschiede vorsichtig ebenfalls in Richtung einer veränderten Dynamik der Regeneration interpretieren.

4.9.3 Die transienten oder kontinuierlichen Injektionen von U0126 haben keinen signifikanten Einfluss auf nachfolgende Phosphorylierungen oder Proteinexpressionen

Die durch den Inhibitor ausgelöste verringerte Phosphorylierung der MEK1/2 und der Erk1/2-Kinase erfolgte nur kurz nach der Herzschädigung und blieb nicht einmal 24 Stunden bestehen. Auch die täglichen Injektionen konnten keine detektierbare Hemmung der Zielkinasen auslösen. Die Erk-Kinase war 14 Tage nach der Herzschädigung noch etwas stärker aktiviert als in den ungeschädigten Kontrollherzen. Beim Vergleich der Auswirkungen der transienten (4-tägige) Inhibitorinjektion mit der kontinuierlichen (14-tägigen) Inhibitorinjektion konnten keine signifikanten Unterschiede der Proteinexpressionen des MyHC und P-Histon 3 detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Aktivierung oder auch Inaktivierung innerhalb eines kurzen

Zeitfensters nach der Herzschädigung vermutlich ausreichend ist, um weitere Zielproteine zu aktivieren bzw. nicht zu aktivieren. Die Auswirkungen der Aktivierung oder Inaktivierung dieses Signalweges lassen sich teilweise erst zu späteren Zeitpunkten nachweisen.

4.9.4 *In vitro* Analyse des Effektes von U0126 auf kardiale Molchzellen

Die *in vitro* Versuche mit Herzzellen aus ungeschädigten Ventrikeln aus der 5. Passage ergaben eine wie auch in anderen *in vitro* Experimenten beschriebene Hemmung der Differenzierung bzw. Begünstigung der Dedifferenzierung und Inhibition der Proliferation.

Bei geringeren Inhibitorkonzentrationen reagierten α -Aktinin positive Zellen sensitiver als α -Aktinin negative Zellen. Dieser Umstand könnte der weniger sensitiven Zellpopulation, die noch einer genaueren Charakterisierung bedarf, möglicherweise einen selektiven Vorteil verschaffen wenn die Inhibitorkonzentration nicht so hoch ist, dass alle Zelltypen gleichermaßen gehemmt werden.

Andere Forscher haben die Rolle von MEK und Erk gezielt während Differenzierungsprozessen untersucht. Dabei verhinderte die Hemmung von MEK durch den Inhibitor U0126 in *in vitro* Differenzierungsassays mit Embryonalen Stammzellen die Differenzierung zu Kardiomyozyten (Dell'Era et al., 2003), oder verminderte die neuronale Differenzierung bei gleichzeitiger Erhöhung der Aktivität der Caspase-3 (Li et al., 2006).

Neben den bereits erwähnten Differenzierungsprozessen spielt der Erk-MAP-Kinase Signalweg auch in Transdifferenzierungsprozessen, wie sie im Verlauf der Regeneration auftreten können, eine wichtige Rolle. So können zum Beispiel die pigmentierten Epithelzellen der Retina (RPE) in alle Zelltypen, die die neurale Retina zusammensetzen, transdifferenzieren. Organkulturen bestehend aus RPE- Zellen und mittels einem Membranfilter abgetrennter Aderhaut sind für die Proliferation und Differenzierung der RPE Zellen in Neuronen ausreichend, da diffusible Faktoren aus der Aderhaut für die Transdifferenzierung der RPE-Zellen verantwortlich zu sein scheinen und deshalb direkter Zellkontakt notwendig ist. Die Transdifferenzierung konnte durch Zusatz von U0126 verhindert werden. Der Effekt des U0126 war reversibel (Mitsuda et al., 2005).

Die Aktivierung des Erk-MAP-Kinase Signalweges wird auch mit Zellüberlebens- und Zellschutzmechanismen in Verbindung gebracht. Die chronische Aktivierung dieses

Signalweges könnte daher eine sinnvolle therapeutische Strategie darstellen. Badrian et al. untersuchten die Wirkung einer konstitutiv aktivierten Form von MEK auf neonatale Rattenmyozyten unter Bedingungen des Glukoseentzugs. Die Überexpression konnte die Anzahl der in Folge des Glukoseentzugs absterbenden Kardiomyozyten halbieren. Bei der Suche nach potenziellen Enzymen, die zelluläre Schutzfunktion gegen eine Reihe von Stressfaktoren übernehmen können, sind u.a. antioxidierende Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD) untersucht worden. Paradoxe Weise führte jedoch die MEK-Überexpression fast zu einer Halbierung der SOD-Aktivität *in vitro*. Die Inkubation mit dem Superoxiderzeuger Menadione bei gleichzeitiger MEK-Überexpression führte zu der erwarteten Zunahme des Zelltodes und konnte durch vorherige Inkubation mit dem MEK-Inhibitor U0126 gehemmt werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die Aktivierung des MEK-Erk-Signalweges in Abhängigkeit von der Art des einwirkenden Stresses ein verbessertes oder vermindertes Zellüberleben bewirken kann (Badrian et al., 2006). Die antiapoptotischen und zellschützenden Effekten des Insulin-Wachstumsfaktors $\beta 1$ (Mehrfhof et al., 2001), des Cardiotrophins-1 (Sheng et al., 1997), des Urocortins (Brar et al., 2000) und des extrazellulären Proteins S100A (Most et al., 2003) im Herzen oder in Kardiomyozytenkulturen hängen unter anderem von der Aktivierung des Erk-Signalweges ab. In diesen Fällen verhinderte die pharmakologische Inhibition der Erk-Aktivität mit den Inhibitoren U0126 oder PD98059 die schützende Wirkung der oben genannten Faktoren. Des Weiteren resultierte die Hemmung von Erk mit dem Inhibitor PD98059 kurz vor der experimentellen Induktion von Ischämie und anschließender Reperfusion im Herzen in einer stärkeren kardialen Verletzung (Yue et al., 2000). Die herzspezifische transgene Überexpression von MEK1 führte zur Bildung einer kompensatorischen, physiologischen Herzhypertrophie und verbesserten Herzfunktionen sowie einer partiellen Resistenz gegenüber Apoptosen (Bueno et al., 2000).

Andere Experimente konnten wiederum zeigen, dass die Aktivierung des Erk-Signalweges nicht immer positive Effekte hervorruft, sondern je nach äußerem Stimulus kann auch eine gezielte Inaktivierung dieses Signalweges nützlich sein. So führte zum Beispiel die Vorbehandlung von Mäusen mit dem MEK-Inhibitor U0126 vor der Verabreichung des Chemotherapeutikums Cisplatin, das in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis nephrotoxisch wirkt, zu verminderten Nierenschäden durch Verringerung der Inflammation und Apoptose. Dabei konnte nach der Inhibitorbehandlung eine verringerte TNF α -Genexpression und eine verringerte Caspase-3 Aktivität beobachtet werden (Jo et al., 2005). Vorbehandlungen von Versuchstieren mit einem MEK-Inhibitor vor der

Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie führten zu deutlich verringerten Infarkt volumina (Alessandrini et al., 1999; Namura et al., 2001; Wang et al., 2004).

Die verschiedenen Experimente mit dem Inhibitor U0126, die im Rahmen dieser Arbeit, durchgeführt wurden, als auch die Ergebnisse von anderen Gruppen zeigen deutlich, dass sich die Wirkung der Inhibition des MEK/Erk-Signalweges nicht pauschal vorhersagen lässt und sowohl protektive als auch schädigende Effekte haben kann. Dies könnte auch die unterschiedlichen Ergebnisse der *in vivo* und *in vitro* Experimente in dieser Arbeit erklären.

4.10 Wird die Regenerationsfähigkeit durch die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten oder von Stammzellen ermöglicht?

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse deuten eher in die Richtung, dass Dedifferenzierung von Kardiomyozyten einen entscheidenden Bestandteil des Regenerationsprozesses ausmachen. Zum einen konnten Mitosen innerhalb von Kardiomyozyten im Verlauf der Regeneration beobachtet werden. Zum anderen suggerieren die Analysen der differentiellen Gen- und auch Proteinexpressionen größere strukturelle Veränderungen innerhalb der Kardiomyozyten. Da wäre beispielsweise die deutliche vorübergehende Reduktion der Expression von Sarkomerproteinen, sowie die Zunahme von Glattmuskelspezifischen Proteinen und Transkripten zu nennen. Außerdem konnte die Expression von regenerations-assoziierten Antigenen wie 22/18 und Zytokeratin 18, die während der Extremitätenregeneration im vorwiegend aus dedifferenzierten mesenchymalen Zellen bestehenden Blastem exprimiert werden (Corcoran and Ferretti, 1997; Kintner and Brockes, 1984), auch im Herzen detektiert werden. Zudem konnten Transplantationsversuchen mit Kardiomyozyten des Molches in regenerierende Extremitätenstümpfe die Fähigkeit der transplantierten Kardiomyozyten in skelettale oder chondrozytale Zelltypen zu transdifferenzieren demonstrieren (Laube et al., 2006). Demnach scheinen Kardiomyozyten des Molches je nach äußerem Stimulus ihren Phänotyp komplett bzw. vorübergehend ändern zu können.

Auch bei der Untersuchung der Herzregeneration im Zebrafisch konnten bisher noch keine kardialen Stammzellen identifiziert werden, obwohl die endokardiale Expression von *notch1b* während der Herzregeneration in diese Richtung weisen könnte (Raya et al., 2003). Die Aktivierung von Notch spielt nämlich bei der Schicksalsbestimmung über Proliferation und Differenzierung von einigen residenten Stammzellen wie beispielsweise

den Satellitenzellen im Skelettmuskel eine wichtige Rolle (Conboy and Rando, 2002). In den frühen Arbeiten von Oberpriller et al. konnten im Molchherzen keine kardialen Stammzellen identifiziert werden. Um das Schicksal der verschiedenen kardialen Zelltypen während der Regeneration des Herzens genau verfolgen zu können müsste eine stabile Markierungsmethode der verschiedenen Zelltypen etabliert werden.

4.11 Mögliche Gründe für das limitierte regenerative Potenzial der Säugetiere

Der Prozess der Dedifferenzierung in einem geschädigten Gewebe resultiert in einer weiteren vorübergehenden Verringerung der Anzahl funktioneller Zellen und könnte zu einer Verschlechterung der Gewebefunktion und oder Organfunktion führen. Außerdem führt Dedifferenzierung zur Mobilisation von solchen Zellen, die bereits vielen schädlichen Einflüssen im Zuge der Verletzung ausgesetzt wurden. Demgegenüber teilen sich Stammzellen sehr langsam und befinden sich in gut geschützten Nischen innerhalb des entsprechenden Gewebes. Differenzierte Zellen könnten hingegen bereits Mutationen in der nukleären und mitochondrialen DNS angesammelt haben oder andere gefährliche Fracht mit sich tragen (Laube et al., 2006). Molche scheinen aber auch gegen diese Gefahren einen effektiven Schutzmechanismus zu besitzen, denn die meisten Versuche zur chemisch induzierten Kanzerogenese ergaben in Molchen ein seltenes Auftreten von Tumoren. Besonders die Applikation von kanzerogenen Chemikalien direkt in Gewebe während der Regeneration konnte nur selten Tumore induzieren (Tsonis, 1983).

5. Ausblick

Die histologische Analyse der Herzregeneration ergab, dass Molche der Spezies *Notophthalmus viridescens* in der Lage sind ihren Ventrikel nach mechanischer Schädigung ohne Narbenbildung wiederherzustellen. Die Regeneration dauert ca. 12 Wochen. Elektrophysiologische oder echokardiografische Messungen zur Überprüfung der uneingeschränkten Funktionsfähigkeit nach erfolgreicher Regeneration sind für den Molch bisher noch nicht etabliert worden. Die nicht invasive *in vivo* Verfolgung des Regenerationsprozesses mit Hilfe der MRT-Technologie wird am Max-Planck-Institut in Bad Nauheim derzeit etabliert und könnte die Messung verschiedener ventrikulärer Messparameter ermöglichen. Die Detektion von Mitosen im geschädigten Myokard erfolgte unter Verwendung von semidünnen Toluidin-Blau-gefärbten Herzschnitten. Eine eindeutige immunhistochemische Charakterisierung und Identifizierung der mitotischen Zellkerne gelang aufgrund des Mangels an molchspezifischen Antikörpern und des Fehlens transgener Molchlinien die über zelltypspezifische Reporterexpressionen verfügen noch nicht. Das Screening weiterer Antikörper zur Charakterisierung der als Trabekel-assoziierten Zellen sowie die Herstellung transgener Molche wären wichtige Ergänzungen der bisherigen Analysen. Die Analysen der differentiellen Genexpression im geschädigten Molchherzen haben erste interessante Ergebnisse in Bezug auf Veränderungen in der Expression von Zytoskelettproteinen ergeben. Sie können sowohl Ausdruck der Dedifferenzierungsprozesse als auch notwendige Voraussetzungen für die Proliferationsfähigkeit von Kardiomyozyten sein. Die Generation eines zweiten Chipsatzes mit zuvor normalisierten cDNS und der Vereinigung von Transkripten vieler verschiedener Zeitpunkte nach der Schädigung werden wahrscheinlich die Identifikation von weiteren für die erfolgreiche Regeneration wichtigen Faktoren ermöglichen. Ergänzende Analysen der bereits als dereguliert identifizierten Sequenzen mit Homologie zu bekannten Genen sowie der Sequenzen ohne Homologie mittels RACE-PCR, *in situ* Hybridisierungen etc. sind ebenfalls erforderlich. Die Untersuchung der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden kurze Zeit nach der Schädigung des Ventrikels haben Aufschlüsse über deren Beteiligung während der Herzregeneration gegeben. Der Einsatz weiterer für andere Schlüsselenzyme spezifischer Enzyminhibitoren könnte in Anlehnung an die Untersuchungen mit dem MEK-Inhibitor U0126 durchgeführt werden. Diese könnten weitere Einblicke in die Regulation der Regeneration bringen. Die erfolgreiche

Etablierung einer stabilen Herzmuskelzelllinie würde darüber hinaus *in vitro* Experimente deutlich erleichtern und für eine bessere Reproduzierbarkeit sorgen. Eine weitere große Herausforderung stellt die *in vivo* Markierung spezieller Zelltypen sowie die erfolgreiche Überexpression oder Repression interessanter deregulierter Gene und ihrer entsprechenden Proteinprodukte dar. Mit Hilfe solcher Experimente ließen sich funktionelle Studien mit potenziell „regenerationsrelevanten“ Genen durchführen.

6. Zusammenfassung

Entgegen der früheren Behauptungen, dass die Herzen von Molchen zwar ein gewisses regeneratives Potenzial besitzen, aber trotzdem die Wunde letztendlich durch die Ausbildung einer Narbe verschlossen wird (McDonnell and Oberpriller, 1984; Oberpriller and Oberpriller, 1974) resultierte die in dieser Arbeit verwendete Methode der mechanischen Quetschung des Ventrikels in einer nahezu kompletten Wiederherstellung der ursprünglichen Morphologie innerhalb von ca. 12 Wochen. Einzig minimale Fibronektinrückstände konnten gelegentlich noch in Herzen 84 Tage nach der Schädigung detektiert werden. In den Regenerationsprozess sind mitotische Aktivitäten verschiedener Zelltypen (auch von Kardiomyozyten) involviert. Die höchste Mitoserate wurde 14 Tage nach der Herzschädigung erreicht. Die erfolgreiche Herstellung einer cDNA-Bibliothek die Transkripte aus Herzen 14 Tage nach der Schädigung des Ventrikels enthielt, diente als Grundlage für die Herstellung von Macro- und Microarrays. Diese konnten für erste Analysen der differentiellen Genexpression im regenerierenden Herzen verwendet werden. Sowohl bei der Analyse der differentiellen Genexpression mittels Macro- und Microarrays, als auch bei den Immunfluoreszenzfärbungen konnte eine verringerte Expression von Sarkomerproteinen wie Myosin-Schweren-Kette, α -Aktinin, Myomesin etc. beobachtet werden. Gleichzeitig konnte eine Zunahme der Expression von glattemuskelspezifischen Genen und Proteinen detektiert werden. Die Veränderungen in der Zusammensetzung der Komponenten des Zytoskelettes könnten einen Hinweis auf die Dedifferenzierung von Kardiomyozyten darstellen. Außerdem wurde die differentielle Expression des Thymosin β 4 Peptids und seiner dazugehörigen mRNA festgestellt. Die beschriebene Funktion des Thymosin β 4 besteht in der Verhinderung der Polymerisation von globulärem Aktin. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Thymosin β 4 positive Effekte auf die Infarktrepaur in der Maus hat (Bock-Marquette et al., 2004) und auch im regenerierenden Zebrafisch exprimiert wird (Lien et al., 2006). Ein positiver Einfluss von Thymosin β 4 auf die zelluläre Migration und Beweglichkeit wäre auch bei der Herzregeneration im Molch vorstellbar. Regenerierende Herzen exprimierten auch die Antigene 22/18 und Zytokeratin 18. Beide Antigene sind unter anderem bekannte Marker für das regenerierende Stumpfblastem und könnten einen unreifen, dedifferenzierten Status von regenerierenden Zellen des Molches widerspiegeln. Die Western Blot-Analysen verschiedener Signaltransduktionskinasen haben unter anderem eine Beteiligung des

MEK-Erk-Signalweges während der Regeneration ergeben. Die erfolgreiche chemische Inaktivierung der MEK1/2-Kinase hat zu einer verstärkten Aktivierung der Akt-Kinase und zu einer temporären Erhöhung der Expression der Myosin-Schweren-Kette geführt. Die Behandlung von primären Kardiomyozytenkulturen mit dem auch *in vivo* verwendeten Inhibitor (U0126) hat zu einer dosis- und zelltypabhängigen Verringerung der Mitoserate sowie der Expression des Sarkomerproteins α -Aktinin geführt. Diese initialen Experimente könnten möglicherweise den Weg für eine Beschleunigung des Regenerationsprozesses durch Blockierung der MEK1/2-Kinase weisen.

7. Literaturverzeichnis

Abdullah,I, J J Lepore, J A Epstein, M S Parmacek, P J Gruber, 2005, MRL mice fail to heal the heart in response to ischemia-reperfusion injury: *Wound.Repair Regen.*, v. 13, p. 205-208.

Ahuja,P, E Perriard, T Pedrazzini, S Satoh, J C Perriard, E Ehler, 2007, Re-expression of proteins involved in cytokinesis during cardiac hypertrophy: *Exp.Cell Res.*, v. 313, p. 1270-1283.

Ahuja,P, E Perriard, J C Perriard, E Ehler, 2004, Sequential myofibrillar breakdown accompanies mitotic division of mammalian cardiomyocytes: *J.Cell Sci.*, v. 117, p. 3295-3306.

Akimenko,MA, S L Johnson, M Westerfield, M Ekker, 1995, Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in zebrafish: *Development*, v. 121, p. 347-357.

Alessandrini,A, S Namura, M A Moskowitz, J V Bonventre, 1999, MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, p. 12866-12869.

Alsan,BH, T M Schultheiss, 2002, Regulation of avian cardiogenesis by *Fgf8* signaling: *Development*, v. 129, p. 1935-1943.

Alvarado,AS, 2000, Regeneration in the metazoans: why does it happen?: *Bioessays*, v. 22, p. 578-590.

Amit,M, M K Carpenter, M S Inokuma, C P Chiu, C P Harris, M A Waknitz, J Itskovitz-Eldor, J A Thomson, 2000, Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture: *Dev.Biol.*, v. 227, p. 271-278.

Anversa,P, J Kajstura, 1998, Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart: *Circ.Res.*, v. 83, p. 1-14.

Anversa,P, A Leri, M Rota, C Bearzi, K Urbanek, J Kajstura, R Bolli, 2006, Stem Cells, Myocardial Regeneration and Methodological Artifacts: *Stem Cells*.

Ausubel F.R. and Brent S.K. (1992): *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associated and Wiley Interscience Volume 1 and 2.

Bader,D, J Oberpriller, 1979, Autoradiographic and electron microscopic studies of minced cardiac muscle regeneration in the adult newt, *notophthalmus viridescens*: *J.Exp.Zool.*, v. 208, p. 177-193.

Badrian,B, T M Casey, M C Lai, P E Rakoczy, P G Arthur, M A Bogoyevitch, 2006, Contrasting actions of prolonged mitogen-activated protein kinase activation on cell survival: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 345, p. 843-850.

- Barron,M, M Gao, J Lough, 2000, Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative: *Dev.Dyn.*, v. 218, p. 383-393.
- Begemann,G, P W Ingham, 2000, Developmental regulation of Tbx5 in zebrafish embryogenesis: *Mech.Dev.*, v. 90, p. 299-304.
- Beltrami,AP, L Barlucchi, D Torella, M Baker, F Limana, S Chimenti, H Kasahara, M Rota, E Musso, K Urbanek, A Leri, J Kajstura, B Nadal-Ginard, P Anversa, 2003, Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration: *Cell*, v. 114, p. 763-776.
- Beltrami,AP, K Urbanek, J Kajstura, S M Yan, N Finato, R Bussani, B Nadal-Ginard, F Silvestri, A Leri, C A Beltrami, P Anversa, 2001, Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction: *N.Engl.J.Med.*, v. 344, p. 1750-1757.
- Benjamin,IJ, D R McMillan, 1998, Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease: *Circ.Res.*, v. 83, p. 117-132.
- Berry,MF, A J Engler, Y J Woo, T J Pirolli, L T Bish, V Jayasankar, K J Morine, T J Gardner, D E Discher, H L Sweeney, 2006, Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 290, p. H2196-H2203.
- Bettencourt-Dias,M, S Mitnacht, J P Brockes, 2003, Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes: *J.Cell Sci.*, v. 116, p. 4001-4009.
- Bock-Marquette,I, A Saxena, M D White, J M Dimaio, D Srivastava, 2004, Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair: *Nature*, v. 432, p. 466-472.
- Bottcher,RT, C Niehrs, 2005, Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development: *Endocr.Rev.*, v. 26, p. 63-77.
- Brar,BK, A K Jonassen, A Stephanou, G Santilli, J Railson, R A Knight, D M Yellon, D S Latchman, 2000, Urocortin protects against ischemic and reperfusion injury via a MAPK-dependent pathway: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 8508-8514.
- Brittan,M, N A Wright, 2002, Gastrointestinal stem cells: *J.Pathol.*, v. 197, p. 492-509.
- Brockes,J, A Kumar, 2005, Newts: *Curr.Biol.*, v. 15, p. R42-R44.
- Brockes,JP, 1997, Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure: *Science*, v. 276, p. 81-87.
- Brockes,JP, A Kumar, C P Velloso, 2001, Regeneration as an evolutionary variable: *J.Anat.*, v. 199, p. 3-11.
- Bueno,OF, L J De Windt, K M Tymitz, S A Witt, T R Kimball, R Klevitsky, T E Hewett, S P Jones, D J Lefer, C F Peng, R N Kitsis, J D Molkentin, 2000, The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice: *EMBO J.*, v. 19, p. 6341-6350.

- Cai,CL, X Liang, Y Shi, P H Chu, S L Pfaff, J Chen, S Evans, 2003, Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart: *Dev.Cell*, v. 5, p. 877-889.
- Callaerts,P, A M Munoz-Marmol, S Glardon, E Castillo, H Sun, W H Li, W J Gehring, E Salo, 1999, Isolation and expression of a Pax-6 gene in the regenerating and intact Planarian *Dugesia(G)tigrina*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, p. 558-563.
- Capasso, JM, S Bruno, W Cheng, P Li, R Rodgers, Z Darzynkiewicz, P Anversa, 1992, Ventricular loading is coupled with DNA synthesis in adult cardiac myocytes after acute and chronic myocardial infarction in rats: *Circ.Res.*, v. 71, p. 1379-1389.
- Caplan, AI, S P Bruder, 2001, Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century: *Trends Mol.Med.*, v. 7, p. 259-264.
- Carlyle, WC, C A Toher, J R Vandervelde, K M McDonald, D C Homans, J N Cohn, 1996, Changes in beta-actin mRNA expression in remodeling canine myocardium: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 28, p. 53-63.
- Chen, H, S Shi, L Acosta, W Li, J Lu, S Bao, Z Chen, Z Yang, M D Schneider, K R Chien, S J Conway, M C Yoder, L S Haneline, D Franco, W Shou, 2004, BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis: *Development*, v. 131, p. 2219-2231.
- Chu, PH, P Ruiz-Lozano, Q Zhou, C Cai, J Chen, 2000, Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system: *Mech.Dev.*, v. 95, p. 259-265.
- Clement, S, M Stouffs, E Bettioli, S Kampf, K H Krause, C Chaponnier, M Jaconi, 2007, Expression and function of alpha-smooth muscle actin during embryonic-stem-cell-derived cardiomyocyte differentiation: *J.Cell Sci.*, v. 120, p. 229-238.
- Conboy, IM, T A Rando, 2002, The regulation of Notch signaling controls satellite cell activation and cell fate determination in postnatal myogenesis: *Dev.Cell*, v. 3, p. 397-409.
- Corcoran, JP, P Ferretti, 1997, Keratin 8 and 18 expression in mesenchymal progenitor cells of regenerating limbs is associated with cell proliferation and differentiation: *Dev.Dyn.*, v. 210, p. 355-370.
- Dazzi, F, R Ramasamy, S Glennie, S P Jones, I Roberts, 2006, The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis: *Blood Rev.*, v. 20, p. 161-171.
- Deb, A, S Wang, K A Skelding, D Miller, D Simper, N M Caplice, 2003, Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients: *Circulation*, v. 107, p. 1247-1249.
- Dell'Era, P, R Ronca, L Coco, S Nicoli, M Metra, M Presta, 2003, Fibroblast growth factor receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte development: *Circ.Res.*, v. 93, p. 414-420.
- Deten, A, H C Volz, S Clamors, S Leiblein, W Briest, G Marx, H G Zimmer, 2005, Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart: *Cardiovasc.Res.*, v. 65, p. 52-63.

Dinsmore, Charles E (April 2001) Regeneration: Principles. In: ENCYCLOPEDIA OF life SCIENCES: john WILEY & Sons, Ltd: Chichester <http://www.els.net/>
[doi: 10.1038/npg.els.0001112]

Doetschman,TC, H Eistetter, M Katz, W Schmidt, R Kemler, 1985, The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium: *J.Embryol.Exp.Morphol.*, v. 87, p. 27-45.

Dudley,AT, E J Robertson, 1997, Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos: *Dev.Dyn.*, v. 208, p. 349-362.

Duellmann, WE, L Trueb, 1994, *Biology of Amphibians*. Johns Hopkins University Press, USA, p. 397-400

Ebelt,H, M Jungblut, Y Zhang, T Kubin, S Kostin, A Technau, S Oustanina, S Niebrugge, J Lehmann, K Werdan, T Braun, 2007, Cellular cardiomyoplasty: improvement of left ventricular function correlates with the release of cardioactive cytokines: *Stem Cells*, v. 25, p. 236-244.

Engel,FB, M Schebesta, M T Duong, G Lu, S Ren, J B Madwed, H Jiang, Y Wang, M T Keating, 2005, p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes: *Genes Dev.*, v. 19, p. 1175-1187.

Engel,FB, M Schebesta, M T Keating, 2006, Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 41, p. 601-612.

Einhorn,TA, C A Lee, 2001, Bone regeneration: new findings and potential clinical applications: *J.Am.Acad.Orthop.Surg.*, v. 9, p. 157-165.

Eppenberger-Eberhardt,M, I Flamme, V Kurer, H M Eppenberger, 1990, Reexpression of alpha-smooth muscle actin isoform in cultured adult rat cardiomyocytes: *Dev.Biol.*, v. 139, p. 269-278.

Favata,MF, K Y Horiuchi, E J Manos, A J Daulerio, D A Stradley, W S Feeser, D E Van Dyk, W J Pitts, R A Earl, F Hobbs, R A Copeland, R L Magolda, P A Scherle, J M Trzaskos, 1998, Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase: *J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 18623-18632.

Ferretti,P, J P Brockes, 1988, Culture of newt cells from different tissues and their expression of a regeneration-associated antigen: *J.Exp.Zool.*, v. 247, p. 77-91.

Ferretti,P, J P Brockes, 1990, The monoclonal antibody 22/18 recognizes a conformational change in an intermediate filament of the newt, *Notophthalmus viridescens*, during limb regeneration: *Cell Tissue Res.*, v. 259, p. 483-493.

Ferretti,P, S Ghosh, 1997, Expression of regeneration-associated cytoskeletal proteins reveals differences and similarities between regenerating organs: *Dev.Dyn.*, v. 210, p. 288-304.

Fukuda,T, K Chen, X Shi, C Wu, 2003, PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival: *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 51324-51333.

- Gaiano,N, G Fishell, 2002, The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates: *Annu.Rev.Neurosci.*, v. 25, p. 471-490.
- Gaussin,V, J E Tomlinson, C Depre, S Engelhardt, C L Antos, G Takagi, L Hein, J N Topper, S B Liggett, E N Olson, M J Lohse, S F Vatner, D E Vatner, 2003, Common genomic response in different mouse models of beta-adrenergic-induced cardiomyopathy: *Circulation*, v. 108, p. 2926-2933.
- Germani,A, G Di Rocco, F Limana, F Martelli, M C Capogrossi, 2007, Molecular mechanisms of cardiomyocyte regeneration and therapeutic outlook: *Trends Mol.Med.*
- Glaser,R, M M Lu, N Narula, J A Epstein, 2002, Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts: *Circulation*, v. 106, p. 17-19.
- Harada,M, Y Qin, H Takano, T Minamino, Y Zou, H Toko, M Ohtsuka, K Matsuura, M Sano, J Nishi, K Iwanaga, H Akazawa, T Kunieda, W Zhu, H Hasegawa, K Kunisada, T Nagai, H Nakaya, K Yamauchi-Takahara, I Komuro, 2005, G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes: *Nat.Med.*, v. 11, p. 305-311.
- Hocht-Zeisberg,E, H Kahnert, K Guan, G Wulf, B Hemmerlein, T Schlott, G Tenderich, R Korfer, U Raute-Kreinsen, G Hasenfuss, 2004, Cellular repopulation of myocardial infarction in patients with sex-mismatched heart transplantation: *Eur.Heart J.*, v. 25, p. 749-758.
- Hodgson,DM, A Behfar, L V Zingman, G C Kane, C Perez-Terzic, A E Alekseev, M Puceat, A Terzic, 2004, Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 287, p. H471-H479.
- Iten,LE, S V Bryant, 1973, Forelimb Regeneration from Different Levels of Amputation in the Newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, Rate, and Stages: *Wilhelm Roux` Archiv* 173, p. 263-282
- Iten,LE, S V Bryant, 1976, Stages of tail regeneration in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*: *J.Exp.Zool.*, v. 196, p. 283-292.
- Iwanaga,K, H Takano, M Ohtsuka, H Hasegawa, Y Zou, Y Qin, K Odaka, K Hiroshima, H Tadokoro, I Komuro, 2004, Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 325, p. 1353-1359.
- Kajstura,J, A Leri, N Finato, C Di Loreto, C A Beltrami, P Anversa, 1998a, Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, p. 8801-8805.
- Kingsley,DM, A E Bland, J M Grubber, P C Marker, L B Russell, N G Copeland, N A Jenkins, 1992, The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF beta superfamily: *Cell*, v. 71, p. 399-410.
- Kintner,CR, J P Brockes, 1984, Monoclonal antibodies identify blastemal cells derived from dedifferentiating limb regeneration: *Nature*, v. 308, p. 67-69.

- Kosaka,M, R Kodama, G Eguchi, 1998, In vitro culture system for iris-pigmented epithelial cells for molecular analysis of transdifferentiation: *Exp.Cell Res.*, v. 245, p. 245-251.
- Koshiha,K, A Kuroiwa, H Yamamoto, K Tamura, H Ide, 1998, Expression of Msx genes in regenerating and developing limbs of axolotl: *J.Exp.Zool.*, v. 282, p. 703-714.
- Jo,SK, W Y Cho, S A Sung, H K Kim, N H Won, 2005, MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis: *Kidney Int.*, v. 67, p. 458-466.
- Laflamme,MA, J Gold, C Xu, M Hassanipour, E Rosler, S Police, V Muskheli, C E Murry, 2005, Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells: *Am.J.Pathol.*, v. 167, p. 663-671.
- Laflamme,MA, C E Murry, 2005, Regenerating the heart: *Nat.Biotechnol.*, v. 23, p. 845-856.
- Laflamme,MA, D Myerson, J E Saffitz, C E Murry, 2002a, Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts: *Circ.Res.*, v. 90, p. 634-640.
- Laube,F, M Heister, C Scholz, T Borchardt, T Braun, 2006, Re-programming of newt cardiomyocytes is induced by tissue regeneration: *J.Cell Sci.*, v. 119, p. 4719-4729.
- Laugwitz,KL, A Moretti, J Lam, P Gruber, Y Chen, S Woodard, L Z Lin, C L Cai, M M Lu, M Reth, O Platoshyn, J X Yuan, S Evans, K R Chien, 2005, Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages: *Nature*, v. 433, p. 647-653.
- Laveder,P, C De Pitta, S Toppo, G Valle, G Lanfranchi, 2002, A two-step strategy for constructing specifically self-subtracted cDNA libraries: *Nucleic Acids Res.*, v. 30, p. e38.
- Lefterovich,JM, K Bedelbaeva, S Samulewicz, X M Zhang, D Zwas, E B Lankford, E Heber-Katz, 2001, Heart regeneration in adult MRL mice: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, p. 9830-9835.
- Leobon,B, I Garcin, P Menasche, J T Vilquin, E Audinat, S Charpak, 2003, Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, p. 7808-7811.
- Lepilina,A, A N Coon, K Kikuchi, J E Holdway, R W Roberts, C G Burns, K D Poss, 2006, A Dynamic Epicardial Injury Response Supports Progenitor Cell Activity during Zebrafish Heart Regeneration: *Cell*, v. 127, p. 607-619.
- Li,F, X Wang, J M Capasso, A M Gerdes, 1996, Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 28, p. 1737-1746.
- Li,Z, M H Theus, L Wei, 2006, Role of ERK 1/2 signaling in neuronal differentiation of cultured embryonic stem cells: *Dev.Growth Differ.*, v. 48, p. 513-523.
- Lien,CL, M Schebesta, S Makino, G J Weber, M T Keating, 2006, Gene Expression Analysis of Zebrafish Heart Regeneration: *PLoS.Biol.*, v. 4.

- Limana,F, K Urbanek, S Chimenti, F Quaini, A Leri, J Kajstura, B Nadal-Ginard, S Izumo, P Anversa, 2002, bcl-2 overexpression promotes myocyte proliferation: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 99, p. 6257-6262.
- Lindner,V, C Booth, I Prudovsky, D Small, T Maciag, L Liaw, 2001, Members of the Jagged/Notch gene families are expressed in injured arteries and regulate cell phenotype via alterations in cell matrix and cell-cell interaction: Am.J.Pathol., v. 159, p. 875-883.
- Liu,L, X Zhang, B Qian, X Min, X Gao, C Li, Y Cheng, J Huang, 2007, Over-expression of heat shock protein 27 attenuates doxorubicin-induced cardiac dysfunction in mice: Eur.J.Heart Fail..
- Lough,J, M Barron, M Brogley, Y Sugi, D L Bolender, X Zhu, 1996, Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm: Dev.Biol., v. 178, p. 198-202.
- Maier,CE, R H Miller, 1992, In vitro and in vivo characterization of blastemal cells from regenerating newt limbs: J.Exp.Zool., v. 262, p. 180-192.
- Makino,S, K Fukuda, S Miyoshi, F Konishi, H Kodama, J Pan, M Sano, T Takahashi, S Hori, H Abe, J Hata, A Umezawa, S Ogawa, 1999, Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro: J.Clin.Invest, v. 103, p. 697-705.
- Makino,S, G G Whitehead, C L Lien, S Kim, P Jhavar, A Kono, Y Kawata, M T Keating, 2005, Heat-shock protein 60 is required for blastema formation and maintenance during regeneration: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, p. 14599-14604.
- Maltsev,VA, J Rohwedel, J Hescheler, A M Wobus, 1993, Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types: Mech.Dev., v. 44, p. 41-50.
- Mao,L, A L Bryantsev, M B Chechenova, E A Shelden, 2005, Cloning, characterization, and heat stress-induced redistribution of a protein homologous to human hsp27 in the zebrafish *Danio rerio*: Exp.Cell Res., v. 306, p. 230-241.
- Martin,CM, A P Meeson, S M Robertson, T J Hawke, J A Richardson, S Bates, S C Goetsch, T D Gallardo, D J Garry, 2004, Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart: Dev.Biol., v. 265, p. 262-275.
- Matz,DG, J O Oberpriller, J C Oberpriller, 1998, Comparison of mitosis in binucleated and mononucleated newt cardiac myocytes: Anat.Rec., v. 251, p. 245-255.
- McDonnell,TJ, J O Oberpriller, 1983, The atrial proliferative response following partial ventricular amputation in the heart of the adult newt. A light and electron microscopic autoradiographic study: Tissue Cell, v. 15, p. 351-363.
- McDonnell,TJ, J O Oberpriller, 1984, The response of the atrium to direct mechanical wounding in the adult heart of the newt, *Notophthalmus viridescens*. An electron-microscopic and autoradiographic study: Cell Tissue Res., v. 235, p. 583-592.

- Mehrhof,FB, F U Muller, M W Bergmann, P Li, Y Wang, W Schmitz, R Dietz, R von Harsdorf, 2001, In cardiomyocyte hypoxia, insulin-like growth factor-I-induced antiapoptotic signaling requires phosphatidylinositol-3-OH-kinase-dependent and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of the transcription factor cAMP response element-binding protein: *Circulation*, v. 104, p. 2088-2094.
- Menasche,P, A A Hagege, J T Vilquin, M Desnos, E Abergel, B Pouzet, A Bel, S Sarateanu, M Scorsin, K Schwartz, P Bruneval, M Benbunan, J P Marolleau, D Duboc, 2003, Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction: *J.Am.Coll.Cardiol.*, v. 41, p. 1078-1083.
- Minami,E, M A Laflamme, J E Saffitz, C E Murry, 2005a, Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart: *Circulation*, v. 112, p. 2951-2958.
- Mitsiadis,TA, K Fried, C Goridis, 1999, Reactivation of Delta-Notch signaling after injury: complementary expression patterns of ligand and receptor in dental pulp: *Exp.Cell Res.*, v. 246, p. 312-318.
- Mitsuda,S, C Yoshii, Y Ikegami, M Araki, 2005, Tissue interaction between the retinal pigment epithelium and the choroid triggers retinal regeneration of the newt *Cynops pyrrhogaster*: *Developmental Biology*, v. 280, p. 122-132.
- Monzen,K, R Nagai, I Komuro, 2002, A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation: *Trends Cardiovasc.Med.*, v. 12, p. 263-269.
- Morrison,JI, S Loof, P He, A Simon, 2006, Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population: *J.Cell Biol.*, v. 172, p. 433-440.
- Most,P, M Boerries, C Eicher, C Schweda, P Ehlermann, S T Pleger, E Loeffler, W J Koch, H A Katus, C A Schoenenberger, A Remppis, 2003, Extracellular S100A1 protein inhibits apoptosis in ventricular cardiomyocytes via activation of the extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK1/2): *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 48404-48412.
- Muller,P, P Pfeiffer, J Koglin, H J Schafers, U Seeland, I Janzen, S Urbschat, M Bohm, 2002, Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts: *Circulation*, v. 106, p. 31-35.
- Muller-Ehmsen,J, P Whittaker, R A Kloner, J S Dow, T Sakoda, T I Long, P W Laird, L Kedes, 2002, Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 34, p. 107-116.
- Nace,JD, R A Tassava, 1995, Examination of fibronectin distribution and its sources in the regenerating newt limb by immunocytochemistry and in situ hybridization: *Dev.Dyn.*, v. 202, p. 153-164.
- Namura,S, K Iihara, S Takami, I Nagata, H Kikuchi, K Matsushita, M A Moskowitz, J V Bonventre, A Alessandrini, 2001, Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, p. 11569-11574.

- Nechiporuk,A, M T Keating, 2002, A proliferation gradient between proximal and msxb-expressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration: *Development*, v. 129, p. 2607-2617.
- Naseem,RH, A P Meeson, D J Michael, M D White, J Kallhoff, C Humphries, S C Goetsch, L J De Windt, M A Williams, M G Garry, D J Garry, 2007, Reparative myocardial mechanisms in adult C57BL/6 and MRL mice following injury: *Physiol Genomics*, v. 30, p. 44-52.
- Neuhaus,H, V Rosen, R S Thies, 1999, Heart specific expression of mouse BMP-10 a novel member of the TGF-beta superfamily: *Mech.Dev.*, v. 80, p. 181-184.
- Oberpriller, JC, Mauro A, editor. *The Development and Regenerative Potential of Cardiac Muscle*. London: Harwood Academic Publishers; 1991. p. 81-92.
- OBERPRIL.J, OBERPRIL.JC, 1971, Mitosis in Adult Newt Ventricle: *Journal of Cell Biology*, v. 49, p. 560-&.
- Oberpriller,JO, J C Oberpriller, 1974, Response of the adult newt ventricle to injury: *J.Exp.Zool.*, v. 187, p. 249-253.
- Oberpriller,JO, J C Oberpriller, A M Arefyeva, V I Mitashov, B M Carlson, 1988, Nuclear characteristics of cardiac myocytes following the proliferative response to mincing of the myocardium in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*: *Cell Tissue Res.*, v. 253, p. 619-624.
- Odelberg,SJ, 2002, Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals: *Semin.Cell Dev.Biol.*, v. 13, p. 335-343.
- Oh,H, S B Bradfute, T D Gallardo, T Nakamura, V Gaussin, Y Mishina, J Pocius, L H Michael, R R Behringer, D J Garry, M L Entman, M D Schneider, 2003, Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100, p. 12313-12318.
- Orlic,D, J Kajstura, S Chimenti, F Limana, I Jakoniuk, F Quaini, B Nadal-Ginard, D M Bodine, A Leri, P Anversa, 2001, Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, p. 10344-10349.
- Padhi,BK, L Joly, P Tellis, A Smith, P Nanjappa, M Chevrette, M Ekker, M A Akimenko, 2004, Screen for genes differentially expressed during regeneration of the zebrafish caudal fin: *Dev.Dyn.*, v. 231, p. 527-541.
- Pandur,P, M Lasche, L M Eisenberg, M Kuhl, 2002, Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis: *Nature*, v. 418, p. 636-641.
- Papadaki,M, N Bursac, R Langer, J Merok, G Vunjak-Novakovic, L E Freed, 2001, Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 280, p. H168-H178.
- Patapoutian,A, B J Wold, R A Wagner, 1995, Evidence for developmentally programmed transdifferentiation in mouse esophageal muscle: *Science*, v. 270, p. 1818-1821.
- Poss,KD, 2006, Getting to the heart of regeneration in zebrafish: *Semin.Cell Dev.Biol.*

- Poss, KD, A Nechiporuk, A M Hillam, S L Johnson, M T Keating, 2002a, Mps1 defines a proximal blastemal proliferative compartment essential for zebrafish fin regeneration: *Development*, v. 129, p. 5141-5149.
- Poss, KD, L G Wilson, M T Keating, 2002b, Heart regeneration in zebrafish: *Science*, v. 298, p. 2188-2190.
- Quaini, F, E Cigola, C Lagrasta, G Saccani, E Quaini, C Rossi, G Olivetti, P Anversa, 1994, End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes: *Circ.Res.*, v. 75, p. 1050-1063.
- Quaini, F, K Urbanek, A P Beltrami, N Finato, C A Beltrami, B Nadal-Ginard, J Kajstura, A Leri, P Anversa, 2002, Chimerism of the transplanted heart: *N.Engl.J.Med.*, v. 346, p. 5-15.
- Radisic, M, H Park, H Shing, T Consi, F J Schoen, R Langer, L E Freed, G Vunjak-Novakovic, 2004, Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 101, p. 18129-18134.
- Radtke, F, A Wilson, B Ernst, H R MacDonald, 2002, The role of Notch signaling during hematopoietic lineage commitment: *Immunol.Rev.*, v. 187, p. 65-74.
- Raya, A, C M Koth, D Buscher, Y Kawakami, T Itoh, R M Raya, G Sternik, H J Tsai, C Rodriguez-Esteban, J C Izpisua-Belmonte, 2003, Activation of Notch signaling pathway precedes heart regeneration in zebrafish: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100 Suppl 1, p. 11889-11895.
- Reinecke, H, G H MacDonald, S D Hauschka, C E Murry, 2000, Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair: *J.Cell Biol.*, v. 149, p. 731-740.
- Reinecke, H, M Zhang, T Bartosek, C E Murry, 1999, Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts: *Circulation*, v. 100, p. 193-202.
- Rio-Tsonis, K, C H Washabaugh, P A Tsonis, 1995, Expression of pax-6 during urodele eye development and lens regeneration: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 92, p. 5092-5096.
- Roell, W, T Lewalter, P Sasse, Y N Tallini, B R Choi, M Breitbach, R Doran, U M Becher, S M Hwang, T Bostani, J von Maltzahn, A Hofmann, S Reining, B Eiberger, B Gabris, A Pfeifer, A Welz, K Willecke, G Salama, J W Schrickel, M I Kotlikoff, B K Fleischmann, 2007, Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia: *Nature*, v. 450, p. 819-824.
- Rubart, M, M H Soonpaa, H Nakajima, L J Field, 2004, Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation: *J.Clin.Invest*, v. 114, p. 775-783.
- Rumyantsev PP. Replicative behaviour of different types of cardiomyocytes in terms of experimental conditions, age and systematic position of animals. In: Oberpriller JO,

- Sambrook, J., and Fritsch, E. F. a. M. T. (1989). "Molecular cloning: A Laboratory Manual." Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Schneider, VA, M Mercola, 2001, Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*: *Genes Dev.*, v. 15, p. 304-315.
- Schultheiss, TM, J B Burch, A B Lassar, 1997, A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis: *Genes Dev.*, v. 11, p. 451-462.
- Shake, JG, P J Gruber, W A Baumgartner, G Senechal, J Meyers, J M Redmond, M F Pittenger, B J Martin, 2002, Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects: *Ann.Thorac.Surg.*, v. 73, p. 1919-1925.
- Sheldahl, LC, D C Slusarski, P Pandur, J R Miller, M Kuhl, R T Moon, 2003, Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos: *J.Cell Biol.*, v. 161, p. 769-777.
- Sheng, Z, K Knowlton, J Chen, M Hoshijima, J H Brown, K R Chien, 1997, Cardiotrophin 1 (CT-1) inhibition of cardiac myocyte apoptosis via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. Divergence from downstream CT-1 signals for myocardial cell hypertrophy: *J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 5783-5791
- Shi, X, D J Garry, 2006, Muscle stem cells in development, regeneration, and disease: *Genes Dev.*, v. 20, p. 1692-1708.
- Smithers, L, C Haddon, Y J Jiang, J Lewis, 2000, Sequence and embryonic expression of deltaC in the zebrafish: *Mech.Dev.*, v. 90, p. 119-123.
- Snir, M, I Kehat, A Gepstein, R Coleman, J Itskovitz-Eldor, E Livne, L Gepstein, 2003, Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, v. 285, p. H2355-H2363.
- Solloway, MJ, A T Dudley, E K Bikoff, K M Lyons, B L Hogan, E J Robertson, 1998, Mice lacking Bmp6 function: *Dev.Genet.*, v. 22, p. 321-339.
- Soonpaa, MH, L J Field, 1998, Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis: *Circ.Res.*, v. 83, p. 15-26.
- Soonpaa, MH, J O Oberpriller, J C Oberpriller, 1994, Factors altering DNA synthesis in the cardiac myocyte of the adult newt, *Notophthalmus viridescens*: *Cell Tissue Res.*, v. 275, p. 377-382.
- Sugano, Y, T Anzai, T Yoshikawa, Y Maekawa, T Kohno, K Mahara, K Naito, S Ogawa, 2005, Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction: *Cardiovasc.Res.*, v. 65, p. 446-456.
- Sugi, Y, J Lough, 1992, Onset of expression and regional deposition of alpha-smooth and sarcomeric actin during avian heart development: *Dev.Dyn.*, v. 193, p. 116-124.
- Tate, JM, T J McDonnell, J C Oberpriller, J O Oberpriller, 1987, Isolation of cardiac myocytes from the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. an electron microscopic and quantitative light microscopic analysis: *Tissue Cell*, v. 19, p. 577-585.

- Tian,B, W C Carlyle, W G Weigold, K M McDonald, D L Judd, C A Toher, D C Homans, J N Cohn, 1999, Localization of changes in beta-actin expression in remodeled canine myocardium: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 31, p. 751-760.
- Thom,T, N Haase, W Rosamond, V J Howard, J Rumsfeld, T Manolio, Z J Zheng, K Flegal, C O'Donnell, S Kittner, D Lloyd-Jones, D C Goff, Jr., Y Hong, R Adams, G Friday, K Furie, P Gorelick, B Kissela, J Marler, J Meigs, V Roger, S Sidney, P Sorlie, J Steinberger, S Wasserthiel-Smoller, M Wilson, P Wolf, 2006, Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee: *Circulation*, v. 113, p. e85-151.
- Tsonis,PA, 1983, Effects of carcinogens on regenerating and non-regenerating limbs in amphibia (review): *Anticancer Res.*, v. 3, p. 195-202.
- Ueda,Y, H Kondoh, N Mizuno, 2005, Generation of transgenic newt *Cynops pyrrhogaster* for regeneration study: *Genesis*, v. 41, p. 87-98.
- Urbanek,K, F Quaini, G Tasca, D Torella, C Castaldo, B Nadal-Ginard, A Leri, J Kajstura, E Quaini, P Anversa, 2003, Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, p. 10440-10445.
- Urist,MR, 1965, Bone: formation by autoinduction: *Science*, v. 150, p. 893-899.
- Wagner,M, M A Siddiqui, 2007, Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and heart tube formation: *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, v. 232, p. 852-865.
- Walder,S, F Zhang, P Ferretti, 2003, Up-regulation of neural stem cell markers suggests the occurrence of dedifferentiation in regenerating spinal cord: *Dev.Genes Evol.*, v. 213, p. 625-630.
- Wang,ZQ, D C Wu, F P Huang, G Y Yang, 2004, Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia: *Brain Res.*, v. 996, p. 55-66.
- Westfall,MV, K A Pasyk, D I Yule, L C Samuelson, J M Metzger, 1997, Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures: *Cell Motil.Cytoskeleton*, v. 36, p. 43-54.
- Winnier,G, M Blessing, P A Labosky, B L Hogan, 1995, Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse: *Genes Dev.*, v. 9, p. 2105-2116.
- World Health Statistics 2006-Top ten causes of death, all ages, Germany 2002
<http://who.int/entity/healthinfo/statistics/bodgbdeathdalyestimates.xls>
- Xu,C, S Police, N Rao, M K Carpenter, 2002, Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: *Circ.Res.*, v. 91, p. 501-508.
- Yamada,M, J P Revelli, G Eichele, M Barron, R J Schwartz, 2000, Expression of chick *Tbx-2*, *Tbx-3*, and *Tbx-5* genes during early heart development: evidence for BMP2 induction of *Tbx2*: *Dev.Biol.*, v. 228, p. 95-105.

Zaffran,S, M Frasch, 2002, Early signals in cardiac development: *Circ.Res.*, v. 91, p. 457-469.

Zhang,H, A Bradley, 1996, Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development: *Development*, v. 122, p. 2977-2986.

Zhu,X, J Sasse, D McAllister, J Lough, 1996, Evidence that fibroblast growth factors 1 and 4 participate in regulation of cardiogenesis: *Dev.Dyn.*, v. 207, p. 429-438.

Zhulidov,PA, E A Bogdanova, A S Shcheglov, L L Vagner, G L Khaspekov, V B Kozhemyako, M V Matz, E Meleshkevitch, L L Moroz, S A Lukyanov, D A Shagin, 2004, Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease: *Nucleic Acids Res.*, v. 32, p. e37.

Zhang,M, D Methot, V Poppa, Y Fujio, K Walsh, C E Murry, 2001, Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies: *J.Mol.Cell Cardiol.*, v. 33, p. 907-921.

Zhang,YM, C Hartzell, M Narlow, S C Dudley, Jr., 2002, Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential: *Circulation*, v. 106, p. 1294-1299.

Zimmermann,WH, M Didie, G H Wasmeier, U Nixdorff, A Hess, I Melnychenko, O Boy, W L Neuhuber, M Weyand, T Eschenhagen, 2002, Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats: *Circulation*, v. 106, p. I151-I157.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen und Fachausdrücke

Abb.	Abbildung
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSCs	Stammzellen aus dem Knochenmark (bone marrow derived stem cells)
bp	Basenpaar/-re
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA/cDNS	zur mRNA komplementäre DNS die durch Reverse Transkription entsteht
Cy2	Carbocyan
Cy3	Indocarbocyan
bzw.	beziehungsweise
d	Tag/-e
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	zweifach destilliertes H ₂ O
Dig	Digoxigenin
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast-Growth-factor
h	Stunde

hpf	hours past fertilisation (Stunden nach der Befruchtung)
HRP	Horseradisch (Meerrettich) Peroxidase
<i>in vitro</i>	in der Zellkultur; außerhalb des Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
LB	Luria Bertani Kulturmedium
M	molar
μ	Mikro ($1 \cdot 10^{-6}$)
MeOH	Methanol
MHC	Myosin Heavy Chain
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
NBT	Nitro-blau-Tetrazoliumchlorid
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
postop	nach der Operation
PFA	Paraformaldehyde
RNase	Ribonuklease
RNS/ RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natrium-dodecylsulfate-Polyacrylamide-Gelelektrophorese
S-Phase	Synthese Phase des Zellzyklus
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TPA	12-0-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamine-Isothiocyanat

8.2 Negativkontrollen für Immunfluoreszenzfärbungen

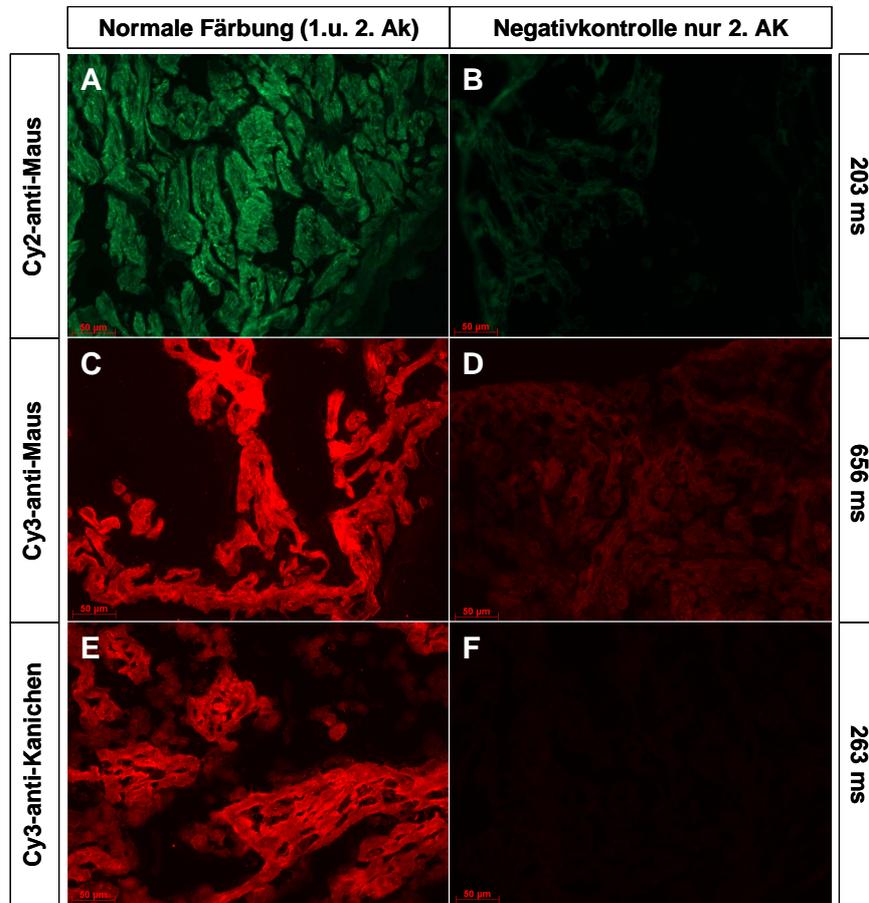


Abb.48: Beispiel für die unspezifische Hintergrundfärbung bzw. Autofluoreszenz des Herzgewebes von Negativkontrollen die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden im Vergleich zur spezifischen Antikörperfärbung mit beiden Antikörpern bei jeweils gleicher Belichtungszeit.

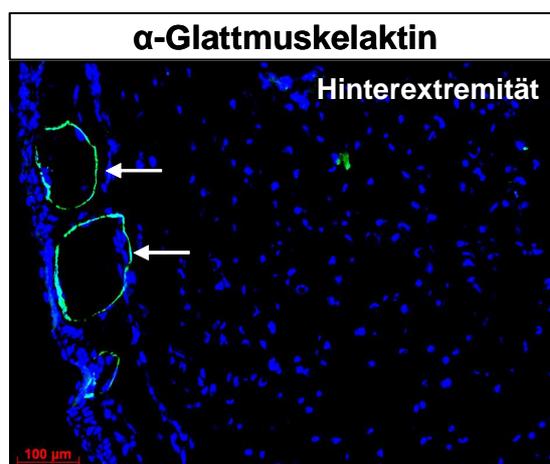


Abb.49: Glattmuskelspezifische Färbung des α -Glattmuskelaktin-Antikörpers auf einem Schnitt durch die Skelettmuskulatur einer Hinterextremität des Molches. Nur Gefäßwände zeigen eine positive Färbung.

8.3. Lebenslauf

Name: Julia Kruse
Geburtsdatum: 21.12.1976
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig

Schulbildung

1989 - 1996 Gymnasium Liebfrauenschule in Oldenburg
10.06.1996 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/1996–10/2000 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
01/2001-11/2001 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für
Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
mit dem Thema: "Untersuchungen zur differentiellen
Genexpression in den hyperplastischen Herzen *Lbx1*
defizienter Mäuse"
Betreuer: Prof. Dr. Dr. Thomas Braun
11/2001 Erlangung des akademischen Grades Diplom-
Biochemikerin durch Urkunde und Zeugnis der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg

Doktorarbeit

01/2002-01/2005 Beginn der Promotion an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg am Institut für Physiologische Chemie
02/2005-01/2008 Fortsetzung und Fertigstellung der Promotionsschrift
am Max-Planck-Institut für Herz-und Lungenforschung
in Bad Nauheim
Thema: "Analyse der Herzregeneration nach
mechanischer Schädigung des Ventrikels des adulten
Molches *Notophthalmus viridescens*"

8.4 Tagungsbeiträge und Publikationen

- Teilnahme an der 4. GfE School "Novel Approaches to Developmental Biology" in Günzburg mit einem Kurzvortrag:
„Analysis of differential gene expression in hearts of Lbx1 deficient mice“
 Oktober 2002

- **Gene expression profiling of regenerating hearts and limbs in the newt *Notophthalmus viridescens***
 Thilo Borchardt¹, Mario Looso¹, Patrick Weiss¹, Julia Kruse¹, Henning Witt², Patricia Ruiz², Thomas Braun¹
¹ Max-Planck-Institute for Heart and Lung Research, Department of Cardiac Development and Remodelling, Parkstrasse 1, D-61231 Bad Nauheim ² Center for Cardiovascular Research, Hessische Straße 3-4, 10115 D-Berlin
 Posterpräsentation auf dem "Regeneration Meeting 2006" in Ascona (September 2006)

- **Analysis of heart regeneration in the newt *Notophthalmus viridescens***
Julia Kruse, Thilo Borchardt, Sawa Kostin and Thomas Braun
 Max-Planck- Institute for Heart and Lung Research, Bad Nauheim, Germany
 Posterpräsentation bei der "Spetses International Summer School 2007- Molecular Mechanisms of Regeneration" (September 2007)

- **Schäfer, K, P Neuhaus, J Kruse, T Braun, 2003**, The homeobox gene Lbx1 specifies a subpopulation of cardiac neural crest necessary for normal heart development: *Circ.Res.*, v. 92, p. 73-80.

- **Kruse Julia, Borchardt Thilo, Kostin Sawa, Braun Thomas, 2008**, Mitotic activities and massive changes of the cytoskeletal composition are important steps for a successful regeneration of the mechanical damaged newt heart
in Vorbereitung

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses interessanten Themas und für sein ständiges Interesse, seine motivierende Unterstützung und stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Dr. Friedemann Laube danke ich für die Einführung in die ersten Schritte des Umgangs mit den Molchen. Dr. Thilo Borchardt gilt mein besonderer Dank für seine große Begeisterung mit der er in das Molchprojekt miteingestiegen ist und seine wertvollen Ratschläge, Diskussionen und manigfaltigen Unterstützungen. Mario Looso und Patrick Weiss danke ich für die hervorragende bioinformatische Unterstützung und Auswertung der Microarraydaten. Henning Witt und Patrizia Ruiz danke ich für die Kooperation zur Herstellung der Molch-cDNA-Microarrays und die Anleitung für deren Hybridisierung. Dr. Thomas Kubin, Jutta Wetzel und Kerstin Richter danke ich für die Unterstützung und die Weitergabe ihres Know-hows bei den Western-Blots. Bei Jia Shen bedanke ich mich für die tatkräftige Unterstützung bei den Western-Blots und die Testung der umfangreichen Antikörpersammlung. Dr. Rene Zimmermann danke ich für die Überlassung des Zytokeratin 18-Plasmids und die Weitergabe von interessanter Fachliteratur. Dr. Sawa Kostin, Beate Grohmann und Renate Möhren danke ich für die Einführung in die "Geheimnisse der Immunfluoreszenzfärbungen" und die Unterstützung bei den semidünnen Ultramikrotomschnitten und der Histologie des Molchgewebes. Marion Wiesnet danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der primären Molchherzzellen.

Der gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe in Halle danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre dabei insbesondere Manja, Petra und Herbert für ihre guten Ratschläge und Hilfestellungen auch über die räumliche Entfernung hinweg bis nach Bad Nauheim!

Allen Arbeitsgruppen und Mitarbeitern des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung danke ich für die stetige Hilfsbereitschaft und angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei dem Labor 142 bedanke ich insgesamt für drei schöne Jahre und große Hilfsbereitschaft in vielerlei Hinsicht. Marianne danke ich für ihr stets offenes Ohr und guten Ratschläge in diversen Lebenslagen und ihre Gesellschaft während der Mittagspausen.

Meiner Familie und meinen Freunden in Oldenburg, Halle und Frankfurt danke ich für die moralische Unterstützung und Geduld während der gesamten Promotionszeit.