

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Würzburg  
Vorstand: Professor Dr. med. M. J. Lohse

**$\beta$ -adrenerge Signaltransduktion in kardial differenzierten  
embryonalen Stammzellen**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Carola Gärtner  
aus  
Heidenheim an der Brenz

Würzburg, Mai 2005

**Referent:** Professor Dr. med. M. J. Lohse

**Koreferent:** Professor Dr. med. W. Völker

**Dekan:** Professor Dr. med. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2006:**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

**meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit**





## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>A</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b> .....	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Das Modellsystem der Embryoid Bodies</b> .....	<b>1</b>
1.1	Die Entwicklung und Differenzierung von Embryoid Bodies.....	2
1.2	Kardiomyozytendifferenzierung in Embryoid Bodies.....	4
1.3	Kardiomyozytenaufbau .....	5
1.4	Selektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen .....	6
<b>2</b>	<b>Adenoviren als eine virale Möglichkeit des Gentransfers</b> .....	<b>7</b>
2.1	Infektionszyklus der Adenoviren .....	8
2.2	Adenoviraler Gentransfer in Kardiomyozyten.....	8
<b>3</b>	<b>Adrenerge Rezeptoren in Kardiomyozyten</b> .....	<b>10</b>
3.1	Adrenerge Rezeptorsubtypen in Kardiomyozyten.....	10
3.1.1	Physiologische Effekte der kardial exprimierten adrenergen Subtypen .....	10
3.2	Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor in Kardiomyozyten.....	12
3.2.1	Struktur des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.....	12
3.2.2	Signaltransduktion des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.....	13
3.2.3	Auswirkungen einer kardialen Überexpression von $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren .....	18
3.3	Entwicklung und Expression des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen .....	19
3.4	Die Rolle von Phosducin bei der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion ....	20
<b>4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>21</b>
<b>B</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b> .....	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>Material</b> .....	<b>23</b>
1.1	Medien, Stocklösungen und Puffer .....	23
1.1.1	Lösungen für die Zellkultur .....	23
1.1.2	Materialien für die Immunhistochemie.....	24
1.1.3	Materialien zur Bestimmung der Rezeptorexpression .....	25

## INHALTSVERZEICHNIS

---

1.1.4	Materialien für die funktionellen Assays .....	26
1.2	Zelllinien .....	26
1.2.1	Embryonale Stammzellen für die kardiale Differenzierung .....	26
1.2.2	Embryonale Stammzellen mit variabler Phosducin-Expression.....	26
1.3	Adenovirale Vektoren .....	27
1.4	Gerätschaften .....	27
<b>2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1	Kultivierung von embryonalen Stammzellen .....	28
2.1.1	Undifferenzierte embryonale Stammzellen .....	28
2.1.2	Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten.....	29
2.1.2.1	Direkte Differenzierung.....	29
2.1.2.2	Differenzierung in hängenden Tröpfchen.....	30
2.1.3	Selektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen .....	32
2.2	Immunhistochemie.....	32
2.2.1	Verwendete Antikörper.....	33
2.2.2	Versuchsdurchführung .....	33
2.3	Transfektion der aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten mit Adenoviren .....	34
2.3.1	Versuchsdurchführung .....	35
2.4	Bestimmung der Rezeptorexpression (Radioligandenbindungsassay) .....	35
2.4.1	Präparation von Membranen.....	37
2.4.2	Versuchsdurchführung .....	37
2.5	Funktionelle Assays .....	39
2.5.1	Messung der Kontraktionsfrequenz .....	39
2.5.1.1	Versuchsdurchführung.....	39
2.5.2	Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität.....	40
2.5.2.1	Versuchsdurchführung.....	40
2.6	Kardiale in vitro Differenzierung in Abhängigkeit von der Phosducin-Expression.....	41

## INHALTSVERZEICHNIS

---

2.6.1	Quantifizierung des Kontraktionsverlaufes bei unterschiedlicher Phosducinexpression .....	42
2.6.2	Messung der basalen Kontraktionsfrequenz .....	42
<b>C</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b> .....	<b>43</b>
<b>1</b>	<b>Die Differenzierung von Kardiomyozyten in Embryoid Bodies</b> .....	<b>43</b>
1.1	Differenzierung und Selektionierung der aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten .....	43
1.2	Fotodokumentation der Kardiomyozytendifferenzierung .....	44
1.3	Nachweis des Actinins in Abhängigkeit von dem Differenzierungsalter .....	47
<b>2</b>	<b>Charakterisierung der endogenen <math>\beta</math>-adrenergen Rezeptoren in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen der Maus</b> .....	<b>49</b>
2.1	Expression der endogenen $\beta$ -adrenergen Subtypen .....	49
2.2	Funktionelle Kopplung der endogenen $\beta$ -adrenergen Rezeptoren .....	50
2.2.1	$\beta$ -Rezeptor vermittelte Stimulation der Kontraktionsfrequenz .....	50
2.2.2	Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität .....	51
<b>3</b>	<b>Adenovirale Transfektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen</b> .....	<b>52</b>
3.1	Nachweis der Transfektionseffizienz des Ad5GFP-Virus in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen .....	52
3.2	Adenovirale Überexpression des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen .....	54
<b>4</b>	<b>Auswirkungen einer adenoviralen Überexpression des <math>\beta_1</math>-adrenergen Rezeptors</b> .....	<b>55</b>
4.1	Funktionelle Kopplung der $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorüberexpression in Abhängigkeit des Virustiters .....	55
4.2	Kontraktionsfrequenz in Bezug zu der $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorexpression .....	58

## INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>5</b>	<b>Phosducin-Klone .....</b>	<b>59</b>
5.1	Kardiomyozytendifferenzierung in Abhängigkeit von der Phosducinexpression.....	59
5.2	Basalfrequenz bei unterschiedlicher Phosducinexpression .....	61
<b>D</b>	<b><u>DISKUSSION</u> .....</b>	<b>62</b>
1	<b>Differenzierung der Kardiomyozyten in Embryoid Bodies .....</b>	<b>62</b>
2	<b>Endogene Expression von <math>\beta</math>-adrenergen Rezeptoren in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen.....</b>	<b>63</b>
3	<b>Adenovirale Transfektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen.....</b>	<b>66</b>
4	<b>Phosducin-Klone .....</b>	<b>70</b>
<b>E</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....</b>	<b>72</b>
<b>F</b>	<b><u>AUSBLICK</u>.....</b>	<b>74</b>
<b>G</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u>.....</b>	<b>76</b>
<b>H</b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u> .....</b>	<b>99</b>

## **DANKSAGUNG**

## **LEBENS LAUF**

## A Einleitung

### 1 **Das Modellsystem der Embryoid Bodies**

Die frühe Embryonalentwicklung des Säugers nach Einnistung des Keimes in der Uterusschleimhaut ist bisher noch wenig untersucht, da es außerordentlich schwierig ist, Embryonen früher Entwicklungsstadien im lebensfähigen Zustand für physiologische Studien zu gewinnen. In diese Lücke stößt das dreidimensionale *in vitro* Modellsystem der Embryoid Bodies (EBs) (Gossler et al., 1986), das sich vor allem bei der Erforschung früher Stadien der Postimplantationsentwicklung bewährt hat (Doetschmann et al., 1985).

Diese EBs werden *in vitro* durch die Aggregation von embryonalen Stammzellen gewonnen (siehe A 1.1). Sie können in großen Massen herangezogen werden und sind daher geeignet, um unter konstanten Bedingungen Studien über die Auswirkung Zelldifferenzierungs-modulierender bzw. embryotoxischer Einflüsse (Spielmann et al., 1997) an differenzierenden bzw. differenzierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) durchzuführen. Darüberhinaus sind sie zugänglich für pharmakologische und elektrophysiologische Untersuchungen (z.B. Analyse von kardioaktiven Substanzen (Pich et al., 1997; Wobus et al., 1991; Wobus et al., 1994; Wobus et al., 1997). Ein weiterer Vorteil ist, dass ES-Zellen genetisch manipuliert werden können (Doetschmann et al., 1986; Rathjen et al., 1998). Bestimmte Gene können deletiert (knock-out) (Fässler et al., 1995; Fässler & Meyer, 1996; Wobus & Kaomei 1998) oder neue Gene, beispielsweise Reportergene, in das Genom eingebracht werden (Kolossoff et al., 1998; Metzger et al., 1996; Wobus et al., 1997).

Da EBs unter Zellkulturbedingungen aus permanenten Zelllinien hergestellt werden, trägt dieses *in vitro* Modellsystem des Säugetierembryos dazu bei, kostenintensive und ethisch zum Teil nur schwer zu vertretende Tierversuche zu vermeiden.

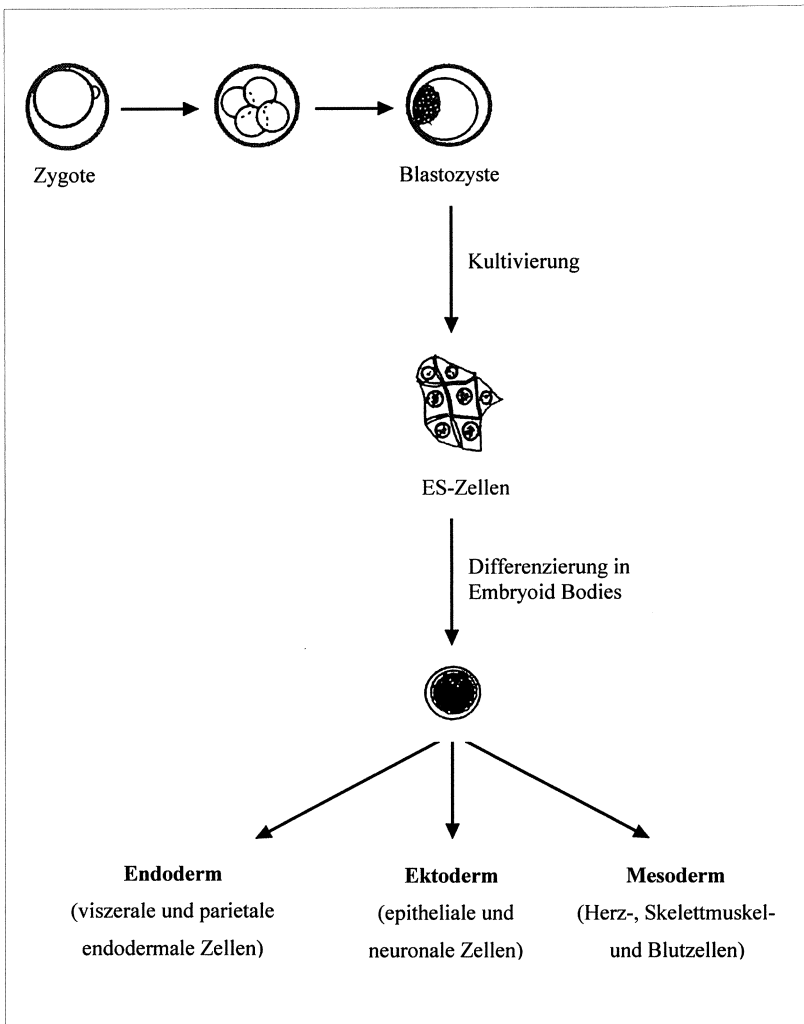
Die Attraktivität des EB-Modellsystems hat durch die Verwendung von menschlichen ES-Zelllinien weiterhin zugenommen (Reubinoff et al., 2000; Shambloott et al., 1998; Thomson et al., 1998), da sich die Möglichkeit eröffnet, eine Reihe von differenzierten

menschlichen Zellen (z.B. Kardiomyozyten, Neurone oder Insulin-sezernierende Zellen) zu gewinnen. Dies könnte ein Ansatzpunkt für autologe Transplantationen *in vitro* differenzierter Zellen sein (Kehat et al., 2001; Xu et al., 2002), falls diese Zellen in hoher Reinheit und ohne genetische Mutationen gewonnen werden könnten.

### **1.1 Die Entwicklung und Differenzierung von Embryoid Bodies**

Die EBs werden aus pluripotenten ES-Zellen der Maus gewonnen (Abbildung 1). Diese ES-Zellen stammen aus der inneren Zellmasse einer dreieinhalb Tage alten Blastozyste (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981) und können auf einer Unterlage embryonaler Fibroblasten (feeder layer) oder in Anwesenheit von Differenzierungsinhibitoren (leukemia inhibitory factor, LIF) in permanenter Zellkultur viele Passagen im undifferenzierten Zustand gehalten werden (Rohwedel et al., 1996; Wobus et al., 1991). In Abwesenheit von Differenzierungsinhibitoren (LIF) (Smith et al., 1987; Williams et al., 1988) wachsen ES-Zellen in Suspensionskultur zu multizellulären sphärischen Gebilden, den „Embryoid Bodies“ heran. Diese frühen Postimplantationsembryo-ähnlichen, embryonalen Gewebsstrukturen entwickeln innerhalb von drei bis acht Tagen Zelltypen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm und Mesoderm) (Doetschmann et al., 1985; Wobus et al., 1984). Weitere potentielle Differenzierungsmöglichkeiten in EBs sind die Entwicklung glatter (Drab et al., 1997) und quergestreifter (Rohwedel et al., 1994) Muskulatur sowie neuronaler (Bain et al., 1995; Strubing et al., 1995) und glialer (Angelov et al., 1998; Fraichard et al., 1995) Zellen. Des weiteren sind Kardiogenese (Maltsev et al., 1993; Wobus et al., 1991), Angiogenese (Vittet et al., 1996; Wartenberg et al., 1998), Hämatopoese (Kennedy et al., 1997; Wiles & Keller, 1991) und Lipogenese (Dani et al., 1997) zu beobachten.

Im Prinzip zeigen die verschiedenen ES-Zelllinien *in vitro* eine pluripotente Entwicklungsfähigkeit. Für eine maximale Differenzierung eines spezifischen Zelltyps wurden bestimmte Zelllinien und Kulturbedingungen (z.B. Anzahl der Zellen in den EBs, Zeit der EB-Plattierung, Medium, Mediumzusätze oder Wachstumsfaktoren) entwickelt (Tabelle 1) (Guan et al., 1999b).



**Abbildung 1: Differenzierung in Embryoid Bodies.** Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Mausblastozyste gewonnen. Diese ES-Zellen können mit Hilfe des Modellsystems der Embryoid Bodies in Zelltypen aller 3 Keimbblätter differenzieren.

	ES-Zelllinien									
	ABI	AB2.1	B117	BLC6	CCE	CGR8	D3	E14.1	J1	R1
Endotheliale Zellen	√	√					√			
Epitheliale Zellen							√			
glatte Muskelzellen	√	√					√			
Kardiomyozyten	√	√	√		√		√	√		√
neuronale Zellen				√		√	√		√	
quergestreifte Muskelzellen	√	√		√			√			

**Tabelle 1: Beispiele für ES-Zelllinien.** Sie können für die *in vitro* Differenzierung in bestimmte Zelltypen verwendet werden (Guan et al., 1999b).

## 1.2 Kardiomyozytendifferenzierung in Embryoid Bodies

Die bisherigen Daten über die EB-Differenzierung korrelieren mit der Entwicklung der Maus in frühen Postimplantations-Entwicklungsstadien.

Bei *in vitro* Differenzierungen entwickeln sich die ES-Zellen unter anderem in mesodermales Gewebe einschließlich Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen und glatten Muskelzellen (Robbins et al., 1982; Robbins et al., 1986). Kardiomyozyten repräsentieren eines der ersten funktionierenden Organe in der Mausentwicklung. Die Entwicklung der Skelettmuskulatur erfolgt später (Robbins et al., 1990).

Kontrahierende ES-Kardiomyozyten (10 bis 30 % der Auswachsfläche des EBs) sind schon einen Tag nach der Ausplattierung der EBs zu beobachten. Zwei bis zehn Tage nach der Ausplattierung zeigen bis zu 90 % der EBs kontrahierende Areale (Metzger et al., 1995; Wobus et al., 1991). Mit elektrophysiologischen Messungen der Aktionspotentiale und der Ionenströme wurde die Kardiomyozytendifferenzierung zum sinusoidalen (14 %), atrialen (38 %) und ventrikulären (48 %) Typ (Fässler & Meyer, 1996; Maltsev et al., 1993) sowie die Differenzierung zu Purkinje- und Schrittmacherzellen (Hescheler et al., 1997; Wobus et al., 1995; Wobus et al., 1997) beobachtet.



Im Vergleich zu fetalen Maus-Kardiomyozyten zeigen die *in vitro* differenzierten ES-Kardiomyozyten hinsichtlich der Expression und Eigenschaft der Ionenkanäle ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) übereinstimmende Merkmale (Doevendans et al., 2000; Maltsev et al., 1994). *In vitro* differenzierte ES-Kardiomyozyten exprimieren – zeitgleich zu der Entwicklung im Uterus – herzspezifische Gene wie beispielsweise  $\alpha$ - und  $\beta$ -MHC (cardiac myosin heavy chain) (Sanchez et al., 1991), MLC 2V (myosin light chain 2V) (Miller-Hance et al., 1993) und Phospholamban (Ganim et al., 1992).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen, welche die typischen kardialen Morphologiemerkmale (z.B. sarkomere Struktur) in ES-Kardiomyozyten darstellen (Doetschmann et al., 1985; Westfall et al., 1997), bestätigen weiter, dass die Differenzierung von Kardiomyozyten aus ES-Zellen der *in vitro* Situation im embryonalen Herz der Maus entspricht.

### **1.3 Kardiomyozytenaufbau**

Kardiomyozyten bestehen aus langen, quergestreiften und in der Regel verzweigten Einzelzellen, die parallel zueinander verlaufen. Die End-zu-End-Verbindungen zwischen zwei Kardiomyozyten werden als Disci intercalares (Glanzstreifen) bezeichnet. Auf dieser Höhe sind die Gap junctions lokalisiert, welche die kommunizierende Verbindung zwischen zwei Kardiomyozyten darstellen. Aus diesem Grund kann das Myokardgewebe als ein funktionelles Synzytium bezeichnet werden.

Die kleinste Untereinheit, die sich in einer quergestreiften Myofibrille regelmäßig wiederholt, wird als Sarkomer bezeichnet und hat eine Länge von etwa 1,5 bis 2,2  $\mu\text{m}$ . Eine Myofibrille besteht wiederum aus dicken (Myosin) und dünnen (Aktin) Myofilamenten. Dabei setzt sich das Aktinfilament aus 3 Proteinen – Aktin, Tropomyosin und Troponin – zusammen, wohingegen das Myosinfilament aus Myosinmolekülen besteht, die viel größer als die anderen genannten Proteine sind. Myosin und Aktin nehmen zusammen 55 % des Muskel-Gesamtproteins ein. Andere Proteine, wie z.B.  $\alpha$ -Actinin, Desmin und Vimentin, sind in kleineren Mengen vorhanden.

Während der frühen *in vitro* Kardiomyogenese von ES-Zellen werden die sarkomerischen Proteine in einem entwicklungsabhängigen Muster in folgender Reihenfolge organisiert: Titin (Z-Streifen),  $\alpha$ -Actinin, Myomesin, Titin (M-Streifen), sarkomerisches MHC, sarkomerisches  $\alpha$ -Aktin und kardiales Troponin T. Die myofibrilläre Lokalisierung des M-Proteins (M-Zone) kann erst in dem terminalen Differenzierungsstadium nachgewiesen werden. Dieser Prozess der myofibrillären Organisation ist auf eine Vielzahl von Signalen empfindlich, wie beispielsweise auf Neurotransmitter, Hormone sowie auf verschiedene Mediumkomponenten (Guan et al., 1999a).

#### **1.4 Selektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

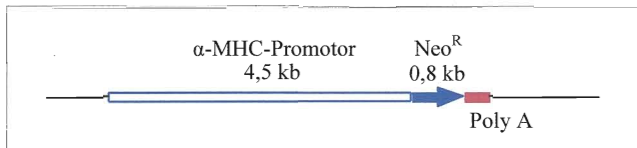
Ein Problem der *in vitro* Differenzierung ist der geringe Prozentsatz von kardial differenzierten ES-Zellen (ungefähr 5 %) in einer EB-Zellpopulation (Hughes, 2002; Metzger et al. 1995). Durch eine einfache genetische Manipulation der ES-Zellen wurde ein Selektionsverfahren für eine nahezu reine ES-Kardiomyozytenkultur entwickelt (Klug et al., 1996). Bei diesem Verfahren wird zunächst aus undifferenzierten ES-Zellen eine stabil transfizierte ES-Zelllinie generiert. Für die Transfektion wird ein Plasmid verwendet (Abbildung 2), das ein Fusionsgen aus dem Promotor des kardialen  $\alpha$ -MHC-Gens und der cDNA des resistenz-vermittelnden Gens Aminoglycosidphosphotransferase enthält.

Die entwicklungsabhängige Aktivierung des kardialen  $\alpha$ -MHC-Promotors ist *in vitro* abhängig von der Anzahl der Zellen im EB und variiert zwischen dem fünften (Guan et al., 1999a; Hescheler et al., 1997) und siebten (Kolossoff et al., 1998; Maltsev et al., 1993; Maltsev et al., 1994) Differenzierungstag. Ab dem siebten Tag ist die  $\alpha$ -MHC-Expression unabhängig von der Anzahl der ES-Zellen im EB (Maltsev et al., 1993) und das weitere Expressionsmuster reflektiert die *in vivo* Situation in dem sich entwickelnden Mausembryo (Lompre et al., 1984; Metzger et al., 1995).

In der mit dem Transgen stabil transfizierten ES-Zelllinie überleben also bei Zugabe des Selektionsmarkers (G418 Sulfat) ab dem siebten Differenzierungstag nur diejenigen Zellen, die sich kardial entwickeln und über den  $\alpha$ -MHC-Promotor das Resistenzgen

exprimieren. Mit dieser Methode konnten sehr reine ES-Kardiomyozytenkulturen gewonnen werden (99,6 %). Dabei hat die Expression des Transgens keinen negativen Einfluss auf die Kardiomyogenese, wie durch die spontane kontrahierende Aktivität sowie die Fähigkeit, intrakardiale Verbindungen in adulten Mäuseherzen zu bilden, gezeigt wurde (Klug et al., 1996).

Inzwischen können mit einer Modifikation dieses Selektionsverfahrens spezifisch ventrikuläre ES-Kardiomyozyten gewonnen werden (Müller et al., 2000).



**Abbildung 2: Plasmid für die Selektion von kardial differenzierten ES-Zellen.** Die Expression der Aminoglycosidphosphotransferase (Neo<sup>R</sup>) erfolgt über den α-MHC-Promotor. Am 3' Ende sind Poly-A Sequenzen für die Polyadenylierung der mRNA des Transgens angefügt.

## 2 Adenoviren als eine virale Möglichkeit des Gentransfers

Adenoviren wurden ursprünglich als zytopathogenes Agens in Zellkulturen menschlicher Tonsillen entdeckt und 1953 durch Rowe et al. (Rowe et al., 1953) charakterisiert. Diese Viren, die zur Familie der Adenoviridae gehören, wurden später auch bei vielen Säugern gefunden. Mittlerweile sind mehr als 80 serologisch unterscheidbare Serotypen gefunden und charakterisiert worden, die in die Gruppen A-F eingeteilt werden. Adenoviren sind membranlos und setzen sich aus einem inneren, komplex aufgebauten DNA-Protein-Zentralkörper (Core) und einer äußeren, ikosaederförmigen Proteinhülle (Kapsid) zusammen. Das genetische Material der Adenoviren besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA (36 kb), die etwa für 15 Proteine kodiert (Horwitz, 1990).

## **2.1 Infektionszyklus der Adenoviren**

Adenoviren sind fähig, ein breites Spektrum sowohl replizierender als auch nicht-replizierender Zellen zu infizieren (Horwitz, 1990).

Der Infektionszyklus lässt sich in zwei Phasen gliedern:

- (1) Während der frühen Phase werden virusspezifische Enzyme synthetisiert, die unter anderem für die Replikation viraler Nukleinsäuren benötigt werden.
- (2) In der späten Infektionsphase (bis ca. 36 Stunden nach der Infektion), die mit der Replikation der viralen DNA beginnt, werden vor allem die zellulären Funktionen weitgehend unterdrückt und die für die Strukturproteine codierenden, viralen Gene exprimiert.

Nach der erfolgreichen Infektion lysieren Adenoviren die infizierte Zelle. Pro Wirtszelle entstehen innerhalb von 36 bis 72 Stunden etwa 200.000 neue Viruspartikel. Diese Lyse der Wirtszelle kann durch das Ausschalten der E1A- und E1B-Regulationsgene, über die die virale Genexpression und Replikation gesteuert wird, verhindert werden. Durch diesen Verlust der Replikationsfähigkeit konnten die Adenoviren als sichere Vektoren für den Gentransfer verwendet werden.

## **2.2 Adenoviraler Gentransfer in Kardiomyozyten**

Die mögliche Verwendung von Viren für einen Gentransfer wurde 1966 von Tatum in New York vorausgesagt. In den 80er Jahren entwickelten unabhängig voneinander drei verschiedene Gruppen rekombinante Retroviren, die als Vektoren für den Gentransfer verwendet wurden (Shimotohno & Temin, 1981; Tabin et al., 1982; Wei et al., 1981). Allerdings sind Retroviren nur bei mitotisch aktiven Zellen verwendbar.

Neben dem Gentransfer mit viralen Vektoren existieren auch nonvirale Methoden, die durch eine geringere Effizienz gekennzeichnet sind. Versuche mit einer direkten intramuskulären Injektion von Plasmid-DNA in das Myokard zeigen lediglich eine 0,03 %-ige Expression des in die adulten Kardiomyozyten injizierten Transgens (Kitsis et al., 1993). Außer diesem Verfahren gibt es eine Reihe von anderen nonviralen Methoden (z.B. Mikroinjektion, liposomale Transfektion, Elektrotransfektion u.a.), die aber nicht effizient genug sind, um Transgene in sich nicht teilenden Zellen mit einer

guten Expressionsrate einzuschleusen. Aus diesem Grund fokussierte sich die Aufmerksamkeit insbesondere auf die Verwendbarkeit von Adenoviren aufgrund ihrer Fähigkeit, postmitotische Zellen – inklusive adulte Kardiomyozyten – effizient zu infizieren (Kirshenbaum et al., 1993).

Mit standardisierten rekombinanten DNA-Techniken kann das adenovirale Genom manipuliert werden, wodurch die Einfügung eines Fremdgens (zwischen 8 und 10 kb) ermöglicht wird (Berkner, 1998; Schneider & French, 1993). Im Vergleich zu der Injektion der Plasmid-DNA ist eine direkte myokardiale Injektion des rekombinanten Adenovirus in adulte Rattenherzen über 5.000-fach effizienter (Kass-Eisler et al., 1993). Auch ist eine Applikation der Viren über die Koronararterien möglich (Barr et al., 1994; Hajjar et al., 1998). Der Unterschied dieser zwei Techniken zeigt sich in der Expressionsverteilung des Transgens. Die intramyokardiale Injektion des Virus erzielt eine gute lokale Genaussaat, die aber auf ein Gebiet von 1 bis 2 mm um die injizierende Nadel begrenzt bleibt. Dagegen zeigt die Applikation in die Koronarien eine weniger effektive, aber diffusere Verteilung des Transgens. Neben diesen *in vivo* Methoden können isolierte fetale und adulte Kardiomyozyten auch *in vitro* mit dem rekombinanten Adenovirus infiziert werden. Dabei wird in diesen Primärkulturen eine hohe Expressionrate erzielt (> 95 %) (Gojo et al., 1997; Zhou et al., 2000a).

Ungefähr 15 Jahre nach der ersten Verwendung von viralen Vektoren beschrieb Rust et al. (Rust et al., 1997) einen adenoviral vermittelten Gentransfer in ES-Kardiomyozyten. Dabei zeigten die ES-Kardiomyozyten eine stabile Expression des Transgens (bakterielles LacZ Gen), wobei die Transfektion offenbar keinen negativen Effekt auf die Kardiomyogenese und kontraktile Funktion hatte. Ferner konnte festgestellt werden, dass die Transfektionseffizienz mit zunehmendem Differenzierungsalter anstieg (v.a. ab dem 10. Tag), wobei sie aber mit maximal 27 % deutlich unter der Expressionsrate der Primärkultur lag.

Trotz der nachweisbaren *in vivo* und *in vitro* Expression des Transgens bringen Adenoviren im Vergleich zu Retroviren das Genmaterial nicht in einer dauerhaft stabilen Form in den Zellkern ein. Verschiedene Faktoren, wie beispielsweise zytotoxische T-Zellen und andere Entzündungszellen, tragen dazu bei, dass die

Expression der viralen DNA und des Transgens zwar initial hoch ist, dann aber innerhalb von zwei bis vier Wochen rasch abfällt (Yang et al., 1994).

### **3 Adrenerge Rezeptoren in Kardiomyozyten**

#### **3.1 Adrenerge Rezeptorsubtypen in Kardiomyozyten**

Die Aktivierung von kardial exprimierten adrenergen Rezeptoren (AR) – beispielsweise durch Katecholamine – spielt eine wesentliche Rolle in der schnellen Regulation der myokardialen Funktion.

Eine erste Unterteilung in  $\alpha$ - und  $\beta$ -AR wurde 1948 durch den Pharmakologen Ahlquist aufgrund der unterschiedlichen Wirkprofile verschiedener Adrenalinderivate durchgeführt (Ahlquist, 1948). Ahlquist's Klassifikation wurde etwa 20 Jahre später auf die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen bzw.  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -adrenergen Subtypen ausgedehnt (Lands et al., 1967; Starke et al., 1974; Langer, 1974). In den folgenden Jahren wurde gezeigt, dass der in den Kardiomyozyten vorherrschend exprimierte AR dem  $\beta_1$ -AR Subtyp entsprach. Zu dieser Zeit wurden mögliche Einflüsse von anderen adrenergen Subtypen auf die Katecholamin-Effekte am Herzen weitgehend ignoriert.

Heute weiß man, dass die Kardiomyozyten mindestens fünf Typen der ARs, die alle zu der G-Protein gekoppelten Rezeptorfamilie (GPCR) gehören, exprimieren. Man unterscheidet zwischen drei  $\beta$ -adrenergen Subtypen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ ) und zwei  $\alpha_1$ -adrenergen Subtypen ( $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1B}$ ) (Chalothorn et al., 2003; O'Connell et al., 2003).

Obwohl die quantitative Expression der adrenergen Subtypen spezie-spezifisch ist, ist in der Regel der  $\beta_1$ -AR der vorherrschende Subtyp in Kardiomyozyten (Xiang & Kobilka, 2003). In den meisten Spezies exprimieren die kardialen Myozyten keine  $\alpha_2$ -adrenergen Subtypen.

##### **3.1.1 Physiologische Effekte der kardial exprimierten adrenergen Subtypen**

Die verschiedenen Effekte der  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Rezeptor-Aktivierung beruhen auf der Kopplung an unterschiedliche G-Proteine beziehungsweise der von ihnen aktivierten Signalwege.

Der  $\beta_1$ -AR hat *in vivo* und *in vitro* die bestimmende Rolle in der Regulierung von Herzfrequenz und Kontraktionskraft in der Maus (Devic et al., 2001; Rohrer et al., 1999). Deren Zunahme wird dabei über einen cAMP-abhängigen Mechanismus (siehe A 3.2.2) erreicht (Sabri et al., 2000). Eine chronische Stimulation des  $\beta_1$ -ARs induziert eine Kardiomyozyten-Apoptose, deren Signalweg noch nicht vollständig geklärt ist (Bisognano et al., 2000; Zhu et al., 2003).

Im Gegensatz dazu resultiert aus einer Aktivierung des  $\beta_2$ -ARs ein anti-apoptotischer Effekt, welcher durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins ( $G_i$ ) in adulten Maus-Kardiomyozyten vermittelt wird (Singh et al., 2001; Zhu et al., 2001).

Außer an  $G_i$  koppelt der  $\beta_2$ -AR auch an stimulatorische G-Proteine ( $G_s$ ). Unter physiologischen Bedingungen zeigte sich kein messbarer Effekt auf die Kontraktionsfrequenz (Rohrer et al., 1996), hinsichtlich der Kontraktilität liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (Xiao, 2000; Kaumann & Lemoine, 1987). Im alternden Herzen und bei Herzinsuffizienz, bei denen eine selektive Down-Regulation der  $\beta_1$ -ARs vorliegt, nimmt der  $\beta_2$ -adrenerge Mechanismus durch Unterstützung der Inotropie an Wichtigkeit zu (Bristow et al., 1986; White et al., 1994).

Die  $\beta_3$ -ARs machen in dem humanen und murinen Herzen quantitativ die geringste Menge der  $\beta$ -adrenergen Subtypen aus. Ihre physiologische Rolle bei der Regulation der kardialen Funktion ist bisher schlecht verstanden. Vermutlich bewirkt eine  $\beta_3$ -adrenerge Stimulation über einen  $G_i$ -abhängigen Mechanismus eine Reduktion der kardialen Kontraktionskraft (Gauthier et al., 1996) und der spontanen Frequenz (Xiang & Kobilka, 2003).

Bei den  $\alpha_1$ -Subtypen spielen die  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -adrenergen Rezeptoren die Hauptrolle in der Regulierung der kardialen Myozytenfunktion (Chalothorn et al., 2003; Piascik & Perez, 2001; Steinberg, 2002; Tanoue et al., 2003). Diese Rezeptorsubtypen aktivieren ein breites Spektrum von Signalwegen durch die Kopplung an G-Proteine der  $G_q$ -Familie sowie an Pertussistoxin-sensitive G-Proteine (Chalothorn et al., 2003; Xiang & Kobilka, 2003). Die akuten Effekte einer  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulierung auf die

kontraktilen Eigenschaften des Herzens sind komplex und hängen von der untersuchten Spezies ab (Steinberg, 2002). Neue Ergebnisse deuten daraufhin, dass vor allem der  $\alpha_{1B}$ -AR an der Regulation des kardialen Wachstums und der kontraktilen Funktion beteiligt ist (Chalothorn et al., 2003), wohingegen ein kurzzeitiger negativer chronotroper Effekt durch den  $\alpha_{1A}$ -Subtyp entdeckt wurde (Hattori & Kanno, 1998). Darüberhinaus schützt eine Aktivierung der Proteinkinase C durch  $\alpha_1$ -AR die Kardiomyozyten gegen ischämische Verletzungen (Chen et al., 1999).

### **3.2 Der $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor in Kardiomyozyten**

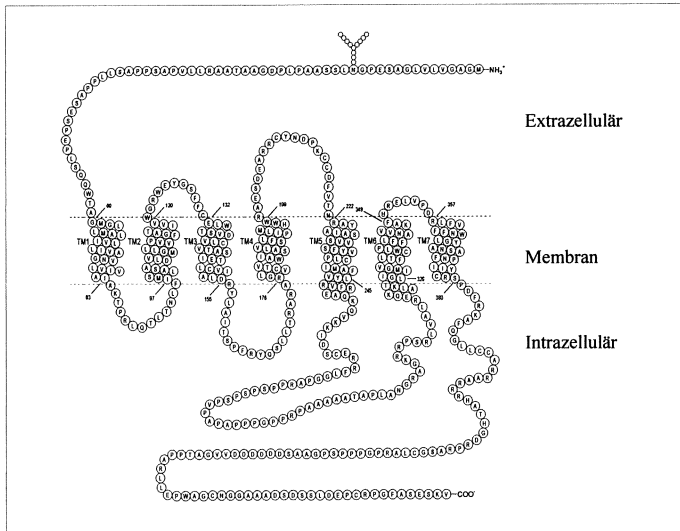
#### **3.2.1 Struktur des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors**

Der  $\beta_1$ -AR, der in allen Kammern des Herzens nachgewiesen werden kann (Brodde, 1991), ist ein aus 477 Aminosäuren bestehendes Membranprotein (Frielle et al., 1987), das sieben hydrophobe Bereiche aus jeweils 20 bis 28 Resten aufweist. Diese sieben transmembranären  $\alpha$ -Helices sind über drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden und ringförmig in der Membran angeordnet, so dass eine Tasche entsteht, in der die jeweiligen Liganden (z.B. Katecholamine), gebunden werden können (Strader et al., 1989).

Im Vergleich zu dem am besten charakterisierten  $\beta_2$ -AR zeigt der  $\beta_1$ -AR eine Homologie von 48,9 % (Dzimiri, 1999); dabei sind die meisten Übereinstimmungen in den Transmembran-Helices lokalisiert.

Frielle et al. lokalisierten das Gen des  $\beta_1$ -AR bereits 1987 auf dem Chromosom 10 (Frielle et al., 1987).





**Abbildung 3: Topologie des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.** Jeder Kreis entspricht einer Aminosäure. Die Y-Struktur an der N-terminalen Domäne symbolisiert die Glycosylierungsstelle des  $\beta_1$ -ARs. Für die Ligandenbindung spielen die transmembranären Helices (TM1-7) eine maßgebliche Rolle. Die intrazellulären Schleifen sind für die G-Protein-Interaktion verantwortlich.

### 3.2.2 Signaltransduktion des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors

Die Signalübertragung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren besteht aus drei wesentlichen Komponenten:

- (1) dem Rezeptor in der Plasmamembran mit sieben transmembranären Helices,
- (2) einem GTP-bindenden Protein (G-Protein), das mit dem aktivierten Rezeptor interagiert,
- (3) einem Enzym oder Ionenkanal in der Plasmamembran, das von dem G-Protein aktiviert wird und einen intrazellulären second messenger erzeugt.

Jede der drei Komponenten ist Angriffspunkt für regulatorische Mechanismen, die deren Aktivität beeinflussen können.

Die Bindung eines Liganden – beispielsweise von Adrenalin – an eine tief in der Membran gelegenen Stelle auf dem  $\beta_1$ -AR löst eine Konformationsänderung in der intrazellulären Domäne des  $\beta_1$ -ARs aus, die seine Wechselwirkung mit dem G-Protein in der Signalübertragungskette beeinflusst.

Dieses zweite Protein ist ein GTP-bindendes, stimulatorisches G-Protein ( $G_s$ ), das auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran lokalisiert ist. G-Proteine sind Trimerer aus drei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ), die nicht kovalent assoziiert sind. Durch die Bindung des Liganden katalysiert der  $\beta_1$ -AR den Austausch des gebundenen GDP durch GTP und überführt so  $G_s$  in seine aktive Form. Dann dissoziiert der  $\beta\gamma$ -Komplex ( $G_{\beta\gamma}$ ), und die  $\alpha$ -Untereinheit ( $G_{s\alpha}$ ) wandert mit dem gebundenen GTP in der Membranebene vom Rezeptor zu einem benachbarten Adenylatzyklase-Molekül. Dabei fixiert ein kovalent gebundenes Lipid  $G_{s\alpha}$  an der Membran. Nur im aktiven Zustand (Bindung des GTP an der Nukleotidbindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit) kann das  $G_s$  die Adenylatzyklase aktivieren; solange GDP gebunden ist, ist  $G_s$  inaktiv (Gilman, 1987).

Das aktive Zentrum der Adenylatzyklase, die ein integraler Bestandteil der Plasmamembran ist, befindet sich auf der Zytosolseite. In Säugetieren gibt es neun Isoformen der Adenylatzyklase (Taussig & Gilman, 1995), wobei die vorherrschenden Isoformen, die in Kardiomyozyten exprimiert werden, die Typen fünf und sechs sind (Ostrom et al., 2000; Steinberg, 1999). Die Adenylatzyklase-Aktivität unterliegt in Kardiomyozyten mehreren Regulationen. Der  $\beta_1$ -AR ist dabei der primäre positive Regulator, wohingegen muskarinische cholinerge Rezeptoren als primäre negative Regulatoren agieren (Ostrom et al., 2000). Durch die Assoziation des aktiven  $G_{s\alpha}$  mit der Adenylatzyklase katalysiert das Enzym die Bildung von zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) aus ATP, wodurch die cAMP Konzentration im Zytosol ansteigt. Diese Stimulation durch  $G_{s\alpha}$  inhibiert sich von selbst, da  $G_{s\alpha}$  eine GTPase ist, die ihr gebundenes GTP in GDP umwandelt und sich dadurch abschaltet. Das jetzt inaktivierte  $G_{s\alpha}$  löst sich von der Adenylatzyklase und inaktiviert so das Enzym. Erst wenn  $G_{s\alpha}$  sich erneut mit  $G_{\beta\gamma}$  verbindet, kann  $G_s$  wieder mit einem Liganden-gebundenen Rezeptor reagieren.

Das produzierte cAMP, der intrazelluläre second messenger dieses Systems, ist nur kurzlebig. Es wird schnell von zyklischen Nukleotid-Phosphodiesterasen (PDE) zu Adenosin-5'-monophosphat (5'-AMP) abgebaut, das nicht mehr als second messenger wirkt. Das intrazelluläre Signal hat daher nur so lange Bestand, wie der Ligand am  $\beta_1$ -AR gebunden ist. Methylxanthine wie Coffein oder Theophyllin hemmen die PDE. Auf diese Weise verlängern sie die Halbwertszeit von cAMP und verstärken so Substanzen, die aufgrund einer Stimulation der Adenylatzyklase wirken.

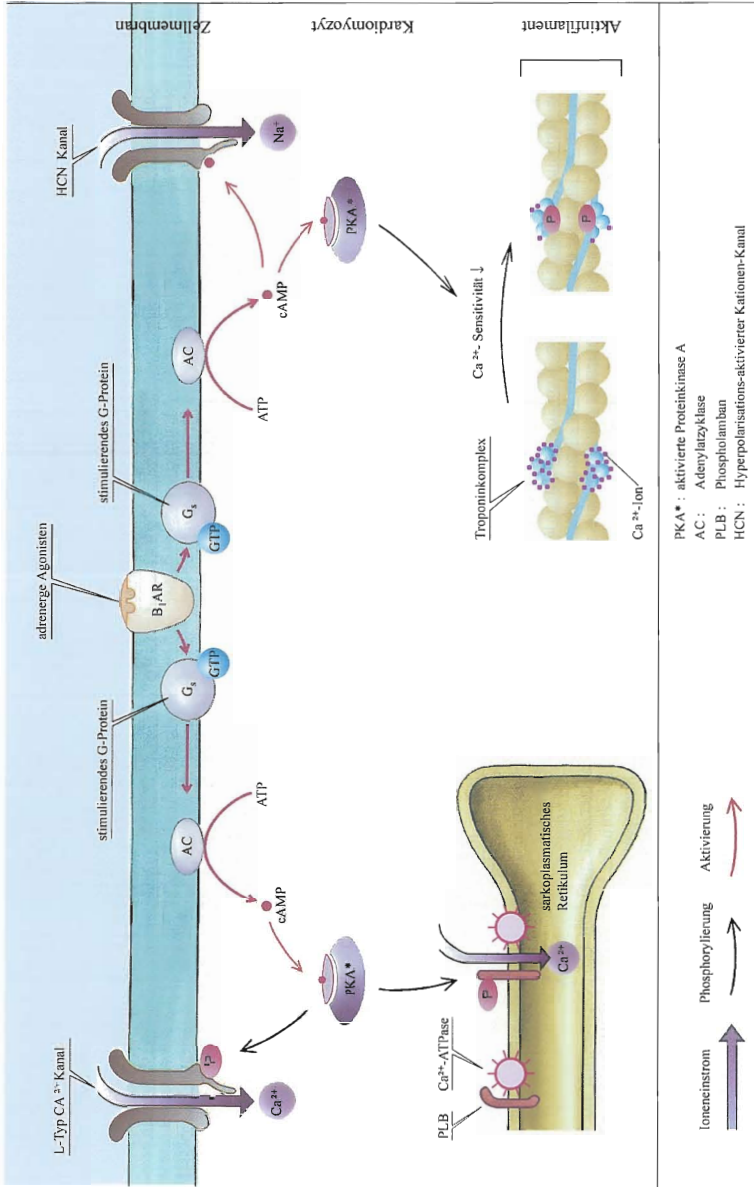
Die cAMP-abhängige Proteinkinase, auch Proteinkinase A (PKA) genannt, die durch cAMP allosterisch aktiviert wird, katalysiert die Phosphorylierung der Zielproteine. Die inaktive Form von PKA setzt sich aus zwei katalytischen (C) und zwei regulatorischen (R) Untereinheiten zusammen. Wenn cAMP an die beiden Stellen auf jeder R-Untereinheit bindet, ändert die R-Untereinheit ihre Konformation, und der  $R_2C_2$ -Komplex zerfällt in einen  $R_2$ -Komplex und in zwei freie, katalytisch aktive C-Untereinheiten.

Obwohl die Zielproteine, die über eine cAMP-abhängige Phosphorylierung gesteuert werden, verschiedene Funktionen haben, verfügen sie alle über einen ähnlichen Sequenzbereich, in dem Serin- oder Threonin-Reste phosphoryliert werden.

Diese Signalübertragung bewirkt unter normalen physiologischen Bedingungen durch eine Katecholamin-induzierte Aktivierung des  $\beta_1$ -ARs eine positive Chronotropie, Inotropie und Lusitropie am Herzen (Steinberg, 1999).

- (1) Der second messenger cAMP hat PKA-unabhängig einen direkten Einfluss auf die Chronotropie der Kardiomyozyten. Der in Schrittmacherzellen lokalisierte Hyperpolarisations- und zyklisches Nukleotid-aktivierter Kationen-Kanal (HCN-Kanal) bewirkt durch einen Natriumeinstrom die spontane Depolarisation. Durch die intrazelluläre Bindung des cAMP's an den HCN-Kanal wird der Natriumeinstrom verstärkt und somit die Zeit, bis ein neues Aktionspotential entstehen kann, verkürzt (Ludwig et al., 1998).
- (2) Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Kanalproteinen des L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanals bewirkt durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit einen

- Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die Zelle (Ochi & Kawashima, 1990). Dies ist für die Vermittlung des inotropen Effekts verantwortlich (Hartzell et al., 1991).
- (3) Weiterhin phosphoryliert die PKA Phospholamban (Rapundalo et al., 1989), wodurch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum gesteigert wird. Die dadurch bedingte schnelle Erniedrigung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt, dass die maximale Relaxationsgeschwindigkeit zunimmt (Xiao, 2000).
  - (4) Durch die PKA-abhängige Phosphorylierung der Myosinfilamentproteine Troponin I und C Protein wird eine Reduktion der Myofilament-Sensitivität zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erreicht. Dies führt zu einer Verkürzung der Relaxationszeit in der Herzmuskelzelle (Li et al., 2000; Zhang et al., 1995).



**Abbildung 4: Der  $\beta_1$ -adrenerge Signalweg in Kardiomyozyten.** Die Ligandenbindung führt zur Dissoziation des G-Proteins, wodurch in der enstandenen  $\alpha$ -Untereinheit GDP durch GTP ersetzt wird. Diese GTP-bindende  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert die Adenylatzyklase, die wiederum die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert. Dieser second messenger kann einerseits durch die Bindung an den HCN-Kanal den  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die kardiale Zelle erhöhen (*chronotroper Effekt*); andererseits aktiviert cAMP die PKA, die wiederum ATP-abhängig folgende Zielproteine phosphoryliert:

- (1) Phosphorylierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals: Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms in die kardiale Zelle (*inotroper Effekt*)
- (2) Phosphorylierung des PLB: Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das sarkoplasmatische Retikulum (*lusitroper Effekt*)
- (3) Phosphorylierung des Troponinkomplexes: Reduktion der Myofilament-Sensitivität gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (*lusitroper Effekt*)

(modifiziert nach Klinke & Silbernagel, 1996)

### 3.2.3 Auswirkungen einer kardialen Überexpression von $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren

In den vergangenen Jahren wurden die Effekte einer kardialen Überexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in transgenen Tiermodellen untersucht (Bertin et al., 1993; Bisognano et al., 2000; Engelhardt et al., 1999; Zolk et al., 1998). Dabei zeigte der überexprimierte  $\beta_1$ -AR eine funktionelle Kopplung an das  $G_s$ -Protein und somit eine Agonisten-stimulierte Aktivierung dieses Signalweges (Bertin et al., 1993). Bei Messungen der Agonisten-stimulierten Frequenz und Kontraktilität wurde *in vivo* und *in vitro* ein Sensitivitätsanstieg der atrialen transgenen Herzen auf Katecholamine beobachtet. Es konnte gezeigt werden, dass in transgenen Tieren die Basalfrequenz altersunabhängig *in vivo* höher als bei den Wildtyp-Herzen ist (Engelhardt et al., 1999). Diese Beobachtung ließ sich nicht am isolierten Vorhof bestätigen, in dem lediglich eine Sensitivitätserhöhung bei gleichbleibender basaler und maximaler Frequenz vorlag (Engelhardt et al., 1999; Zolk et al., 1998). Daraus kann geschlossen werden, dass der Anstieg der basalen Herzfrequenz *in vivo* nicht durch eine konstitutive Aktivität der transgenen Rezeptoren hervorgerufen wird, sondern auf der basalen Katecholamin-Stimulation beruht.

Die kardiale  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression führt zunächst zu einer kurzfristigen Verbesserung der kardialen Funktion, nimmt aber mit zunehmendem Alter der Mäuse ab und mündet schließlich in eine progressive Herzinsuffizienz mit funktionellen und

histologischen Defiziten, die typisch für eine humane Herzinsuffizienz sind (z. B. Aszites) (Engelhardt et al., 1999). Dieser histopathologische Phänotyp, der durch eine Myozytenhypertrophie und eine interstitielle Fibrose gekennzeichnet ist, geht mit einer erhöhten Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax einher. Dabei könnte der Apoptose-Anstieg zu der fortschreitenden ventrikulären Dysfunktion beitragen. Ferner haben die transgenen Mäuse ein erhöhtes Risiko eines plötzlichen Herztods (Bisognano et al., 2000).

### **3.3 Entwicklung und Expression des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

Die Entwicklung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade wird seit einigen Jahren von vielen Forschungsgruppen untersucht, da es auch inzwischen gute experimentelle Hinweise dafür gibt, dass die kardiale Hypertrophie sowie die Herzinsuffizienz mit einer Reexpression von Genmerkmalen des embryonalen Herzens assoziiert sind (Sack et al., 1996; Townsend et al., 1995). Typische Merkmale von Kardiomyozyten eines insuffizienten Herzens sind eine reduzierte Funktion der  $\beta$ -ARs (Ungerer et al., 1993), eine verminderte Aktivität der Adenylatzyklen (Ping et al., 1997) und eine veränderte Expression der G-Proteine (Insel & Ransnas, 1988).

Die beobachtete *in vitro* Kardiomyogenese in kardial differenzierenden ES-Zellen ist vergleichbar mit dem Mausembryo des frühen Entwicklungsstadiums (Maltsev et al., 1999). Dabei kommt es während des frühen Stadiums der Kardiomyogenese zu einem wichtigen Wechsel in der funktionellen Expression von Komponenten der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade; beispielsweise zeigen fetale Mausherzen am 13. Differenzierungstag noch keine Reaktion auf eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation, obwohl eine  $\beta$ -AR- und Adenylatzyklase-Expression vorliegt (Chen et al., 1979; Chen et al., 1982). Auch in den ES-Kardiomyozyten ist im frühen Differenzierungsstadium (9. Tag) noch kein Ansprechen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals auf die Stimulation mit Isoprenalin nachweisbar. Erst ab dem 12. Differenzierungstag beginnen die Zellen mit einem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms auf die  $\beta$ -adrenerge Stimulation zu reagieren, mit einem maximalen Effekt

am 17. Differenzierungstag (An et al., 1996; Maltsev et al., 1999). Daraus folgt, dass die funktionelle Sensitivität der  $\beta$ -adrenergen Stimulation hinter der Rezeptorexpression zurückbleibt (Wobus et al., 1991). Eine Erklärung für den Mangel der  $\beta$ -adrenergen Modulation könnte eine niedrige Expression des PKA Holoenzym (An et al., 1996) oder eine niedrige  $G_s$ -Expression und/oder ein abgekoppeltes  $G_s$ -Protein (Maltsev et al., 1999) sein.

Während dieser embryonalen Kardiomyogenese bleibt die Affinität zu  $\beta$ -adrenergen Agonisten und Antagonisten konstant (Chen et al., 1979).

### **3.4 Die Rolle von Phosducin bei der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion**

Seit längerem ist bekannt, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Rezeptorebene reguliert werden können (Benovic et al., 1986; Hausdorff et al., 1990; Lohse et al., 1990). In jüngster Zeit wurden auch regulatorische Mechanismen für das G-Protein-Niveau beschrieben. Dort gibt es zwei Klassen von G-Protein-Regulatoren: Proteine, welche  $G_\alpha$  beeinflussen, sowie Proteine, die sich auf den  $\beta\gamma$ -Komplex des G-Proteins auswirken (Lohse, 1999). Unter den Regulatoren von  $G_\alpha$  überwiegt die Gruppe der RGS-Proteine („regulators of G-protein signalling), welche an  $G_\alpha$  binden, die GTP-Hydrolyse beschleunigen und somit das inaktive Stadium der G-Proteine unterstützen (Wieland & Chen, 1999).

Ein primärer Regulator des  $\beta\gamma$ -Komplexes ist Phosducin, ein zytosolisches Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 33 kDa (Lee et al., 1987). Die Entdeckung von Phosducin in retinalen Photorezeptoren (Sehstäbchen) wurde 1977 durch Lolley (Lolley et al., 1977) beschrieben. Neben der Retina wurde in der Glandula pinealis die höchste Phosducin-Konzentration gefunden (Reig et al., 1990). Jedoch ist Phosducin ein ubiquitäres Protein, dessen mRNA und Proteinexpression in einer Reihe anderer Gewebe nachgewiesen wurde (Gehirn, Herz, Leber, Milz, quergestreifte Muskulatur, Thymus) (Bauer et al., 1992; Danner & Lohse, 1996).



Der molekulare Mechanismus, wodurch Phosducin die G-Protein vermittelte Signalübertragung inhibiert, beruht auf seiner hochaffinen Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit des  $G_{\beta\gamma}$  (Lee et al., 1987). Dadurch wird die Interaktion mit  $G_{\alpha}$  beziehungsweise mit den Effektoren verhindert und somit letztendlich der Nukleotidaustausch am G-Protein und dessen Aktivierung (Bauer et al., 1992; Blüml et al., 1997). Des Weiteren bindet Phosducin mit einer niedrigeren Affinität an  $G_{\alpha}$ , woraus ebenfalls eine Inhibition der G-Protein-Funktion resultiert (Bauer et al., 1998). Seine Interaktion mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex wird durch den PKA-abhängigen Phosphorylierungszustand des Phosducins moduliert (Bauer et al., 1992). Dabei bewirkt die cAMP-abhängige Phosphorylierung, die auch bei dem gebundenen Phosducin- $\beta\gamma$ -Komplex erfolgen kann (Wilkins et al., 1996), eine Verminderung seiner Affinität gegenüber der  $\beta$ -Untereinheit. Die Folge ist eine Reduzierung der Phosducin- $G_{\beta\gamma}$ -Interaktion (Willardson et al., 1996; Yoshida et al., 1994). Ferner kann Phosducin auch von der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) phosphoryliert werden, wodurch ebenfalls die  $G_{\beta}$ -Affinität reduziert wird (Ruiz-Gomez et al., 2000). Umgekehrt beeinflusst Phosducin die GRK2-Aktivität durch die Konkurrenz um die  $\beta\gamma$ -Komplexe. Da die GRK2 diese Komplexe für die Membrananlagerung benötigt, die ein notwendiger Schritt für die anschließende Rezeptorphosphorylierung ist, kann Phosducin durch die Bindung der  $\beta\gamma$ -Komplexe die Rezeptorphosphorylierung hemmen (Hekman et al., 1994).

#### **4 Ziele der Arbeit**

In der Vergangenheit wurde der Effekt einer Genüberexpression vor allem anhand von transgenen Tiermodellen untersucht. Durch die Etablierung der Stammzellforschung mit der selektiven *in vitro* Differenzierungsmöglichkeit verschiedener Zelltypen können diese kostenintensiven und ethisch zum Teil nur schwer zu vertretenden Tierversuche vermieden werden.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit dem  $\beta$ -adrenergen Signalweg in differenzierten ES-Kardiomyozyten. Neben der Betrachtung der endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression sollte geklärt werden, ob der adenovirale Gentransfer des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors eine effiziente und funktionell wirksame Genüberexpression in den kardial differenzierten ES-Zellen bewirkt. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Ist die endogene  $\beta$ -adrenerge Subtyp-Expression in ES-Kardiomyozyten vergleichbar mit den *in vivo* Daten von adulten Maus-Kardiomyozyten?
- Kann eine virale Transfektion eine effiziente Überexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors erzielen?
- Unterscheidet sich die Transfektionseffizienz in vereinzelt ES-Kardiomyozyten von der in ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden?
- Hat diese  $\beta_1$ -Überexpression einen akuten funktionellen Effekt (z. B. positive Chronotropie oder Veränderungen in der Adenylatzyklase-Aktivität) auf die ES-Kardiomyozyten, der vergleichbar mit dem transgenen Tiermodell ist?

Ferner wurde die Differenzierung und Kontraktionsfrequenz von ES-Kardiomyozyten, die aufgrund einer Gendeletion oder -überexpression unterschiedliche Phosducin-Expressionen aufwiesen, untersucht. Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Bewirkt die unterschiedliche Phosducin-Expression eine veränderte kardiale Differenzierung der ES-Zellen ?
- Hat die Phosducin-Expression auf die Chronotropie der differenzierten ES-Kardiomyozyten einen Einfluss?

## B Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Medien, Stocklösungen und Puffer

##### 1.1.1 Lösungen für die Zellkultur

$\alpha$ -Monothioglycerol (MTG); 1,25 g/ml	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME); 1,11 g/ml	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM); 4,5 g/l Glukose	PAN Biotech
fötale Kälberserum (FCS)	PAN Systems
G418 Sulfat; spezifische Aktivität: 783 $\mu$ g/mg	Calbiochem
Iscove's modification of DMEM (IMDM); 4,5 g/l Glukose	Gibco BRL
leukemia inhibitory factor (LIF); $10^6$ U/ml	Gibco BRL
L-Glutamin; 200 mM	PAN Biotech
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Gibco BRL
Penicillin / Streptomycin (10.000 U/ml / 10 mg/ml)	PAN Biotech
Phosphate-buffered saline (PBS); pH 7,4	PAN Biotech
Trypsin-EDTA-Lösung; 0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA	PAN Biotech

##### Angesetzte Lösungen:

Gelatine-Lösung 0,1 % Gelatine (Sigma) wurde in destilliertem Wasser aufgelöst und autoklaviert. Petrischalen wurden vor Benutzung mit 0,1 % Gelatine-Lösung für 10 min bei Raumtemperatur (RT) überzogen.

Medium I	Medium für die Kultivierung von undifferenzierten ES-Zellen:	
	DMEM	
	FCS 15 %	150 ml/l
	L-Glutamin	2 mM
	NEAA	10 ml/l
	Penicillin / Streptomycin	10 ml/l
	$\beta$ -ME	0,1 mM
	LIF	1000 U/ml
Medium II	Differenzierungsmedium:	
	IMDM (alternativ auch DMEM)	
	FCS 20 %	200 ml/l
	L-Glutamin	2 mM
	NEAA	10 ml/l
	Penicillin / Streptomycin	10 ml/l
	MTG	450 $\mu$ M
Medium III	Medium zum Einfrieren der undifferenzierten ES-Zellen:	
	DMEM	
	FCS 30%	300 ml/l
	LIF	1000 U/ml
	DMSO	100 ml/l

### 1.1.2 Materialien für die Immunhistochemie

Monoklonaler Anti- $\alpha$ -Actinin AK (Maus IgG1 Isotyp)	Sigma
BSA (Albumin Fraction V aus Rinderserum)	Boehringer
Cy3 <sup>TM</sup> -gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper	Dianova
Goat-Serum	Sigma
Moviol	Hoechst
Paraformaldehyd (PFA); (CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub>	Sigma
Poly-L-Lysin; 0,1 mg/ml	Sigma

**Angesetzte Lösungen:**

4 % PFA-Lösung	8 g Paraformaldehyd (PFA) wurde durch Erhitzen auf 60 °C in 100 ml destilliertem Wasser aufgelöst (einige Tropfen von 1 N NaOH helfen bei der Auflösung). Nach Abkühlung auf RT wurden 100 ml PBS, 5 ml 3 M NaCl dazugegeben und auf einen pH von 7,4 eingestellt.	
BSA-Stock 10 %	BSA wurde entsprechend in PBS aufgelöst	
2 % Goat Serum Blotto	PBS	4 ml
	BSA 10 %	1 ml
	Goat Serum	100 µl
1 % Goat Serum Blotto	PBS	4 ml
	BSA 10 %	1 ml
	Goat Serum	50 µl

**1.1.3 Materialien zur Bestimmung der Rezeptorexpression**

(-)-CGP-20712	Selektiver $\beta_1$ -Rezeptorantagonist	NEN
Biorad Protein-Assay		BioRad
DL-Propranolol	40 mM Stocklösung in EtOH; anschließend 1:1.000 in Bindungs-Puffer (40 µM)	Sigma
(-)-[ <sup>3</sup> H]CGP -12177	Spezifische Aktivität 44 Ci/mmol; ca. 23 µM	Amersham
<sup>125</sup> Iod-Cyanopindolol	Spezifische Aktivität 2.000 Ci/mmol; ca.60 nM	Amersham
ICI-118,551	Selektiver $\beta_2$ -Rezeptorantagonist	NEN
Bindungs-Puffer	Tris	75 mM
	MgCl <sub>2</sub>	12,5 mM
	EDTA	5 mM
		pH 7,4

### ***1.1.4 Materialien für die funktionellen Assays***

cAMP-RIA-Kit		Beckman Coulter
Forskolin	20 mM Stammlösung in EtOH	Sigma
IBMX	10 mM Stammlösung in DMSO	AppliChem
Isoprenalin	Verdünnungsreihe in PBS	Sigma

## **1.2 Zelllinien**

### ***1.2.1 Embryonale Stammzellen für die kardiale Differenzierung***

In der vorliegenden Arbeit wurde für alle Versuche mit ES-Zellen die ES-Zelllinie R1 verwendet, die an der Universität Toronto aus drei Tage alten Maus-Blastozysten isoliert und charakterisiert wurde (Nagy et al., 1993). Um eine Anreicherung von kardial differenzierten ES-Zellen zu ermöglichen, wurden durch stabile Transfektion mit dem Plasmid pMHC-Neo<sup>R</sup> R1-Zellklone generiert, die über den kardialen  $\alpha$ -MHC-Promotor das Neomycin-Resistenzgen Aminoglycosidphosphotransferase exprimierten.

### ***1.2.2 Embryonale Stammzellen mit variabler Phosducin-Expression***

Für die Untersuchung verschiedener Phosducin-Expressionsstärken wurden ES-Zellklone der Linie R1 mit heterozygoten (-/+) oder homozygoten (-/-) Knock-out oder mit einer Überexpression des Phosducingens (TG) verwendet. Die Knock-out Zellen waren durch eine sequentielle Transfektion der Targeting-Vektoren Phd-Hygro (für die Selektion mit Hygromycin) und Phd-Puro (für die Selektion mit Puromycin) generiert worden. Der Phosducin-überexprimierende Zellklon war durch eine Transfektion mit dem Transgen-Vektor pBMHC-Phd gewonnen worden, der auch für die Generierung von transgenen Mäusen genommen wird.

Diese Zellklone waren in der Arbeitsgruppe vorhanden und konnten freundlicherweise übernommen werden.

### 1.3 Adenovirale Vektoren

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden rekombinanten Adenoviren Ad5GFP und Ad5 $\beta_1$ AR benutzt. Sie enthielten die cDNA für das grünfluoreszierende Protein (GFP) beziehungsweise für den humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor.

Bei dem Grundgerüst des verwendeten Adenovirus-Vektors handelte es sich um eine rekombinante, replikationsdefekte Deletionsmutante des humanen Adenovirus Serotyp 5. Der Replikationsdefekt wurde dabei gewährleistet durch die Deletion der Gene E1 und E3, die während der frühen Phase der Virusinfektion essentiell sind. Die Expression der Fremd-DNA erfolgte über den Promotor und Enhancer des Cytomegalievirus (CMV immediate early promotor and enhancer) (Drazner et al., 1997).

### 1.4 Gerätschaften

Centricon Ultrafiltrationsgefäße	Amicon
Deckgläser (18 × 18 mm)	SUPERIOR Marienfeld
Geräte	Beta-Counter
	Gamma-Counter
	Infrarotlampen (RI 05)
	Magnetrührer
	Thermometer
	Tischzentrifuge
	Ultraturrax
	Wasserbad
	Zellkulturzentrifuge
GF/C-Filter	Whatman
Konische Röhrenchen, Polypropylen (15, 50 ml )	Becton Dickinson
Langpass LP 655 nm Filter	Zeiss

Mikroskope	Axiovert 135	Fotodokumentation, Frequenzmessung	Zeiss
	konfokales Laser-Raster-Mikroskop	Immunfluoreszenz	Leica
	Telaval 31	morphologische Kontrolle	Zeiss
Objektgläser			Menzel
Pipetten	Glaspipetten (2, 5, 10, 20 ml)		Witeg
	Pipetten (20, 200, 1.000 µl)		Gilson
	8-Kanal-Multipipette		Eppendorf
Reaktionsgefäße	(0,5 und 1,5 ml)		Eppendorf
Software	Ion wizard	Frequenzmessung	Ionoptix
	Prism	Graphikerstellung	GraphPad Software
	SPOT Advanced	Fotodokumentation	Diagnostic Instruments
Zellkulturschalen	Lab-Tek Deckglas-Kammer		Nalge Nunc Internationale
	Petrischalen (Ø 10 cm)		Greiner
	Zellkulturschalen (Ø 10 cm)		NUNC Brand Products
	6er Wellplatte		NUNC Brand Products
	96er Multiwellplatte		Falcon

## 2 Methoden

### 2.1 Kultivierung von embryonalen Stammzellen

Im gesamten Differenzierungsvorgang waren die Kulturbedingungen bei 37 °C und 7 % CO<sub>2</sub> konstant. Die Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37 °C vorgewärmt.

#### 2.1.1 Undifferenzierte embryonale Stammzellen

In dieser Arbeit wurde die Differenzierung mittels Zugabe von LIF (1.000 U/ml; Medium I) gehemmt. Um das Risiko einer Differenzierung zu minimieren, wurden die



ES-Zellen spätestens alle 48 h passagiert und dann ein- bis zweilagig auf mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturschalen gegeben.

Bei der Passagierung wurde das Medium aufgesaugt und anschließend 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung dazugegeben, die man für 2 bis 3 min bei 37 °C inkubieren ließ. Nach vorsichtiger Aufnahme der gelösten ES-Zellen wurde die Trypsin-EDTA-Wirkung durch Zugabe von 5 ml des Mediums I (FCS) gestoppt und die Suspension in konischen 50 ml Röhrchen 5 min bei 140 g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette und Medium I gründlich resuspendiert und ein- bis zweilagig auf die beschichteten Zellkulturschalen (1:3 bis 1:10) gegeben.

Eine permanente Zelllinie läßt sich nach Trypsinisierung und Resuspendierung in Medium III einfrieren (Stickstoff bei -196 °C). Für das Ansetzen einer neuen Zellkultur kann sie bei Bedarf jederzeit wieder aufgetaut werden.

### ***2.1.2 Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten***

Für die kardiale Differenzierung der ES-Zellen müssen die pluripotenten Zellen in dreidimensionalen Aggregaten, sogenannten „Embryoid Bodies“ (EBs), kultiviert werden. Dies kann man auf zwei verschiedenen Wegen erreichen:

- (1) Direkte Differenzierung in Suspension (Doetschman et al., 1985),
- (2) Differenzierung in hängenden Tröpfchen (Wobus et al., 1991; Rudnicki & McBurney, 1987).

Bei beiden Methoden wurden die undifferenzierten ES-Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen, um das differenzierungshemmende LIF zu entfernen. Danach wurden sie trypsinisiert und nach Zugabe des gleichen Volumens an Medium II zentrifugiert (5 min bei 140 g). Anschließend wurde das Pellet mit dem Medium II resuspendiert und die Zellzahl auf die entsprechende Konzentration verdünnt (Guan et al., 1999b).

#### ***2.1.2.1 Direkte Differenzierung***

Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine große Anzahl von differenzierten ES-Kardiomyozyten zu erhalten. Dabei bewährte sich eine definierte Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen / Petrischale.

1. Nach der entsprechenden Konzentrationseinstellung wurden die ES-Zellen für zwei Tage in ausreichend Medium II in Suspensionskultur gehalten.
2. Am 3. Differenzierungstag wurden die entstandenen EBs mit Hilfe einer Glaspipette aufgenommen und 1:3 bis 1:5 auf mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturschalen gegeben. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, gab man jeweils 5 ml Medium II dazu. Nach 12 bis 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, anschließend alle zwei Tage.

#### **2.1.2.2 Differenzierung in hängenden Tröpfchen**

1. Für die Bildung von hängenden Tröpfchen wurde eine definierte Zellzahl von 600 ES-Zellen / 30  $\mu$ l Medium II verwendet. Mittels einer 8-Kanal-Multipipette platzierte man die Tröpfchen (30  $\mu$ l) auf die Unterseite des Deckels einer Petrischale (50 bis 60 Tropfen). Um ein Austrocknen der Tröpfchen zu verhindern, wurden in den Petrischalenboden 12 ml PBS einpipettiert.
2. Nach zwei Tagen Kultivierung (3. Differenzierungstag) in hängenden Tröpfchen wurden die entstandenen EBs in eine Suspensionskultur gegeben, in der sie für drei weitere Tage kultiviert wurden. Dabei spülte man mit Hilfe von 2 ml Medium II die EBs vorsichtig von dem Deckel ab und gab die EBs von zwei Deckeln in eine mit 10 ml Medium II gefüllte Petrischale.
3. Am 6. Differenzierungstag wurden die EBs in eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete 96er Multiwellplatte (oder in andere Zellkulturschalen) plattiert, wo sie adhärent anwachsen. Zu diesem Zweck wurden sie einzeln mit Hilfe einer 200  $\mu$ l Pipette in ein Well gegeben, in das man zuvor 150  $\mu$ l Medium II einpipettierte. Nachdem die EBs adhärent angewachsen waren, wechselte man jeden zweiten Tag das Medium.

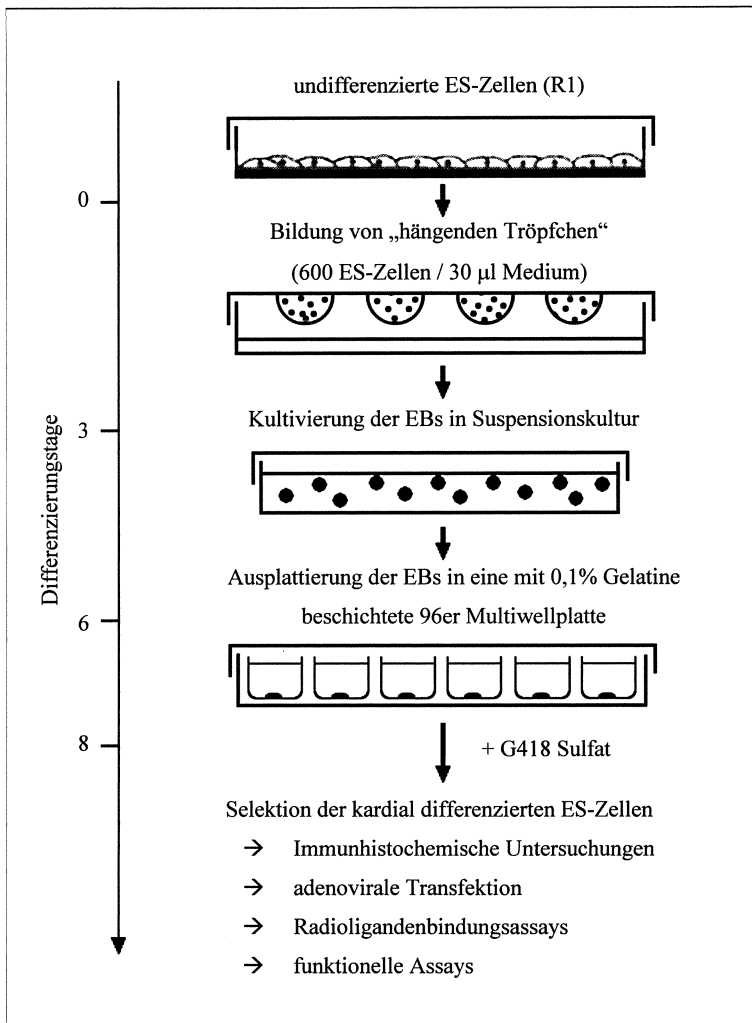


Abbildung 5: Schematische Darstellung der *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen zu Kardiomyozyten mit Hilfe der Tröpfchen-Technik.

### ***2.1.3 Selektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen***

Für die Selektion von kardial differenzierten ES-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine stabil transfizierte ES-Zelllinie verwendet, die unter der Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors das Neomycin-Resistenzgen Aminoglycosidphosphotransferase für die Selektion mit G418 Sulfat exprimierte. Da man ab dem Kontraktionsbeginn (etwa ein bis zwei Tage nach der Ausplattierung) von einem angeschalteten  $\alpha$ -MHC-Promotor ausgehen kann, wurde ab dem 8. Differenzierungstag G418 Sulfat (200  $\mu$ g/ml) zu dem Medium II dazugegeben. Diese selektierten und kontrahierenden ES-Kardiomyozyten wurden anschließend für die weiteren Versuche verwendet (Klug et al., 1996).

## ***2.2 Immunhistochemie***

Die Immunhistochemie gehört heute zu den erfolgreichsten Methoden in der medizinischen Forschung zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Die Methode basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion: Die zu untersuchende Probe wird mit einer Lösung inkubiert, die einen Antikörper (AK) gegen das im Präparat vorhandene, nachzuweisende Protein enthält. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex kann dann durch direkte oder indirekte Nachweismethoden sichtbar gemacht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Methode der Antikörpermarkierung verwendet. Bei dieser Methode erfolgt die Markierung zunächst mit dem primären Antikörper gegen das Gewebsantigen. Anschließend wird die Probe mit einem sekundären Antikörper (Anti-AK) markiert, der spezifisch gegen den im Antigen-Antikörper-Komplex gebundenen, primären Antikörper gerichtet ist und einen Fluoreszenzmarker trägt. Die sekundären Antikörper stammen immer aus dem Serum eines anderen Tieres. Der markierte Komplex kann fluoresszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.

### **2.2.1 Verwendete Antikörper**

Für den Nachweis von kardial differenzierten ES-Zellen wurden folgende Antikörper benutzt:

- (1) Als primärer AK wurde ein monoklonaler Anti- $\alpha$ -Actinin-Antikörper genommen, der spezifisch  $\alpha$ -Actinin in Skelett- und Herzmuskelzellen erkennt. Er markiert die Z-Streifen und wird zur Lokalisierung von sarkomerischem  $\alpha$ -Actinin verwendet.
- (2) Als sekundären AK verwendete man einen Cy3-konjugierten Kaninchen Anti-Maus-IgG-AK, der als Anti-AK die primären AK spezifisch an deren F<sub>C</sub>-Fragment erkennt und markiert.

### **2.2.2 Versuchsdurchführung**

Die ES-Zellen wurden an dem gewünschten Differenzierungstag (4., 8., 12., 16. Tag) mittels der Trypsin-EDTA-Lösung vereinzelt und nach der Zentrifugation (5 min bei 140 g) auf 150.000 Zellen / ml Medium II konzentriert. Von dieser Zellsuspension wurde 1 ml auf ein mit 0,1 % Gelatine und Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen verteilt.

Frühestens nach 24 h wurden die nun adhärent angewachsenen ES-Zellen einmal mittels PBS serumfrei gewaschen und anschließend mit 4 % PFA-Lösung, die man 3 min inkubieren ließ, fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die ES-Zellen für 20 min mit 2 % Goat Serum Blotto (100  $\mu$ l / Deckgläschen) inkubiert, um die unspezifischen Bindungen abzusättigen. Nachdem man das 2 % Goat Serum Blotto abgesaugt hatte, wurde der primäre AK (Anti- $\alpha$ -Actinin-Antikörper) in einer Verdünnung von 1 : 400 in 1 % Goat Serum-Blotto auf die Deckgläschen pipettiert (30  $\mu$ l / Deckgläschen) und für 1 h inkubiert. Die ES-Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären AK (30-40  $\mu$ l / Deckgläschen), der in einer Konzentration von 1 : 1.000 in 1 % Goat Serum-Blotto gelöst worden war, für 20 min in Dunkelheit markiert.

Zum Schluß wurde das Deckgläschen nach dreimaligen Waschen mit PBS mittels Moviol (15 µl / Deckgläschen) auf einen Objektträger fixiert. Die Fluoreszenzanregung wurde unter Benutzung der 543 nm Linie eines He-Ne-Lasers des konfokalen Laser-Raster-Mikroskops durchgeführt. Die Emission wurde mit einem Langpass LP 570 nm Filter aufgezeichnet.

Alle Versuche wurden bei RT durchgeführt.

### **2.3 *Transfektion der aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten mit Adenoviren***

Die Transfektion der selektierten und kardial differenzierten ES-Zellen war mit Ausnahme der Phosducin-Versuche eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung der weiteren Experimente.

Unter dem Begriff der Transfektion werden alle Verfahren zusammengefasst, die das Einbringen fremder DNA in Zellen, gegebenenfalls deren Einbau in das Wirtszellgenom und die Expression der darin enthaltenen Information beinhaltet. Dabei wird bei der Transfektion von permissiven Zellen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Adenovirus Serotyp 5 die Virus-DNA extrachromosomal repliziert. Dies führt dadurch zu einer Überexpression der in die Virus-DNA klonierten Fremd-DNA, z.B. des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors.

Bei der Transfektion von Zellen mit Adenoviren ist eine wichtige Größe der Virustiter (multiplicity of infection, MOI), der die Virusmenge bezeichnet, die für eine deutlich positive Infektion der Zellen nötig ist. Eine MOI von 1,0 ist definiert als das Verhältnis von Viruszahl zu Zellzahl (1 : 1). Verschiedene Zelllinien lassen sich unterschiedlich gut mit Adenoviren transfizieren, zum Beispiel werden neonatale Rattenkardiomyozyten bei einer MOI von 1 zu 90 % infiziert.

Die Viruszahl wurde in der vorliegenden Arbeit gleichgesetzt mit der geschätzten Zahl der biologisch aktiven Viren (biologically active virus, bav) in der Viruspräparation (El-Armouche et al., 2003).

### **2.3.1 Versuchsdurchführung**

Um die Transfektionseffizienz für einige Experimente zu erhöhen, wurden die selektierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände am 13. Differenzierungstag trypsinisiert. Wichtig war hierbei, dass die Trypsin-Einwirkungszeit auf 10 min verlängert wurde, damit die ES-Kardiomyozyten-Zellverbände vollständig dissoziierten. Die vereinzelt ES-Kardiomyozyten wurden mit einer Konfluenz von 50-70 % auf eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete Zellkulturschale ausplattiert. Nach 12 h waren die ES-Kardiomyozyten adhärent angewachsen und konnten mit dem Adenovirus transfiziert werden.

Am 14. Differenzierungstag wurde die Virustransfektion in separierten ES-Kardiomyozyten sowie in ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden folgendermaßen durchgeführt:

Zu den kardial differenzierten ES-Zellen wurde nach zweimaligem Waschen mit PBS *serumfreies* Medium II (4 ml / Zellkulturschale bzw. 30 µl / Well) mit der entsprechenden Konzentration der Adenoviren (MOI 1 bis 16, z.B. 200.000 bav / 200.000 Zellen bei MOI 1) einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 25 min wurde das doppelte Volumen des Mediums II (mit FCS), ohne Absaugen der Virussuspension, dazugegeben. Anschließend erfolgte 8 h später ein Mediumwechsel, wobei die kardial differenzierten ES-Zellen zuvor zweimal mit PBS gewaschen wurden. Frühestens nach 48 h konnten die weiteren Experimente durchgeführt werden.

### **2.4 Bestimmung der Rezeptorexpression (Radioligandenbindungsassay)**

In dieser Arbeit wurde die  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptorexpression beziehungsweise -Überexpression am 16. Differenzierungstag an selektierten und kardial differenzierten ES-Zellen mittels Quantifizierung der Bindung von radioaktiv markierten Antagonisten bestimmt. Dabei wurde die Ligandenbindung in Membranen oder an intakten ES-Kardiomyozyten ermittelt.

Da der radioaktiv markierte Ligand nicht nur spezifisch an die Rezeptoren bindet, sondern auch unspezifisch an andere Membranproteine, wird diese Fehlerquelle durch Quantifizierung der unspezifischen Bindung des Radioliganden berücksichtigt. Aus diesem Grund besteht der Bindungsassay aus zwei funktionellen Teilen:

- (1) *Quantifizierung der unspezifischen Bindung*: Durch Zugabe unmarkierter Liganden in hohem Überschuss werden die spezifischen Rezeptorbindungsstellen abgesättigt, wodurch die Radioliganden vor allem an unspezifische Membranbestandteile binden.
- (2) *Quantifizierung der totalen Bindung*: Die totale Bindung beinhaltet die Bindung der radioaktiv markierten Liganden an die spezifischen Rezeptoren sowie auch die unspezifische Bindung an Membranproteine und an andere Membranbestandteile.

Zur Bestimmung der Rezeptorexpression ermittelt man aus diesen beiden Größen die spezifische Bindung. Sie steht für die tatsächliche Bindung der radioaktiv markierten Liganden an den spezifischen Rezeptoren und gibt so die Expression dieser Rezeptoren an. Sie wird als Differenz der totalen Bindung minus der unspezifischen Bindung errechnet.

Um eine hohe Selektivität des Bindungsassays zu erreichen, sollte der Radioligand möglichst selektiv und hochaffin an den Rezeptor binden. Um eine niedrige unspezifische Bindung zu erhalten, sollte er eine möglichst geringe Lipophilie besitzen. Für eine hohe Sensitivität sollte die spezifische Radioaktivität des Radioliganden der erwarteten Rezeptorkonzentration angepasst werden. Aus diesem Grund verwendete man für die Bestimmung der niedrigen endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression den Antagonist  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol (2.000 Ci/mmol). Der Antagonist [ $^3\text{H}$ ]CGP mit einer niedrigeren spezifischen Aktivität (44 Ci/mmol) wurde zur Ermittlung der hohen Überexpression des  $\beta_1$ -AR in den Ad5 $\beta_1$ AR-transfizierten, kardial differenzierten ES-Zellen verwendet.

Zur Darstellung der endogenen Rezeptorexpression der  $\beta$ -adrenergen Subtypen wurde der entsprechende Rezeptortyp durch subtyp-selektive Antagonisten abgesättigt. Das heißt für die Ermittlung der  $\beta_1$ -adrenergen Expression wurde ICI-118,551 ( $\beta_2$ -selektiv)



beziehungsweise für die  $\beta_2$ -adrenerge Expression (-)-CGP-20712 ( $\beta_1$ -selektiv) dazu gegeben.

#### **2.4.1 Präparation von Membranen**

Bei der Gewinnung von Zellmembranen aus selektierten und differenzierten ES-Kardiomyozyten müssen die Membranen von den sonstigen Zellbestandteilen getrennt und anschließend homogenisiert werden. Wichtig ist hierbei, dass die in der Membran verankerten Proteine des Rezeptorsystems dabei funktionsfähig bleiben.

Praktisches Vorgehen:

Nach Absaugen des Mediums wurden die ES-Kardiomyozyten dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in einem hypotonen Puffer (5 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 7,4) durch Abkratzen aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraturax für etwa dreimal 5 sec lysiert. Die Dispersion wurde 20 min bei 500 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Membranen durch anschließendes Zentrifugieren bei 40.000 g für 20 min gewonnen. Zu dem Membranpellet wurde 1 ml Bindungs-Puffer dazugegeben und mittels des Ultraturax (mittlere Leistung) für 10 sec gemixt. Die gesamte Membranpräparation wurde bei 4 °C durchgeführt.

Die Proteinkonzentration des Membranhomogenats wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Nach Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue konnten Proteinmengen im Bereich von 1 bis 25  $\mu\text{g}$  zuverlässig photometrisch quantifiziert werden. Die Membransuspension wurde anschließend durch Zugabe eines entsprechenden Volumens des Bindungs-Puffer auf 50  $\mu\text{g}$  Membranprotein / ml eingestellt.

#### **2.4.2 Versuchsdurchführung**

Am 16. Differenzierungstag wurden die intakten kardial differenzierten ES-Zellen trypsinisiert (10 min) und mittels *serumfreien* Mediums II auf 100.000 bis 500.000 Zellen / ml konzentriert. Die Membranen wurden, wie in B 2.4.1 beschrieben, präpariert (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Die unmarkierten Antagonisten wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

	Endkonzentration	Selektivität
DL-Propranolol	10 $\mu$ M	$\beta_1 = \beta_2$
(-)-CGP-20712	160 nM	$\beta_1$ AR (800-fach)
ICI-118,551	56 nM	$\beta_2$ AR (70-fach)

Die Endkonzentrationen der radioaktiv markierten Antagonisten betragen:

- $^{125}$ Iod-Cyanopindolol: 5 bis 300 pM
- [ $^3$ H]CGP: 0,01 bis 3 nM

In einem Gesamtvolumen von 200  $\mu$ l wurde folgendes Pipettierschema durchgeführt:

	PBS	DL-Propranolol	Membranen bzw. ES-Kardiomyozyten	Radioligand
Unspezifische Bindung	—	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Totale Bindung	50 $\mu$ l	—	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Bei der Bestimmung der subtyp-selektiven endogenen Rezeptorexpression wurden für die Ermittlung der totalen Bindung 50  $\mu$ l (-)-CGP-20712 beziehungsweise ICI-118,551 anstelle von 50  $\mu$ l PBS dazupipettiert.

Anschließend wurden die Proben für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Trennung der ungebundenen radioaktiv markierten Antagonisten wurden die Proben über einen GF/C-Filter abgesaugt und danach viermal mit 4 ml eiskaltem Waschpuffer (50 mM Tris; pH 7,4) gewaschen. Die verbliebene Radioaktivität auf den Filtern wurde je nach verwendeter Radioaktivität durch einen Flüssigkeitsszintillationszähler ([ $^3$ H]CGP) beziehungsweise einen Gamma-Counter ( $^{125}$ Iod-Cyanopindolol) bestimmt.

## 2.5 Funktionelle Assays

### 2.5.1 Messung der Kontraktionsfrequenz

Die Ermittlung der dosisabhängigen Kontraktionsfrequenz wurde an selektierten und transfizierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden am 16. Differenzierungstag in 96er Multiwellplatten durchgeführt.

Die Stimulation der  $\beta_1$ -AR stellt den stärksten Mechanismus dar, über den die Chronotropie und Inotropie gesteigert werden kann (Brodde & Michel, 1999; Rohrer et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die *in vitro* Rezeptorstimulation durch den vollen Agonisten Isoprenalin durchgeführt. Isoprenalin ist im Vergleich zu Adrenalin ein reiner  $\beta$ -adrenerger Rezeptor-Agonist, da die  $\beta$ -Rezeptor-Affinität mit der Größe des Substituenten am Stickstoff (Isopropyl-Rest) zunimmt.

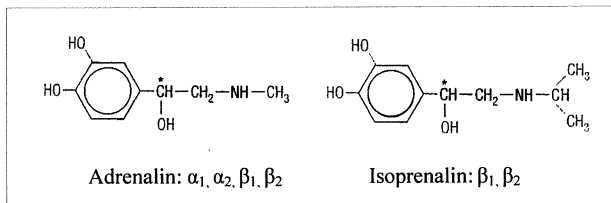


Abbildung 6: Strukturformeln von Adrenalin und Isoprenalin.

#### 2.5.1.1 Versuchsdurchführung

Die Schlagfrequenz wurde an unabhängigen, rhythmisch schlagenden Arealen mit Hilfe eines edge-detection Systems gemessen. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, führte man etwa 2 h vor der Versuchsdurchführung einen Mediumwechsel mit dem Medium II durch. Die Temperatur wurde durch Infrarotlampen während der gesamten Untersuchung konstant bei  $31,3 \pm 0,5$  °C gehalten.

Nach Messung der basalen Schlagfrequenz wurden die  $\beta$ -ARs durch kumulative Zugabe von Isoprenalin (1 pM bis 10  $\mu$ M) in steigender Konzentration stimuliert. Die resultierenden Kardiomyozytenkontraktionen wurden nach einer Inkubationszeit von

1 min (maximaler Effekt nach einer Latenzzeit von 30 sec) durch eine an das Mikroskop angeschlossene Videokamera für je 60 sec aufgezeichnet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer edge detection Software (Ionoptix). Diese kann die durch die Kontraktion verursachte Veränderung der Grauwertstufe vom Grundniveau wahrnehmen und als ein Amplitudenmaximum aufzeichnen.

Die Zeitspanne der Frequenzauszählung betrug 30 sec.

### **2.5.2 Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität**

Die Kopplung des  $\beta_1$ -ARs an die Adenylatzyklase wurde untersucht, indem agonistenabhängig die Bildung des second messengers cAMP mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA) gemessen wurde.

Der RIA, für den 1977 Schally, Guillemin, Rosalyn und Yalow den Nobelpreis bekamen, revolutionierte die Hormonforschung, weil er eine rasche quantitative und spezifische Messung vieler Hormone in winzigen Mengen ermöglichte. Entscheidend für den RIA sind spezifische Antikörper (AK). Wenn eine konstante Menge AK (cAMP-AK) mit einer festgelegten Menge eines radioaktiv markierten Antigens (Ag) ( $^{125}\text{Iod-cAMP}$ ) inkubiert wird, bindet ein bestimmter Anteil des radioaktiven Ag an die AK. Ist neben dem radioaktiv markierten Ag auch noch ein nicht-markiertes Ag (cAMP) vorhanden, so wird dieses mit dem markierten Ag in Konkurrenz treten und es teilweise von seinen Bindungsstellen am AK verdrängen. Diese Konkurrenz um die Bindungsstellen kann man durch Vergleich mit einer Standardkurve mit bekannten Mengen nicht-markierter Ag quantifizieren. Das Ausmaß, in dem die markierten Ag von den AK verdrängt werden, ist ein Maß für die Menge an unmarkierten Ag in einer Probe oder einem Gewebeextrakt.

#### **2.5.2.1 Versuchsdurchführung**

Die selektierten und transfizierten ES-Kardiomyozyten wurden am 16. Differenzierungstag trypsinisiert (10 min, siehe Abschnitt B 2.3.1) und mittels *serumfreien* Mediums II auf 100.000 Zellen / ml konzentriert. Durch Inkubation der intakten ES-Kardiomyozyten mit verschiedenen Agonistenkonzentrationen

(Isoprenalin) wurde über Rezeptoraktivierung die membrangebundene Adenylatzyklase aktiviert, die wiederum die Bildung von cAMP katalysiert. Da das cAMP durch die PDE sehr schnell zu 5'-AMP abgebaut wird, wurde sie durch Zugabe von IBMX (100  $\mu\text{M}$ ) gehemmt. Zur Kontrolle, ob die Ad5 $\beta_1$ AR-Transfektion per se einen Einfluss auf die Adenylatzyklase-Aktivität hat, wurde das Enzym durch Forskolin (50  $\mu\text{M}$ ) direkt stimuliert. Dabei interagiert Forskolin, ein pflanzliches Diterpen, mit der katalytischen Untereinheit ( $\text{EC}_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) (Seamon et al., 1981).

Zur Ermittlung der basalen cAMP-Synthese wurden zu der Zellsuspension (90  $\mu\text{l}$ ) 10  $\mu\text{l}$  PBS einpipettiert. Für die Rezeptorstimulierung ließ man 90  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension mit verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen (10 fM bis 10  $\mu\text{M}$ ) in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  bei 37 °C für 15 min inkubieren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600  $\mu\text{l}$  kochendem Wasser (Denaturierung der ES-Kardiomyozyten) abgestoppt. Anschließend wurden die Zellbestandteile bei 20.000 g für 3 min abzentrifugiert. Nach Verdünnen des Überstands (10 : 7; Verdünnungspuffer des cAMP-RIA-Kits) pipettierte man 100  $\mu\text{l}$  des Überstands in das mit dem anti-cAMP-Antikörper beschichtete RIA-Röhrchen. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  des  $^{125}\text{I}$ -cAMP einpipettiert und nach vorsichtiger Mischung für 18 h bei 2 bis 8 °C inkubiert. Nach Aspiration des Überstandes wurde die Radioaktivität des gebundenen  $^{125}\text{I}$ -cAMP in einem Gamma-Counter ermittelt. Alle Versuche wurden in Doppelwerten durchgeführt.

## **2.6 Kardiale *in vitro* Differenzierung in Abhängigkeit von der Phosducin-Expression**

Für die Untersuchung des Einflusses von Phosducin auf die Kardiomyozytenentwicklung wurden Zellklone der Zelllinie R1 verwendet, in denen ein Allel oder beide Allele des Phosducingens durch homologe Rekombination ausgeschaltet waren (heterozygote und homozygote Phosducin Knock-out Klone) beziehungsweise Zellklone, die das Phosducingen durch Transfektion überexprimierten.

Die kardiale Differenzierung der Phosducin-Klone aus ES-Zellen erfolgte nach der Tröpfchentechnik in 96er Multiwellplatten. Ab dem 8. Differenzierungstag wurde eine Selektionierung mit G418 Sulfat (200  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt.

### ***2.6.1 Quantifizierung des Kontraktionsverlaufes bei unterschiedlicher Phosducinexpression***

Um mögliche Effekte der Phosducinexpression auf die kardiale *in vitro* Differenzierung von ES-Zellen zu untersuchen, wurden der Kontraktionsbeginn und -verlauf dokumentiert. Da der Kontraktionsbeginn frühestens ein bis zwei Tage nach der Ausplattierung erfolgt (Maltsev et al., 1993), wurde ab dem 7. Differenzierungstag täglich mit Hilfe eines inversen Mikroskops der Anteil der kontrahierenden EBs gezählt.

### ***2.6.2 Messung der basalen Kontraktionsfrequenz***

Die Ermittlung der basalen Kontraktionsfrequenz der kardial differenzierten und selektierten Phosducin-Klone wurden am 16. Differenzierungstag durchgeführt. Dabei wurden rhythmisch kontrahierende ES-Kardiomyozyten-Zellverbände mit Hilfe eines inversen Mikroskops ausgewählt und für 30 sec bei  $29,4 \pm 0,7$  °C gemessen.

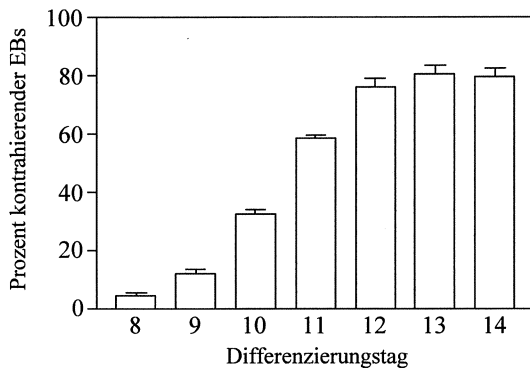
## C Ergebnisse

### 1 Die Differenzierung von Kardiomyozyten in Embryoid Bodies

#### 1.1 Differenzierung und Selektionierung der aus embryonalen Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten

Um die Kardiomyozytendifferenzierung zu untersuchen, wurden die kardial differenzierten ES-Zellen mittels der Tröpfchentechnik gewonnen. Ein wichtiger Parameter für die kardiale *in vitro* Differenzierung der ES-Zellen ist der Kontraktionsbeginn.

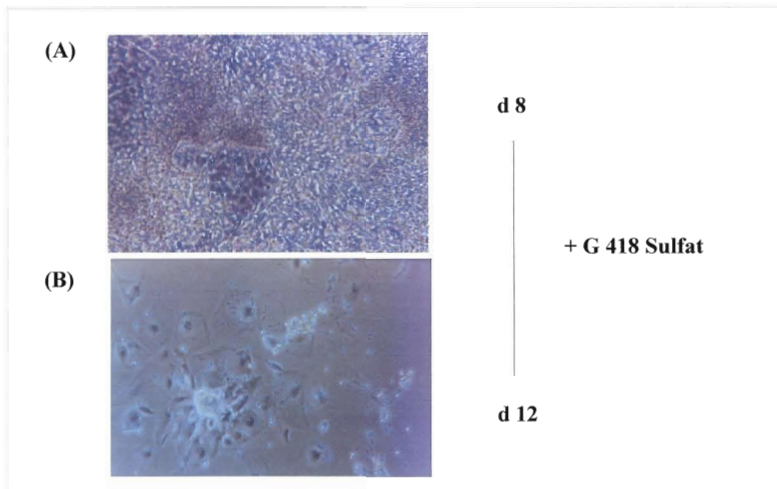
Wie in der Abbildung 7 gezeigt wird, konnten zwei Tage nach der Ausplattierung, das heißt am 8. Differenzierungstag, bei  $4,2 \pm 0,9$  % der EBs kontrahierende Areale festgestellt werden. Dieser Prozentsatz stieg an den folgenden Tagen kontinuierlich an und erreichte sein Maximum (81 %) am 13. Differenzierungstag.



**Abbildung 7: Kardiomyozytendifferenzierung in auswachsenden EBs.** Die EBs wurden am 6. Differenzierungstag ausplattiert. Als Parameter für die kardiale Differenzierung wurde der Kontraktionsbeginn täglich beobachtet und der prozentuale Anteil von kontrahierenden EBs ausgezählt (n = 3).

Für die Selektion von kardial differenzierten ES-Zellen wurde die von Klug beschriebene Selektionsmethode verwendet (Klug et al., 1996).

Nach Zugabe von G418 Sulfat am 8. Differenzierungstag wurde nach drei bis vier Tagen das Selektionsergebnis durch einen hohen Anteil an kardial differenzierten ES-Zellen sichtbar (Abbildung 8).



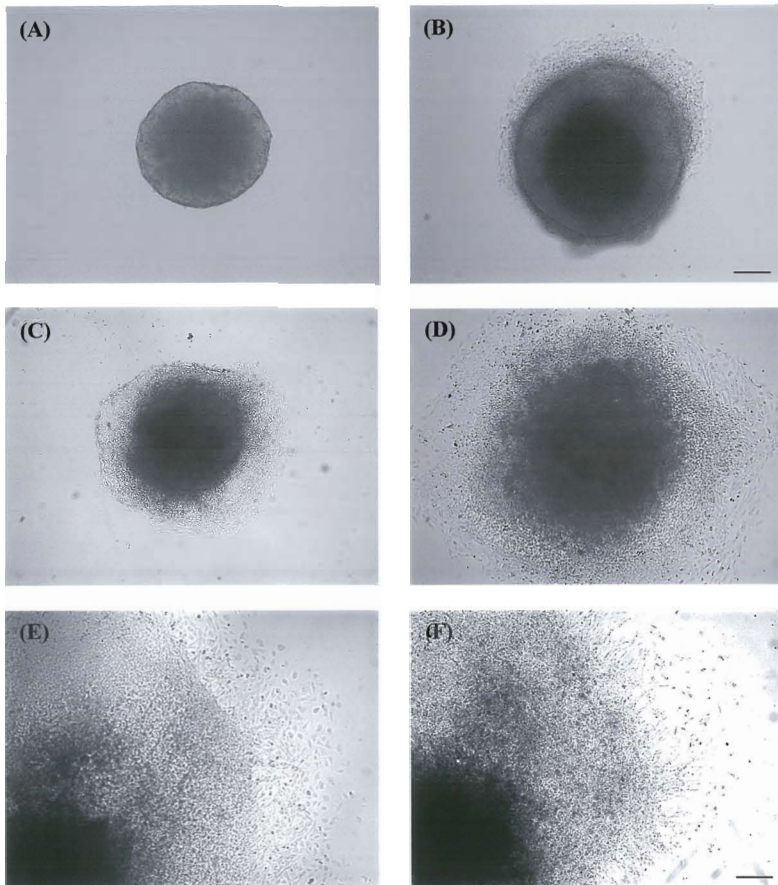
**Abbildung 8: Selektion von kardial differenzierten ES-Zellen.** (A) stellt den heterogenen Zellrasen eines EBs am 8. Differenzierungstag dar. (B) zeigt das Resultat der Selektion vier Tage nach Zugabe von G418 Sulfat.

## 1.2 Fotodokumentation der Kardiomyozytendifferenzierung

In der folgenden Abbildung 9 wird an verschiedenen Zeitpunkten die kardiale *in vitro* Differenzierung eines EBs mittels Tröpfchentechnik lichtmikroskopisch dargestellt. Abbildung 9 A zeigt einen typischen EB am 4. Differenzierungstag mit einem Durchmesser von 330  $\mu\text{m}$ . Dieser EB wurde am 6. Differenzierungstag auf eine mit 0,1 % Gelatine beschichtete Deckglas-Kammer ausplattiert. Nach 24 h (Abbildung 9 B) wurde ein deutliches adhärentes Wachstum sichtbar, das nach weiteren 12 h (36 h nach



der Ausplattierung; Abbildung 9 C) den gesamten EB betraf. Die Abbildungen 9 D bis 9 F zeigen die weitere zelluläre Proliferation und kardiale Differenzierung an den Differenzierungstagen 8, 10 und 14. Diese Morphologie, die durch die radiäre Proliferation in der Peripherie gekennzeichnet ist, stellt das beste kardiale Differenzierungsergebnis mit großflächigen, synchron und rhythmisch schlagenden Arealen dar. Die Größe und Morphologie konnte aber in jeder kontrahierenden Differenzierungskultur variabel sein. In der vorliegenden Differenzierung waren ab dem 9. Differenzierungstag kontrahierende Areale sichtbar.



**Abbildung 9: Lichtmikroskopische Bilder an verschiedenen Zeitpunkten der kardialen *in vitro***

**Differenzierung eines EBs.** (A) EB in Suspensionskultur am 4. Differenzierungstag. (B) und (C) adhärenthes Wachstum des EBs 24 h (B) und 36 h (C) nach der Ausplattierung (6. Differenzierungstag). (D) bis (F) weitere kardiale Differenzierung und Proliferation des EBs an den Differenzierungstagen 8, 10 und 14.

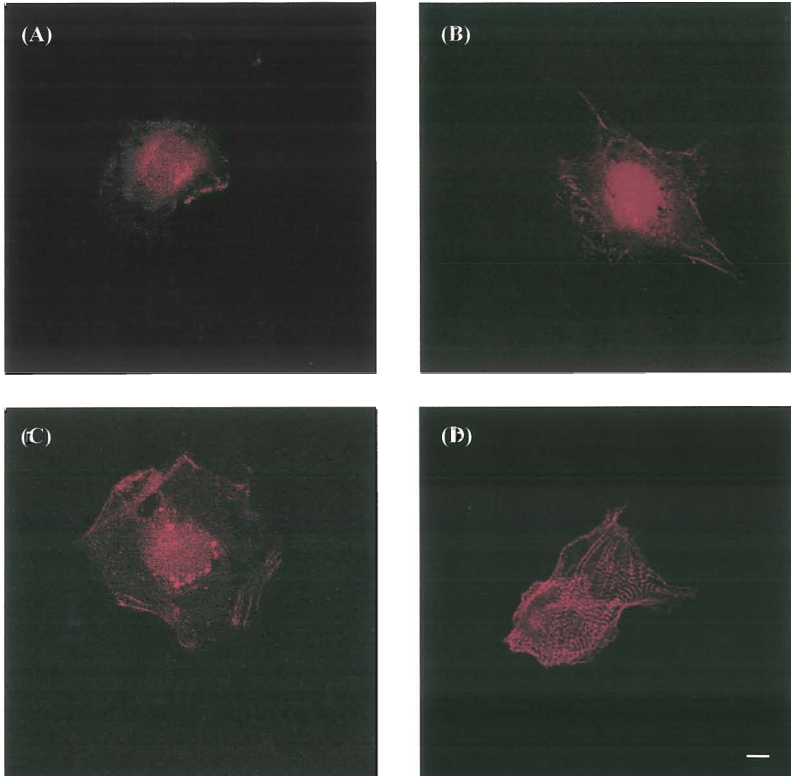
In Abbildung (A) und (B) repräsentiert der Balken 100  $\mu\text{m}$  beziehungsweise in den Abbildungen (C) bis (F) 200  $\mu\text{m}$ .

### **1.3 Nachweis des Actinins in Abhängigkeit von dem Differenzierungsalter**

Die immunhistochemische Charakterisierung der Kardiomyoztendifferenzierung an dem 4., 8., 12. und 16. Differenzierungstag nach vorheriger Passagierung der EB wird in der Abbildung 10 gezeigt. Ein früher Parameter für die kardiale Differenzierung ist das sarkomerische  $\alpha$ -Actinin (Metzger et al., 1996), das in den Z-Streifen der Myofibrillen lokalisiert ist. Zum spezifischen Nachweis wurde der monoklonale Anti- $\alpha$ -Actinin-Antikörper verwendet.

Wie in Abbildung 10 A dargestellt wird, ist die Immunfluoreszenz in einer vier Tage alten ES-Zelle perinukleär und diffus im Zytosol lokalisiert, was auf eine beginnende Expression des  $\alpha$ -Actinins hinweist. Mit zunehmender kardialer Differenzierung konnte im Zytosol immer deutlicher die sich organisierende sarkomerische Struktur nachgewiesen werden. Abbildung 10 B und C zeigen die Zunahme von peripher lokalisierten Myofibrillen am 8. beziehungsweise 12. Differenzierungstag einer kardial differenzierenden ES-Zelle. Eine vollständig kardial differenzierte ES-Zelle (16. Differenzierungstag) ist in Abbildung 10 D zu sehen. Der Zellkern wird völlig von der Immunfluoreszenzfärbung ausgeschlossen, wohingegen die ausgebildete, hoch organisierte sarkomerische Struktur durch die Anreicherung der AKs in den Z-Streifen markiert wird.

Mittels der immunhistochemischen Darstellung der sarkomerischen Struktur konnte auch das Ausmaß der Anreicherung von ES-Kardiomyozyten in den mit G418 Sulfat selektierten Kulturen bestimmt werden. Die Auszählung der kardial differenzierten ES-Zellen ergab eine Anreicherung auf über 95 % der Gesamtzellen.



**Abbildung 10: Antikörpermarkierung von kardial differenzierenden ES-Zellen.** Mit Hilfe des sarkomerischen  $\alpha$ -Actinin-AKs wurden die mit der Tröpfchentechnik gewonnenen ES-Zellen am 4. (A), 8. (B), 12. (C) und 16. (D) Differenzierungstag markiert. Als sekundärer AK wurde Cy3<sup>TM</sup>-gekoppelter Anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet (Balken = 10  $\mu$ m).

## **2 Charakterisierung der endogenen $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen der Maus**

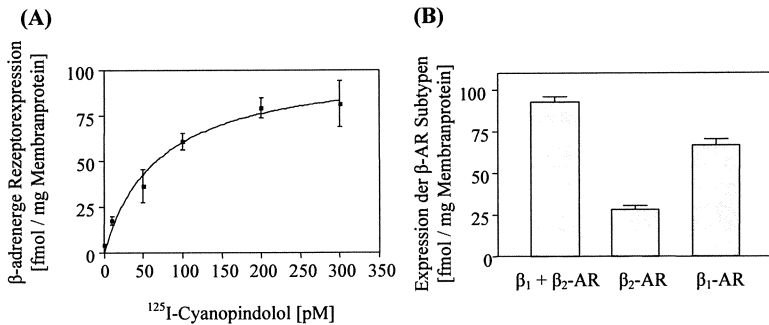
### **2.1 Expression der endogenen $\beta$ -adrenergen Subtypen**

Zunächst stellte sich die Frage, ob die endogene Expression von  $\beta$ -ARs in den *in vitro* differenzierten ES-Kardiomyozyten mit der *in vivo* Expression in adulten Mäuse-Kardiomyozyten vergleichbar ist. In den adulten Mäuse-Kardiomyozyten beträgt die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorexpression etwa 50 fmol / mg Membranprotein, wobei der  $\beta_1$ -adrenerge Subtyp mit 70 % gegenüber dem  $\beta_2$ -adrenergen Subtyp überwiegt (Engelhardt et al., 1999; Zhou et al., 2000b).

Für die Bestimmung der Rezeptorexpression wurde aus den kardial differenzierten und selektierten ES-Zellen, die durch die direkte Differenzierung gewonnen wurden, am 16. Differenzierungstag an präparierten Membranen die Radioligandenbindung ermittelt. Als Radioligand wurde  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol und für die unspezifische Bindung DL-Propranolol verwendet.

Wie in Abbildung 11 A gezeigt wird, erreicht die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorbindung bei 300 pM  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol den Sättigungsbereich. Die maximale Rezeptorexpression beträgt  $103 \pm 12$  fmol / mg Membranprotein ( $B_{\text{max}} = 1.716$  cpm). Dies stimmt mit ungefähr 8.000 Rezeptoren pro Zelle überein, die mit der Rezeptorexpression an intakten separierten ES-Kardiomyozyten ermittelt wurde (siehe Abbildung 16 B).

Die Expression der  $\beta$ -adrenergen Subtypen  $\beta_1$ -AR und  $\beta_2$ -AR wurde durch die Verwendung der beiden selektiven Antagonisten (–)-CGP-20712 ( $\beta_1$ -AR selektiv) und ICI-118,551 ( $\beta_2$ -AR selektiv) bestimmt. Abbildung 11 B stellt die Expression der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Subtypen dar, woraus ersichtlich wird, dass der  $\beta_1$ -adrenerge Subtyp eine um den Faktor 2,4 höhere Expressionsstärke im Vergleich zu dem  $\beta_2$ -adrenergen Subtyp aufweist ( $\beta_1 : \beta_2 = 70 \% : 30 \%$ ).



**Abbildung 11: Bestimmung der endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptordichte mit Hilfe von**

**Radioiligandenbindungsassays.** Dazu wurde jeweils 5  $\mu\text{g}$  Membranprotein verwendet, das aus differenzierten ES-Kardiomyozyten am 16. Differenzierungstag gewonnen wurde.

(A) Sättigungskurve mit verschiedenen Konzentrationen des radioaktiv markierten Liganden  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolol ( $n = 3$ ). (B) Darstellung der subtyp-selektiven endogenen Rezeptorexpression. Verwendet wurden 300 pM des radioaktiv markierten  $^{125}\text{I}$ -Cyanopindolols sowie die subtyp-selektiven Antagonisten (–)-CGP-20712 ( $\beta_1$ -AR selektiv) und ICI-118,551 ( $\beta_2$ -AR selektiv) ( $n = 3$ ).

## 2.2 Funktionelle Kopplung der endogenen $\beta$ -adrenergen Rezeptoren

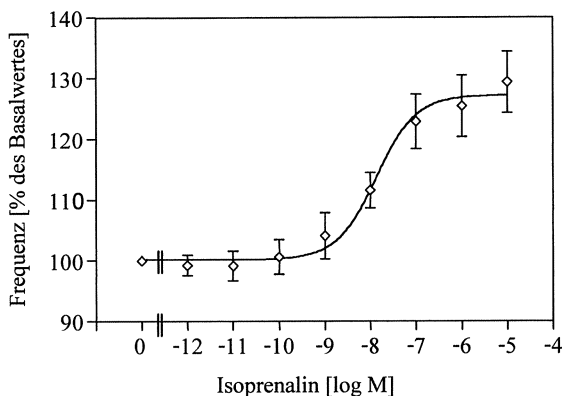
Um zu bestimmen, ob die endogenen  $\beta$ -ARs der kardial differenzierten ES-Zellen am 16. Differenzierungstag funktionell gekoppelt sind, wurden folgende Experimente durchgeführt.

### 2.2.1 $\beta$ -Rezeptor vermittelte Stimulation der Kontraktionsfrequenz

Ein Parameter, mit dem man die funktionelle Kopplung der endogenen  $\beta$ -ARs untersuchen kann, ist die Kontraktionsfrequenz. Dazu wurde die Agonisten-abhängige Stimulation der Kontraktionsfrequenz von ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden, die mit Hilfe der Tröpfchentechnik differenziert wurden, bei einer konstanten Temperatur von  $31,3 \pm 0,5$  °C untersucht.

Die basalen Frequenzen zeigten eine sehr große Variabilität von 62 bis  $290 \text{ min}^{-1}$  mit einem Mittelwert von  $160 \pm 23 \text{ min}^{-1}$ . Aufgrund dessen ist die Konzentrations-

Wirkungskurve in Abbildung 12 durch Prozentwerte der Basalfrequenz dargestellt. Dabei wird ersichtlich, dass die halbmaximale Frequenzzunahme einen  $EC_{50}$ -Wert von  $1,4 \times 10^{-8}$  M hat. Ein relativ hoher Anteil von 17 % der untersuchten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände reagierte nicht mit einem Frequenzanstieg und wurden in der folgenden Abbildung nicht berücksichtigt.

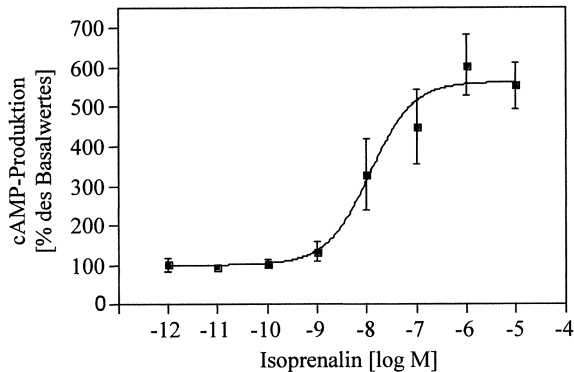


**Abbildung 12: Konzentrations-Wirkungskurve der Kontraktionsfrequenz von ES-Kardiomyozyten-Zellverbände am 16. Differenzierungstag.** Der Isoprenalin-abhängige Frequenzanstieg ist in Relation zur Basalfrequenz dargestellt (n = 10).

### 2.2.2 Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Adenylatzyklase-Aktivität an separierten und intakten ES-Kardiomyozyten (jeweils 9.000 ES-Kardiomyozyten pro Assaypunkt), welche durch die direkte Differenzierungsmethode gewonnen wurden, ermittelt. Die basale Adenylatzyklase-Aktivität ergab eine cAMP-Produktion von  $0,1 \pm 0,05$  fmol cAMP / Zelle und wurde durch die direkte Stimulation mittels Forskolin auf  $5,7 \pm 0,9$  fmol cAMP / Zelle erhöht. Abbildung 13 zeigt, dass die Isoprenalin-konzentration bei der halbmaximalen Stimulation des Enzyms ( $EC_{50} = 1,2 \times 10^{-8}$  M) vergleichbar mit dem  $EC_{50}$ -Wert der Frequenzzunahme ( $EC_{50} = 1,4 \times 10^{-8}$  M) ist. Durch

die Applikation von 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin wurde die Adenylatzyklase-Aktivität um den Faktor 5,6 gegenüber der basalen Aktivität stimuliert.



**Abbildung 13: Adenylatzyklase-Aktivität in intakten ES-Kardiomyozyten**

(16. Differenzierungstag). Die Aktivität wurde mit den angegebenen Konzentrationen von Isoprenalin durch Quantifizierung der cAMP-Produktion bestimmt und auf den Basalwert bezogen (n = 5).

### **3 Adenovirale Transfektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

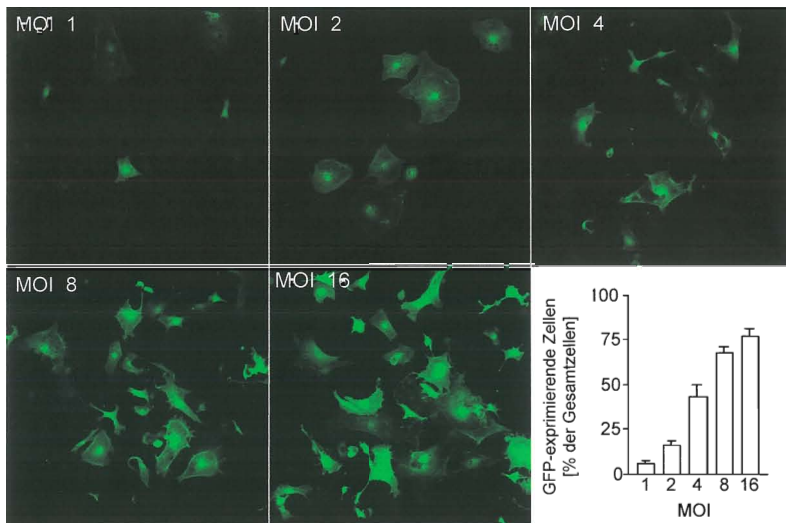
#### **3.1 Nachweis der Transfektionseffizienz des Ad5GFP-Virus in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

Da die Transfektionseffizienz des Adenovirus Serotyp 5 unter anderem von der verwendeten Zelllinie und dem Differenzierungsalter abhängig ist, sollte die folgende Versuchsreihe die Beziehung zwischen dem Virustiter (MOI) und dem Ausmaß der GFP-Expression in kardial differenzierten ES-Zellen der Zelllinie R1 untersuchen. Dafür wurden die durch die Tröpfchentechnik gewonnenen und separierten ES-Kardiomyozyten am 14. Differenzierungstag mit unterschiedlichen MOIs des Ad5GFP-



Virus transfiziert und für weitere 48 h kultiviert. Die GFP-Expression wurde als Prozentsatz von positiven (grün-fluoreszierenden) ES-Kardiomyozyten in einem Gesichtsfeld bei fünffacher Vergrößerung ermittelt.

Wie in Abbildung 14 gezeigt wird, nimmt mit zunehmender MOI des Ad5GFP-Virus der Prozentsatz von GFP-exprimierenden ES-Kardiomyozyten zu. Bei einer MOI von 16 exprimierten  $77 \pm 3 \%$  der ES-Kardiomyozyten das grün-fluoreszierende Protein.



**Abbildung 14: Beziehung zwischen dem Ad5GFP-Virustiter und dem Ausmaß der GFP-Expression in ES-Kardiomyozyten.** 48 h nach der Transfektion (16. Differenzierungstag) wurden die positiven ES-Kardiomyozyten auf die Gesamtzahl der in einem Gesichtsfeld vorhandenen ES-Kardiomyozyten bezogen (n = 4).

Des weiteren wurde untersucht, ob die adenovirale Transfektion einen Einfluss auf die endogene Rezeptorexpression hat. Dazu wurden die separierten und kardial differenzierten ES-Zellen am 14. Differenzierungstag mit dem Ad5GFP-Virus transfiziert (MOI 4). Nach 48 h verglich man die native  $\beta$ -adrenerge Rezeptorexpression

mit der  $\beta$ -adrenergen Expression der Ad5GFP-transfizierten ES-Kardiomyozyten. Dabei konnte keine veränderte endogene Rezeptorexpression nachgewiesen werden (Nativ:  $103 \pm 12$  fmol / mg; Ad5GFP:  $97 \pm 8$  fmol / mg).

### **3.2 Adenovirale Überexpression des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

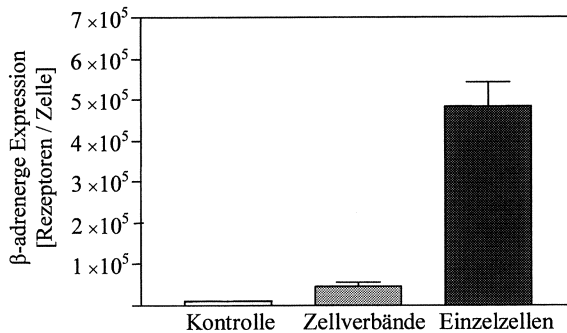
Die folgenden Experimente dienten drei Fragestellungen:

- (1) Hat die adenovirale Transfektion einen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten der ES-Kardiomyozyten?
- (2) Führt das in der Virus-DNA integrierte Transgen zu einer Expression des Rezeptorproteins in der Zellmembran von ES-Kardiomyozyten?
- (3) Ist die Transfektionseffizienz des Ad5 $\beta_1$ AR-Virus in separierten ES-Kardiomyozyten im Vergleich zu ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden unterschiedlich?

Damit eine mögliche Auswirkung der adenoviralen Transfektion auf die kontrahierende Aktivität der ES-Kardiomyozyten ausgeschlossen werden konnte, wurde der Kontraktionsbeginn nach einer Ad5GFP- beziehungsweise Ad5 $\beta_1$ AR-Transfektion beobachtet. Dabei begannen 60 bis 80 % der separierten ES-Kardiomyozyten 4 h nach der Transfektion wieder spontan zu kontrahieren. Am 16. Differenzierungstag lag der Prozentsatz der kontrahierenden, Ad5 $\beta_1$ AR-transfizierten EBs pro Well bei  $95 \% \pm 1 \%$  und war vergleichbar mit den Kontroll-Kardiomyozyten  $93 \% \pm 2 \%$  (n = 3).

Um die beiden weiteren Fragen beantworten zu können, wurde die Rezeptordichte mit Hilfe von Radioligandenbindungssays am 16. Differenzierungstag bestimmt. Dazu wurde die Hälfte der mittels Tröpfchentechnik differenzierten ES-Kardiomyozyten am 13. Differenzierungstag trypsinisiert und gemeinsam mit den nicht-separierten Zellverbänden nach 24 h mit dem Ad5 $\beta_1$ AR-Virus (MOI 2) transfiziert. Aus der Bestimmung der Rezeptordichte ergab sich in den Kardiomyozyten-Zellverbänden eine etwa fünffache Überexpression des  $\beta_1$ -ARs im Vergleich zu der

endogenen Expression in den Kontroll-Kardiomyozyten (Abbildung 15). Die Ad5 $\beta_1$ AR-Transfektion in separierten ES-Kardiomyozyten zeigt dagegen eine um den Faktor 54 höhere Überexpression. Damit war die Transfektionseffizienz in den separierten ES-Kardiomyozyten etwa zehnfach höher als in den Zellverbänden.



**Abbildung 15:** Vergleich der Überexpression des  $\beta_1$ -ARs in separierten ES-Kardiomyozyten und in ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden. Die Rezeptordichte wurde am 16. Differenzierungstag an intakten ES-Kardiomyozyten, die zuvor mit dem Ad5 $\beta_1$ AR-Virus (MOI 2) transfiziert wurden, mit Hilfe des Radioliganden [<sup>3</sup>H]CGP im Bindungsassay bestimmt (n = 3).

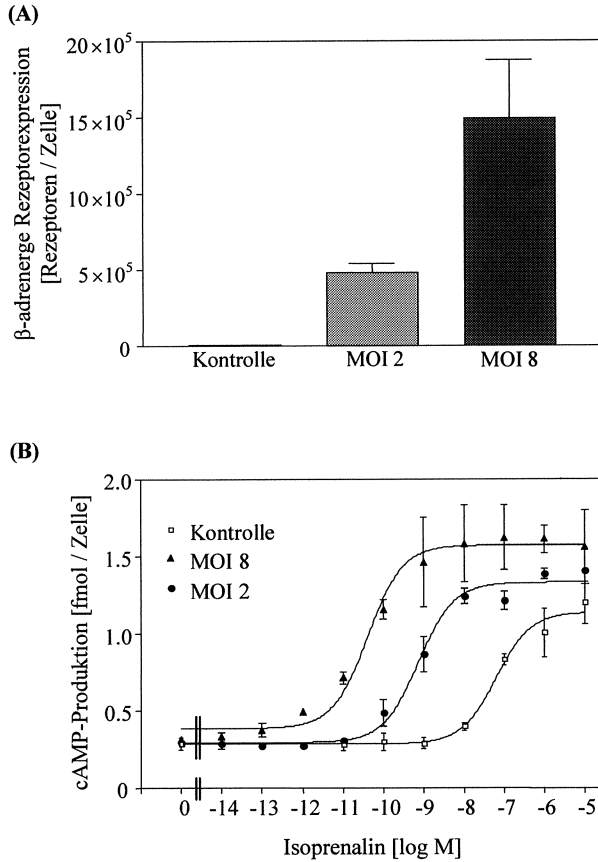
## **4 Auswirkungen einer adenoviralen Überexpression des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors**

### **4.1 Funktionelle Kopplung der $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorüberexpression in Abhängigkeit des Virustiters**

Um zu überprüfen, ob die überexprimierten Rezeptoren funktionell gekoppelt sind, wurde der Effekt der  $\beta_1$ -adrenergen Überexpression auf die Adenylatzyklase-Aktivität untersucht. Dazu wurden die kardial differenzierten und selektierten ES-Zellen (direkte Differenzierungsmethode) nach vorheriger Passagierung am 14. Differenzierungstag mit dem Ad5 $\beta_1$ AR-Virus (MOI 2 und 8) transfiziert. Nach 48 h wurde die  $\beta_1$ -adrenerge

Überexpression durch Radioligandenbindungsassays und die Adenylatzyklase-Aktivität über die Messung der Agonisten-abhängigen cAMP-Konzentration (RIA) ermittelt. Wie in Abbildung 16 A gezeigt wird, ergibt sich aus der Bestimmung der  $\beta$ -adrenergen Rezeptordichte bei einer MOI von 2 eine etwa 60-fache Überexpression beziehungsweise bei einer MOI von 8 eine etwa 200-fache Überexpression des  $\beta_1$ -ARs im Vergleich zu den Ad5GFP-transfizierten ES-Kardiomyozyten. Diese sehr hohe Überexpression bei einer MOI von 8 entspricht ungefähr  $1,5 \times 10^6$   $\beta_1$ -ARs pro Zelle (Kontroll-Kardiomyozyten: 5.600  $\beta_1$ -ARs pro Zelle).

In Abbildung 16 B wird die  $\beta$ -Rezeptor vermittelte Aktivierung der Adenylatzyklase in intakten ES-Kardiomyozyten der gleichen Transfektionskultur untersucht. Dabei zeigt sich, dass die hohen Überexpressionen keine signifikante Erhöhung der basalen Adenylatzyklase-Aktivität zur Folge haben. Die Zugabe des  $\beta$ -Agonisten Isoprenalin bewirkt jedoch eine deutliche Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve für die  $\beta_1$ -überexprimierenden ES-Kardiomyozyten. Diese Linksverschiebung ist MOI-abhängig, die höher exprimierenden ES-Kardiomyozyten erreichen eine stärkere Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve. Dies wird durch die  $EC_{50}$ -Werte von  $7,5 \times 10^{-10}$  M (MOI 2) und  $4,2 \times 10^{-11}$  M (MOI 8) im Vergleich zum Kontrollwert ( $EC_{50} = 6,2 \times 10^{-8}$  M) deutlich. Jedoch zeigt die maximale Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  Isoprenalin nur bei einer MOI von 8 einen geringen signifikanten Anstieg gegenüber den Kontroll-Kardiomyozyten.



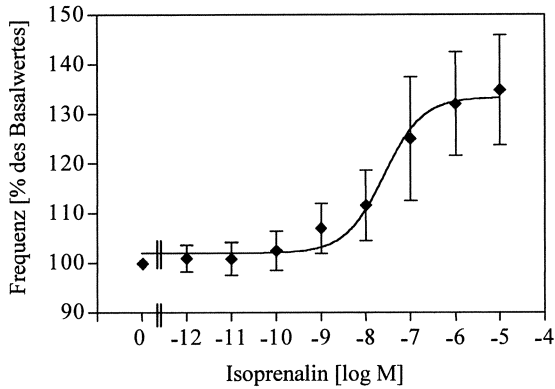
**Abbildung 16: Effekt der adenoviralen Überexpression des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors auf die Adenylatzyklase-Aktivität in ES-Kardiomyozyten. (A) Darstellung der mit dem Radioliganden [ $^3$ H]CGP ermittelten  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression. Für die Kontrolle wurden die Zellen mit dem Ad5GFP-Virus transfiziert. (B) Konzentrations-Wirkungskurve der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Bildung in Abhängigkeit der MOI (n = 3).**

#### **4.2 Kontraktionsfrequenz in Bezug zu der $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorexpression**

Der folgende Versuch sollte zeigen, ob die  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression einen Effekt auf die Kontraktionsfrequenz der ES-Kardiomyozyten hat. Um dies zu untersuchen, wurden die mit der Tröpfchentechnik differenzierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände am 14. Differenzierungstag mit dem Ad5 $\beta_1$ AR-Virus transfiziert (MOI 2). Eine Untersuchung von separierten ES-Kardiomyozyten war nicht möglich, weil die Kontraktionen zu gering und arrhythmisch waren. Die transfizierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände wurden anschließend am 16. Differenzierungstag mit dem  $\beta$ -Agonisten Isoprenalin bei einer konstanten Temperatur von  $31,3 \pm 0,5$  °C stimuliert.

Abbildung 17 stellt die Isoprenalin-stimulierte Konzentrations-Wirkungskurve der transfizierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände dar. Der Mittelwert der Basalfrequenz betrug  $128 \pm 20$  min<sup>-1</sup> und nahm durch die Isoprenalinstimulation (10  $\mu$ M) auf  $166 \pm 23$  min<sup>-1</sup> zu. Die Streuung der Basalfrequenz war dabei ähnlich groß wie die der Kontroll-Kardiomyozyten (von 42 bis 300 min<sup>-1</sup>). Wie auch in Tabelle 2 gezeigt wird, konnte keine signifikante Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve gegenüber den Kontroll-Kardiomyozyten beobachtet werden. Ebenso waren die Werte der Basalfrequenz wie auch die der maximalen Stimulation (10  $\mu$ M Isoprenalin) vergleichbar mit den Werten der Kontroll-Kardiomyozyten.

Bei den Ad5 $\beta_1$ AR-transfizierten ES-Kardiomyozyten betrug der Anteil der Zellverbände, die nicht auf eine Isoprenalinstimulation reagierten, 3 %.



**Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungskurve der Kontraktionsfrequenz von Ad5β<sub>1</sub>AR-transfizierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbände am 16. Differenzierungstag.** Die Mittelwerte mit Standardfehlern sind wegen der Streuung der Absolutwerte als Prozentwerte der Basalfrequenz dargestellt (n = 11).

	$E_0$ [min <sup>-1</sup> ]	$E_{max}$ [min <sup>-1</sup> ]	$EC_{50}$ [M]
Kontrolle	160 ± 23	199 ± 24	1,4 × 10 <sup>-8</sup>
Ad5β <sub>1</sub> AR	128 ± 20	166 ± 23	2,6 × 10 <sup>-8</sup>

**Tabelle 2: Vergleichende Parameter der Isoprenalin-stimulierten Kontraktionsfrequenz.** Es wurden Ad5β<sub>1</sub>AR-transfizierte ES-Kardiomyozyten (n = 11) und Kontroll-Kardiomyozyten (n = 10) am 16. Differenzierungstag in Zellverbänden untersucht.

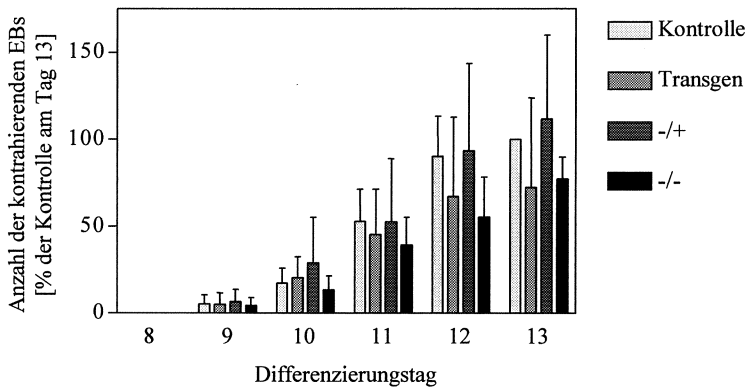
## 5 Phosducin-Klone

### 5.1 Kardiomyozytendifferenzierung in Abhängigkeit von der Phosducinexpression

Mit Hilfe der Phosducin-Klone sollte der Frage nachgegangen werden, ob die Phosducin-Expression einen Einfluss auf die kardiale Differenzierung der ES-Zellen

hat. Dazu wurden Phosducin-Klone mit einem Knock-out eines Allels (-/+) oder beider Allele (-/-) sowie ein Phosducin-überexprimierender Zellklon (Transgen) nach der Tröpfchentechnik differenziert und selektioniert (G418 Sulfat).

Um zu bewerten, ob es einen zeitlichen Unterschied im Kontraktionsbeginn und -verlauf gibt, wurde ab dem 8. Differenzierungstag die Anzahl der spontan kontrahierenden EBs unter dem inversen Mikroskop beobachtet (Abbildung 18). Wie bei den Kontroll-Kardiomyozyten waren bei den unterschiedlichen Zellklonen die ersten Kontraktionen am 9. Differenzierungstag zu beobachten. Dabei stieg die Anzahl der kontrahierenden ES-Kardiomyozyten-Zellverbände während der folgenden vier Tage kontinuierlich an und erreichte ein Maximum, das vergleichbar mit dem der Kontroll-Kardiomyozyten ist. Hieraus wird ersichtlich, dass die unterschiedlichen Phosducin-Expressionen keinen signifikanten Einfluss auf den Kontraktionsverlauf hatten.



**Abbildung 18: Darstellung des Kontraktionsverlaufes in Abhängigkeit des Differenzierungsalters.**

Dazu wurde täglich der Kontraktionsstatus von Kontroll-Kardiomyozyten und unterschiedlichen Phosducin-Klonen (Transgen, -/+ und -/-) in 96er Multiwellplatten dokumentiert (n = 4).



## 5.2 Basalfrequenz bei unterschiedlicher Phosducinexpression

Um zu bestimmen, ob eine unterschiedliche Phosducin-Expression einen Einfluss auf die basale Kontraktionsfrequenz hat, wurden heterozygote und homozygote Phosducin Knock-out Klone bzw. ES-Kardiomyozyten, die eine Überexpression des Phosducingens hatten, mittels der Tröpfchentechnik differenziert.

Am 16. Differenzierungstag ermittelte man die Basalfrequenz an selektierten ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden bei einer Temperatur von  $29,4 \pm 0,7$  °C. In Abbildung 19 sind die Basalfrequenzen der Phosducin-Klone im Vergleich zu der Kontroll-Basalfrequenz dargestellt. Zu erkennen ist, dass das Ausmaß der Phosducin-Expression keinen signifikanten Unterschied in der Basalfrequenz bewirkt.

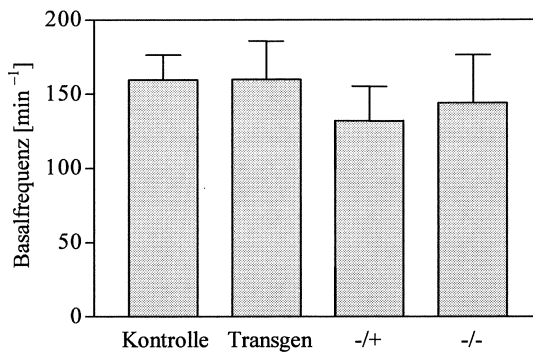


Abbildung 19: Vergleich der Basalfrequenzen bei variablen Phosducin-Expressionen am 16. Differenzierungstag (n = 16).

## **D Diskussion**

### **1 Differenzierung der Kardiomyozyten in Embryoid Bodies**

Die bisher in der Literatur zur Kardiomyozytendifferenzierung bekannten Studien zeigten, dass für eine maximale kardiale Differenzierung bestimmte Zelllinien und Kulturbedingungen erfüllt sein müssen (Guan et al., 1999b). In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinie R1 und eine konstante Zellzahl von 600 ES-Zellen pro EB bei einem Ausplattierungszeitpunkt der EBs am 6. Differenzierungstag verwendet. Dabei wurden die ersten kontrahierenden Areale am 8. Differenzierungstag nachgewiesen. Das Maximum der kontrahierenden Zellverbände erreichte am 13. Differenzierungstag 81 %. In der Literatur wurden vergleichbare Beobachtungen bei der Verwendung der Zelllinie D3 mit 300 beziehungsweise 400 ES-Zellen pro EB gemacht, woraus geschlossen werden kann, dass die Zelllinie R1 im Hinblick auf die Effizienz der kardialen Differenzierung eine Alternative zu der Zelllinie D3 ist.

Der relativ geringe Prozentsatz der kardial differenzierten ES-Zellen in einem EB (ungefähr 5 %) (Hughes, 2002) kann durch eine Selektionsmethode, die von Klug et al. eingeführt wurde, deutlich erhöht werden. Sie basiert auf der Expression eines Resistenzgens (Aminoglycosidphosphotransferase) unter der Kontrolle des herzspezifischen  $\alpha$ -MHC-Promotors. Durch die Zugabe von G418 Sulfat wird hierdurch eine nahezu reine ES-Kardiomyozytenkultur erreicht. Da die selektierten ES-Kardiomyozyten spontan kontrahieren und fähig sind, intrakardiale Verbindungen in adulten Mäuseherzen einzugehen, wurde ein negativer Einfluss der Transgenexpression ausgeschlossen. Diese Beobachtungen konnten weiterhin durch immunhistochemische Färbungen (Titin und  $\alpha$ -Actinin), die die Anwesenheit von gut entwickelten Myofibrillen in den selektierten ES-Kardiomyozyten nachwiesen, unterstützt werden (Klug et al., 1996).

Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen diese Befunde. Durch die Zugabe von G418 Sulfat am 8. Differenzierungstag wurde die kardiale Ausbeute auf

über 95 % erhöht. Des Weiteren konnte mittels der immunhistochemischen Färbung des sarkomerischen  $\alpha$ -Actinins während der kardialen Differenzierung gezeigt werden, dass diese Selektionsmethode die myofibrilläre Organisation nicht beeinträchtigt. In Übereinstimmung mit einer unselektierten *in vitro* Differenzierung (EB-Modellsystem) wurde mit zunehmender kardialer Differenzierung die hoch organisierte sarkomerische Struktur beziehungsweise die Z-Streifen sichtbar (Guan et al., 1999a). Daraus lässt sich schließen, dass die Selektionsmethode ein effizientes Verfahren für eine Optimierung der kardialen Ausbeute ist, die keinen negativen Einfluss auf die Kardiomyogenese hat.

## **2 Endogene Expression von $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

Eine Expression von  $\alpha_1$ -,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren sowie von m-cholinergen Rezeptoren und spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen wurde bisher nur indirekt durch funktionelle Effekte der adrenergen Stimulation auf die Kontraktionsfrequenz (Wobus et al., 1991), die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme (Maltsev et al., 1999) sowie auf die Aktionspotentialdauer bei ES-Kardiomyozyten gezeigt (Maltsev et al., 1993). Das Expressionsmuster der  $\beta$ -ARs während der Kardiomyogenese ist bislang nur für fetale Maus-Kardiomyozyten untersucht worden (Chen et al., 1979). Dabei nimmt die Rezeptorexpression vom 13. fetalen Tag (14 % des adulten Levels) bis zum ersten neonatalen Tag (21. Tag) um den Faktor fünf zu. Nach einem weiteren starken Anstieg innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen sinkt die Rezeptorexpression anschließend auf das adulte Niveau ab und erreicht eine Expression, die zwischen 45 und 83 fmol pro mg Membranprotein in adulten Maus-Kardiomyozyten (2. - 3. Monat) beträgt (Engelhardt et al., 1999; Hilal-Dandan et al., 2000; Zhou et al., 2000b). Die quantitative Expression der  $\beta$ -adrenergen Subtypen wird vor allem durch die Spezies bestimmt, wobei der  $\beta_1$ -adrenerge Subtyp der vorherrschende Subtyp in fetalen und adulten Kardiomyozyten ist (etwa 70%) (Steinberg, 1999; Xiang & Kobilka, 2003). In der vorliegenden Arbeit stellte sich zunächst die Frage, ob die endogene  $\beta$ -adrenerge Expression von *in vitro* differenzierten ES-Kardiomyozyten mit der von *in vivo*

differenzierten Maus-Kardiomyozyten vergleichbar ist. Die quantitative Bestimmung in 16 Tage alten ES-Kardiomyozyten zeigte eine endogene  $\beta$ -adrenerge Expression von  $103 \pm 12$  fmol Rezeptor pro mg Membranprotein. Dieser deutlich über der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression in adulten Maus-Kardiomyozyten liegende Wert könnte durch eine Rezeptor-Hochregulation unter den gegebenen Zellkulturbedingungen (geringe Adrenalin- und Noradrenalin-Konzentration) erklärt werden. Übereinstimmend mit dieser Annahme wird als Ursache für den zweiwöchigen, postnatalen Anstieg der Rezeptorexpression eine vorübergehende Verminderung der Noradrenalin-Konzentration angenommen (Chen et al., 1979).

Um die  $\beta$ -adrenerge Rezeptorexpression näher quantifizieren zu können, wurde die Expression der  $\beta$ -adrenergen Subtypen in ES-Kardiomyozyten am 16. Differenzierungstag untersucht. Dabei korreliert die erhöhte Expression des  $\beta_1$ -adrenergen Subtyps ( $\beta_1 : \beta_2 = 70 \% : 30 \%$ ) mit den Beobachtungen an adulten Maus-Kardiomyozyten. Daraus lässt sich schließen, dass die Rezeptorsubtyp-Verteilung schon in einem frühen (fetalen) Entwicklungsstadium dem adulten Expressionsmuster entspricht.

Die Stimulation des  $\beta_1$ -ARs bewirkt durch die Aktivierung der Adenylatzyklase, durch die Zunahme des zytosolischen cAMPs sowie durch die anschließende Stimulierung der cAMP-abhängigen PKA eine positive chronotrope, inotrope und lusitrope Reaktion. Bisher wurde diese Agonisten-stimulierte cAMP-Zunahme nur in *in vivo* differenzierten fetalen und adulten Maus-Kardiomyozyten bestimmt (Chen et al., 1982; Sabri et al., 2000; Tepe et al., 1999). Dabei kann die Adenylatzyklase-Aktivität parallel zu dem  $\beta$ -AR ab dem 13. fetalen Tag nachgewiesen werden, obwohl noch keine signifikante chronotrope Reaktion zu diesem Zeitpunkt feststellbar ist. In neonatalen Maus-Kardiomyozyten (21. bis 22. Tag) erreicht die basale Adenylatzyklase-Aktivität 46 % des adulten Niveaus. Postnatal unterscheidet sich die Zunahme dieser Enzymaktivität von der  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression; sie erreicht lediglich 104 % der adulten Aktivität, wohingegen der  $\beta$ -AR in den ersten zwei Wochen eine deutlich höhere Rezeptorexpression (168 %) im Verhältnis zu den adulten Maus-Kardiomyozyten zeigt (Chen et al., 1982).

In adulten Maus-Kardiomyozyten ergab die Konzentrations-Wirkungskurve für Isoprenalin einen  $EC_{50}$ -Wert von  $2,3 \times 10^{-8}$  M (Chen et al., 1982) beziehungsweise von  $1,1 \times 10^{-7}$  M (Hilal-Dandan et al., 2000). Für ES-Kardiomyozyten wurde in der vorliegenden Arbeit ein  $EC_{50}$ -Wert von  $1,2 \times 10^{-8}$  M bestimmt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse in der Literatur an Membranpräparationen ermittelt wurden, in denen die Adenylatzyklase-Aktivität etwas insensitiver reagiert. Somit kann angenommen werden, dass die Adenylatzyklase-Sensitivität in ES-Kardiomyozyten und in adulten Maus-Kardiomyozyten korreliert. Die basale Adenylatzyklase-Aktivität konnte durch die Agonisten-Stimulation (Isoprenalin  $10 \mu\text{M}$ ) um den Faktor 5,6 in den ES-Kardiomyozyten gesteigert werden, wohingegen in adulten Maus-Kardiomyozyten lediglich eine 2,6 fache Zunahme vorlag (Tepe et al., 1999). Diese Differenz könnte durch eine erhöhte Expression der Adenylatzyklase in ES-Kardiomyozyten bedingt sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die chronotrope Reaktion einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation in ES-Kardiomyozyten mit der von *in vivo* differenzierten Maus-Kardiomyozyten vergleichbar ist (Guan et al., 1999b; Wobus et al., 1991). Dabei hat das Differenzierungsalter sowohl auf die Basalfrequenz als auch auf die arrhythmische Potenz einen direkten Einfluss, wie durch die Abnahme der Basalfrequenz und die Zunahme der arrhythmischen Potenz mit zunehmendem Alter gezeigt wurde.

In der vorliegenden Arbeit war der  $EC_{50}$ -Wert der Isoprenalin-stimulierten Frequenzzunahme von ES-Kardiomyozyten am 16. Differenzierungstag vergleichbar mit den  $EC_{50}$ -Werten, die an neun Tage alten ES-Kardiomyozyten beziehungsweise an adulten Mausherzen bestimmt wurden (Engelhardt et al., 1999; Wobus et al., 1991; Zolk et al., 1998). Daraus kann geschlossen werden, dass die funktionelle Sensitivität der  $\beta$ -adrenergen Stimulation in Bezug auf den chronotropen Effekt schon ab dem neunten Differenzierungstag ausgebildet ist. Für den L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, der für den inotropen Effekt verantwortlich ist, wurde dagegen ein effizienter Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms erst ab dem 12. Differenzierungstag nachgewiesen (Maltsev et al., 1999).

Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären?

Die positive chronotrope Reaktion wird direkt über cAMP vermittelt (Interaktion der cAMP-Moleküle mit HCN-Kanälen), während die  $\beta$ -adrenerge Modulation des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals als einen weiteren Schritt die cAMP-abhängige Aktivierung der PKA erfordert. Dadurch hat die in der Literatur genannte niedrige Expression des PKA-Holoenzym (An et al., 1996) im frühen Differenzierungsstadium keinen limitierenden Einfluss auf den chronotropen Effekt, wohl aber auf die Phosphorylierung und Aktivierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals.

Eine weniger gut zu erklärende Diskrepanz besteht zu den Ergebnissen, die an fetalen Mausherzen gewonnen wurden. Hier wurde die Expression von  $\beta$ -ARs am 13. Entwicklungstag nachgewiesen, jedoch keine positiv chronotrope Reaktion bei Stimulation mit Isoprenalin, die sich erst ab dem 16. Entwicklungstag zeigte (Chen et al., 1979). Dies steht in Widerspruch zu dem oben genannten Befund an ES-Kardiomyozyten, in denen die Stimulation mit Isoprenalin schon am 9. Differenzierungstag eine chronotrope Reaktion hervorrief. Obwohl die Expression von Ionenkanälen während der *in vitro* Differenzierung von ES-Kardiomyozyten und der *in vivo* Kardiomyogenese von fetalen Maus-Kardiomyozyten parallel verläuft (Doevendans et al., 2000), muss hinsichtlich der chronotropen Reaktion doch ein Unterschied im Entwicklungsverlauf angenommen werden.

Die in dieser Arbeit bestimmten  $\text{EC}_{50}$ -Werte für die Isoprenalin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität ( $1,2 \times 10^{-8}$  M) und die Kontraktionsfrequenz ( $1,4 \times 10^{-8}$  M) zeigen eine gute Übereinstimmung. Dies ist zu erwarten, da der chronotrope Effekt direkt durch cAMP – ohne einen weiteren Zwischenschritt – vermittelt wird und somit keine Signalamplifikation möglich ist (Ludwig et al., 1998).

### **3 Adenovirale Transfektion von kardial differenzierten embryonalen Stammzellen**

Die Verwendung von adenoviralen Vektoren hat sich vor allem wegen ihrer Fähigkeit, postmitotische Zellen – beispielsweise adulte Kardiomyozyten – effizient zu infizieren,

in den letzten Jahren etabliert. In der Literatur wird diese virale Methode der Gentechnik in primären Kulturen von fetalen und adulten Maus-Kardiomyozyten mehrfach erwähnt, wobei sie sich vor allem durch den sehr hohen Prozentsatz (> 95 %) des exprimierten Transgens auszeichnet (Gojo et al., 1997; Zhou et al., 2000a). Längerfristig betrachtet können die Adenoviren das Genmaterial aber nicht in einer dauerhaft stabilen Form in den Zellkern einbringen, wodurch diese initial hohe Expression des Transgens innerhalb von zwei bis vier Wochen rasch abfällt (Yang et al., 1994). Ein adenoviraler Gentransfer in ES-Kardiomyozyten wurde bislang nur anhand der Expression des LacZ Gens untersucht. In Abhängigkeit von dem Differenzierungsalter konnte eine stabile, aber wesentlich geringere Transfektionseffizienz des Transgens nachgewiesen werden (maximal 27 %) (Rust et al., 1997). Die Effizienz des adenoviralen Gentransfers wurde in der vorliegenden Arbeit 48 Stunden nach der am 14. Differenzierungstag durchgeführten Transfektion an ES-Kardiomyozyten dargestellt, wobei der adenovirale Vektor (Serotyp 5) die cDNA für das grünfluoreszierende Protein (GFP) enthielt. Bei einer MOI von 16 exprimierten 77 % der separierten ES-Kardiomyozyten das GFP-Transgen. Verglichen mit den Ergebnissen von Rust et al., die in einer heterogenen Zellkultur ermittelt wurden (MOI 45), wird ersichtlich, dass bei einem wesentlich geringeren Virustiter eine fast dreifach höhere Transfektionseffizienz resultiert. Eine noch höhere adenovirale Transfektionsrate (97 %) wurde in isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten mit einer MOI von 10 erreicht. Diese Unterschiede können dabei nicht auf dem adenoviralen Vektor beruhen, da in Übereinstimmung mit den oben genannten Studien in dieser Arbeit der gleiche Serotyp und Promotor für die Transgen-Expression verwendet wurde. Die höhere Transfektionseffizienz in isolierten ES- und adulten Kardiomyozyten könnte, verglichen mit dem Ergebnis von Rust et al., vor allem auf der höheren Homogenität der angereicherten Kardiomyozytenkulturen beruhen, die in dieser Arbeit über die G418 Sulfat-Selektion erreicht wurde. Des Weiteren wird die Transfektionseffizienz von dem Differenzierungsalter beeinflusst, was die erhöhte Expression in den isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten erklären könnte. Ein weiteres Kriterium, auf der die unterschiedliche Transfektionseffizienz möglicherweise basiert, ist die Konfluenz der jeweiligen Kardiomyozyten-Kultur. In der vorliegenden

Arbeit konnte durch eine Separierung der ES-Kardiomyozyten-Zellverbände die Effizienz der Transgen-Expression des humanen  $\beta_1$ -ARs um den Faktor zehn erhöht werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine adenovirale Transfektion keinen Einfluss auf die kardiale Differenzierung, kontrahierende Aktivität und Lebensfähigkeit von ES- und adulten Kardiomyozyten hat (Rust et al., 1997; Zhou et al., 2000a). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen begannen in dieser Arbeit vier Stunden nach der Transfektion (MOI 2; Ad5GFP sowie Ad5 $\beta_1$ AR) etwa 60 bis 80 % der separierten ES-Kardiomyozyten erneut spontan zu kontrahieren, deren prozentuale Kontraktionsrate auch nach zwei Tagen vergleichbar war.

Seit einigen Jahren werden die Effekte einer kardialen Überexpression des  $\beta_1$ -ARs vor allem *in vivo* an transgenen Tiermodellen untersucht. In diesen Mausmodellen konnte eine fünf- bis vierzigfache  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression im Vorhof und Ventrikel erreicht werden. Eine funktionelle Konsequenz zeigte sich durch eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für die Chronotropie und Inotropie (Bisognano et al., 2000; Engelhardt et al., 1999; Zolk et al., 1998). In die gleiche Richtung weist eine *in vitro* Studie von Zhou et al., in der durch einen adenoviralen Gentransfer eine  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression in isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten erreicht wurde (Zhou et al., 2000b). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wurde die basale Adenylatzyklase-Aktivität durch die Überexpression nicht beeinflusst. Ebenso korrelieren die Daten über die maximale Agonisten-stimulierte Enzymaktivität, die in Bezug zu der Überexpression nicht proportional anstieg. Bislang gibt es jedoch keine Hinweise, wie sich eine adenoviral vermittelte  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression in ES-Kardiomyozyten verhält.

In dieser Arbeit wurde 48 Stunden nach dem adenoviralen Gentransfer (Ad5 $\beta_1$ AR) an 16 Tage alten, separierten ES-Kardiomyozyten eine bis zu 200-fache  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression erreicht. In Übereinstimmung zu den *in vivo* Befunden führte die Rezeptorüberexpression zu einer Sensitivierung der Isoprenalin-stimulierten cAMP-Produktion, die entsprechend der höheren Überexpression stärker ausgeprägt war.



Ferner zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit keine signifikante Veränderung der basalen Enzymaktivität. Im Gegensatz zu dem großen Effekt auf die halbmaximale Enzymstimulation war die maximal stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität nur geringfügig verändert. Als eine Erklärung für den geringen cAMP-Anstieg muss ein limitierender Faktor im  $\beta$ -adrenergen Signalweg zwischen dem Rezeptor und der Adenylatzyklase angenommen werden. Da das molare Verhältnis der Komponenten in Kardiomyozyten 1 : 200 : 3 ( $\beta$ -AR :  $G_s$  : Adenylatzyklase) beträgt (Post et al., 1995), kann hieraus vermutet werden, dass bei einer  $\beta$ -adrenergen Überexpression die Adenylatzyklase der limitierende Faktor ist. Diese Annahme wird durch Befunde an neonatalen Ratten-Kardiomyozyten unterstützt. Hierbei bewirkte die Überexpression der Adenylatzyklase Isoform VI einen proportionalen Anstieg der maximalen Isoprenalin-stimulierten cAMP-Antwort ohne Veränderung des  $EC_{50}$ -Wertes (Gao et al., 1998).

Insgesamt wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass die Sensitivität der Adenylatzyklase von dem Ausmaß der  $\beta_1$ -adrenergen Expression bestimmt wird, wohingegen die maximale cAMP-Produktion von der Expressionshöhe der Adenylatzyklase limitiert wird.

Die Chronotropie konnte aufgrund der Arrhythmie von separierten ES-Kardiomyozyten zuverlässig nur an ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden untersucht werden. Dabei zeigte die adenoviral vermittelte  $\beta_1$ -adrenerge Überexpression (MOI 2) keine signifikante Veränderung der Isoprenalin-stimulierten Kontraktionsfrequenz gegenüber den Kontroll-Zellverbänden. Eine mögliche Erklärung dieser fehlenden Wirkung könnte das geringere Ausmaß der  $\beta_1$ -adrenergen Überexpression in ES-Kardiomyozyten-Zellverbänden sein. Hier wurde bei dem gleichen Virustiter eine zehnfach niedrigere Überexpression im Vergleich zu den separierten ES-Kardiomyozyten erreicht. Dies deutet daraufhin, dass in den dreidimensional aufgebauten Zellverbänden nur ein oberflächlicher Gentransfer erreicht wird, wodurch nicht die gesamte Aktivität des funktionellen Synzytiums beeinflusst werden kann.

#### **4 Phosducin-Klone**

Phosducin ist ein zytosolisches Phosphoprotein, das erstmalig in den retinalen Photorezeptoren entdeckt wurde (Lolley et al., 1977). Neben dieser Lokalisierung wird Phosducin aber auch in einer Reihe anderer Organe – unter anderem im Herzen – exprimiert (Bauer et al., 1992; Danner & Lohse, 1996). Die inhibierende Funktion dieses ubiquitären Proteins in der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion beruht vor allem auf seiner hochaffinen Bindung an die  $\beta$ -Untereinheit des  $G_{\beta\gamma}$ -Proteins (Lee et al., 1987), wodurch die Reaktivierung von  $G_{\alpha}$  verhindert wird (Bauer et al., 1992; Blüml et al., 1997). Eine Reduktion des inhibitorischen Effektes kann durch eine PKA-abhängige oder durch eine GRK2-abhängige Phosphorylierung erreicht werden, die auf einer Affinitätsverminderung gegenüber der  $\beta$ -Untereinheit beruht (Bauer et al., 1992; Ruiz-Gomez et al., 2000; Yoshida et al., 1994). Diese bisher in der Literatur bekannten funktionellen Effekte von Phosducin wurden überwiegend im Rhodopsin-System der Sehzellen und für den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor beschrieben. Eine mögliche Rolle von Phosducin in Kardiomyozyten und bei der Kardiomyozytendifferenzierung ist jedoch noch nicht untersucht worden.

In der Literatur wurde ein wichtiger Einfluss der GRK2 auf die Kardiomyogenese beschrieben. Hier bewirkte die Deletion des GRK2-Gens eine Hemmung des Herzwachstums während der Embryogenese, die letztendlich zum Tod der Embryonen zwischen dem neunten und fünfzehnten Entwicklungstag führte. Der dabei zugrundeliegende Mechanismus wurde bisher noch nicht beschrieben. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Letalität der GRK2 Knock-out Mäuse in Zusammenhang mit einer fehlenden Rezeptorphosphorylierung steht (Jaber et al., 1996). Da Phosducin mit GRK2 um die Bindungsstellen an den  $\beta\gamma$ -Komplexen konkurriert, könnte die Variation der Phosducin-Expression direkt die GRK2-Bindung an dem  $\beta\gamma$ -Komplex beeinflussen und letztendlich die Rezeptorphosphorylierung verändern. Somit könnte eine erhöhte Phosducin-Expression über den Entzug der  $G_{\beta\gamma}$ -Bindungseinheiten die GRK2 vermittelte Rezeptorphosphorylierung vermindern und sich ähnlich wie die Deletion der GRK2 auf die Differenzierung von ES-Kardiomyozyten auswirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen gegen diese Hypothese. Sowohl der Knock-out beider Allele des Phosducings als auch seine Überexpression zeigten keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf den Kontraktionsbeginn und -verlauf während der kardialen Differenzierung.

In der Literatur wurde berichtet, dass die basale Herzfrequenz von der konstitutiven Aktivität der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beeinflusst wird (Engelhardt et al., 2001). Aufgrund der hemmenden Funktion von Phosducin auf den  $\beta$ -adrenergen Signalweg könnte bei einer Phosducin-Überexpression die Basalfrequenz in ES-Kardiomyozyten vermindert sein. Andererseits sollte die Basalfrequenz insbesondere bei einer homozygoten Deletion des Phosducin-Gens erhöht sein.

Dies konnte durch die Experimente der vorliegenden Arbeit nicht belegt werden. Dabei hatte eine variable Phosducin-Expression keine signifikante Veränderung der Basalfrequenz von 16 Tage alten ES-Kardiomyozyten zur Folge. Die fehlende Erhöhung der Basalfrequenz bei den homozygoten und heterozygoten Phosducin Knock-out Zellen könnte durch eine kompensatorische Funktion der Phosducin-ähnlichen Proteine (PhdLP short/long) bedingt sein. Diese zytosolischen Proteine binden ebenfalls an  $G_{\beta\gamma}$  und können dadurch wie Phosducin die  $\beta$ -adrenerge Signalantwort regulieren (Schröder & Lohse, 1996). Auf der anderen Seite könnte das überexprimierte Phosducin-Protein über eine verstärkte Phosphorylierung inaktiviert werden, wodurch die hemmende Wirkung auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade vermindert wäre.

## E Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die kardial differenzierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mittels der von Wobus et al. entwickelten Tröpfchentechnik gewonnen. Eine Optimierung der kardialen Ausbeute konnte durch eine Selektionsmethode erreicht werden, die auf der Expression eines Resistenzgens in den kardial differenzierten ES-Zellen beruht. Hierdurch wurde eine reproduzierbar hohe Anreicherung von ES-Kardiomyozyten erzielt.

Die erstmalig durchgeführte quantitative Bestimmung der endogenen  $\beta$ -adrenergen Rezeptorexpression in ES-Kardiomyozyten zeigte eine Subtyp-Verteilung, die mit derjenigen in adulten Maus-Kardiomyozyten übereinstimmt, wobei eine höhere endogene Expression in ES-Kardiomyozyten vorlag. Ferner konnte durch eine  $\beta$ -adrenerge Stimulation in 16 Tage alten ES-Kardiomyozyten eine positive chronotrope Reaktion sowie eine Aktivierung der Adenylatzyklase-Aktivität hervorgerufen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass ES-Kardiomyozyten am 16. Differenzierungstag einen vollständig ausgereiften  $\beta$ -adrenergen Signalweg aufweisen und hinsichtlich der physiologischen Effekte vergleichbare Merkmale mit adulten Maus-Kardiomyozyten haben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Fähigkeit eines adenoviralen Gentransfers in ES-Kardiomyozyten zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass der Gentransfer mittels rekombinanten Adenoviren eine sehr effiziente und durchführbare Methode zur Expression von Transgenen in ES-Kardiomyozyten ist.

Weiterhin konnte die funktionelle Kopplung der adenoviral überexprimierten  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Überexpression hatte eine ausgeprägte Sensitivierung der Rezeptorantwort zur Folge, während die maximale Isoprenalin-induzierte cAMP-Produktion nur wenig erhöht wurde. Dies entspricht Befunden an transgenen Mausmodellen mit einer  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor-überexpression. Eine Sensitivierung des chronotropen Effektes konnte dagegen nicht

gezeigt werden. Möglicherweise führte die Transfektion der ES-Kardiomyozyten-Zellverbände nur zu einem oberflächlich begrenzten Gentransfer, der keinen Einfluss auf die Gesamtheit des funktionellen Synzytiums hatte.

Außerdem wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer unterschiedlichen Phosducin-Expression auf die kardiale Differenzierungsfähigkeit in transgenen ES-Zellen untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der kardialen Differenzierung sowie in der Basalfrequenz von homozygoten und heterozygoten Phosducin Knock-out Klonen beziehungsweise von Phosducin überexprimierenden Zellklonen festgestellt werden.

## F Ausblick

In Deutschland und auch in anderen westlichen Industrienationen gelten Herz-Kreislauf-Erkrankungen als „die Erkrankungen“ des 21. Jahrhunderts. Obgleich während der letzten Jahrzehnte wichtige Erkenntnisse zu den Risikofaktoren und der Pathophysiologie gewonnen und große Fortschritte bei den Möglichkeiten akuter Therapien gemacht wurden, sind Herz-Kreislauf-Krankheiten dennoch für 40 bis 50 Prozent der Gesamtmortalität, bereits bei Erwachsenen im mittleren Alter, verantwortlich.

Die große Bedeutung der Herz-Kreislauf-Krankheiten ist die Grundlage für das Interesse vieler Forschungsgruppen, die molekulare Pathogenese aufzuklären sowie Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. In den letzten Jahren etablierte sich das dreidimensionale *in vitro* Modellsystem der EBs als eine Alternative zu den bisherigen Methoden, die vor allem auf Primärkulturen fetaler, neonataler und adulter Kardiomyozyten basieren. Gegenüber diesen zeigt das EB-Modellsystem bedeutende Vorteile: Zum einen können die ES-Kardiomyozyten in großen Massen herangezogen und für einen längeren Zeitraum kultiviert werden. Zum anderen kann durch eine einfache genetische Selektionsmethode eine nahezu reine ES-Kardiomyozytenkultur erreicht werden. Dadurch ist eine Umgehung der außerordentlich schwierigen Embryonengewinnung in frühen Entwicklungsstadien möglich. Diese genannten Vorteile ermöglichen beispielsweise Routineuntersuchungen über die Auswirkung Zelldifferenzierungs-modulierender beziehungsweise embryotoxischer Einflüsse an ES-Kardiomyozyten eines frühen Entwicklungsstadiums durchzuführen.

Die vorliegende Arbeit konnte die hohe Effizienz eines adenoviral vermittelten Gentransfers in ES-Kardiomyozyten aufzeigen. Dies eröffnet neue Wege, um die Pathophysiologie, die Therapie und eventuell die Prophylaxe von verschiedenen Herzerkrankungen, wie beispielsweise der Herzinsuffizienz, des Herzinfarktes oder von angeborenen Herzerkrankungen, weiter zu untersuchen. Zum Beispiel könnte durch eine

adenovirale Transfektion von regulatorischen Genen in kardial differenzierenden ES-Zellen die Regulation und Kontrolle der Zellbildung während der Kardiomyogenese untersucht werden und damit neue Erkenntnisse zur Pathogenese von angeborenen Herzerkrankungen gewonnen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten adenoviralen Transfektionen des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors könnten Ansatzpunkte für weitere Experimente darstellen. Mit Hilfe dieses *in vitro* Modellsystem könnten die molekularen Vorgänge bei der pathologischen Hochregulation zu Beginn der Herzinsuffizienz kurzfristig und im Gegensatz zu isolierten adulten Maus-Kardiomyozyten auch über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

Da es heute technisch möglich ist, somatische Zellkerne in Eizellen zu übertragen und daraus ES-Zellen zu erzeugen, sollte bei Transplantation von aus diesen ES-Zellen gezüchtetem Gewebe keine Gewebsabstoßungsreaktion auftreten. Obwohl Forschungen an humanen ES-Zellen in Deutschland gegenwärtig wegen der ethischen Diskussion um die künstliche Erzeugung erbgleicher Individuen umstritten sind, könnte die Stammzelltechnologie doch in der Zukunft dazu dienen, organotypische Gewebe für Transplantationszwecke zu erzeugen und damit Organtransplantationen zumindest teilweise zu vermeiden. Angesichts der Knappheit von Spenderorganen und der immer noch nicht ganz beherrschbaren Gewebeerkrankung durch den Organempfänger könnte die Gewebezucht aus ES-Zellen eine der hoffnungsvollsten Alternativen zur Transplantation von Spenderorganen darstellen.

## G Literaturverzeichnis

**Ahlquist R.P.** (1948):

A study of the adrenotropic receptors.

**Am J Physiol** **153**: 586-600

**An R.H.**, Davies M.P., Doevendans P.A., Kubalak S.W., Bangalore R., Chien K.R. & R.S. Kass (1996):

Developmental changes in  $\beta$ -adrenergic modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in embryonic mouse heart.

**Circ Res** **78**: 371-378

**Angelov D.N.**, Arnhold S., Andressen C., Grabsch H., Puschmann M., Hescheler J. & K. Addicks (1998):

Temporospatial relationship between macroglia and microglia during *in vitro* differentiation of murine stem cells.

**Dev Neurosci** **20**: 42-52

**Bain G.**, Kitchens D., Yao M., Huettner J.E. & D.I. Gottlieb (1995):

Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*.

**Dev Biol** **168**: 342-357

**Barr E.**, Carroll J., Kalynych A.M., Tripathy S.K., Kozarsky K., Wilson J.M. & J.M. Leiden (1994):

Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus.

**Gene Ther** **1**: 51-58

**Bauer P.H.**, Blüml K., Schröder S., Hegler J., Dees C. & M.J. Lohse (1998):

Interactions of phosducin with the subunits of G-proteins. Binding to the  $\alpha$  as well as the  $\beta\gamma$  subunits.

**J Biol Chem** **273**: 9465-9471



- Bauer P.H.**, Müller S., Puzicha M., Pippig S., Obermaier B., Helmreich E.J. & M.J. Lohse (1992):  
Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator.  
**Nature 358**: 73-76
- Benovic J.L.**, Strasser R.H., Caron M.G. & R.J. Lefkowitz (1986):  
 $\beta$ -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor.  
**Proc Natl Acad Sci USA 83**: 2797-2801
- Berkner K.L.** (1998):  
Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes.  
**Biotechniques 6**: 616-629
- Bertin B.**, Mansier P., Makeh I., Briand P., Rostene W., Swynghedauw B. & A.D. Strosberg (1993):  
Specific atrial overexpression of G protein coupled human  $\beta_1$ -adrenoceptors in transgenic mice.  
**Cardiovasc Res 27**: 1606-1612
- Bisognano J.D.**, Weinberger H.D., Bohlmeier T.J., Pende A., Raynolds M.V., Sastravaha A., Roden R., Asano K., Blaxall B.C., Wu S.C., Communal C., Singh K., Colucci W., Bristow M.R. & D.J. Port (2000):  
Myocardial-directed overexpression of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor in transgenic mice.  
**J Moll Cell Cardiol 32**: 817-830
- Blüml K.**, Schnepf W., Schröder S., Beyermann M., Macias M., Oschkinat H. & M.J. Lohse (1997):  
A small region in phosducin inhibits G-Protein  $\beta\gamma$ -subunit function.  
**EMBO J 16**: 4908-4915
- Bradford M.M.** (1976):  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of

protein utilizing the principle of protein-dye binding.

**Anal Biochem** **72**: 248-254

**Bristow M.R.**, Ginsburg R., Umans V., Fowler M., Minobe W., Rasmussen R., Zera P., Menlove R., Shah P., Jamison S. & E.B. Stinson (1986):

$\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective  $\beta_1$ -receptor down-regulation in heart failure.

**Circ Res** **59**: 297-309

**Brodde O.E.** (1991):

$\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors in human heart: properties, function and alterations in chronic heart failure.

**Pharmacol Rev** **43**: 203-242

**Brodde O.E.** & M.C. Michel (1999):

Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart.

**Pharmacol Rev** **51**: 651-690

**Chalothorn D.**, McCune D.F., Edelmann S.E., Tobita K., Keller B.B., Lasley R.D., Perez D.M., Tanoue A., Tsujimoto G., Post G.R. & M.T. Piascik (2003):

Differential cardiovascular regulatory activities of the  $\alpha_{1B}$ - and  $\alpha_{1D}$ -adrenoceptor subtypes.

**J Pharmacol Exp Ther** **305**: 1045-1053

**Chen C.H.**, Gray M.O. & D. Mochly-Rosen (1999):

Cardioprotection from ischemia by a brief exposure to physiological levels of ethanol: role of epsilon protein kinase C.

**Proc Natl Acad Sci USA** **96**: 12784-12789

**Chen F.M.**, Yamamura H.I. & W.R. Roeske (1979):

Ontogeny of mammalian myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors.

**Eur J Pharmacol** **58**: 255-264

**Chen F.M., Yamamura H.I. & W.R. Roeske (1982):**

Adenylate cyclase and beta adrenergic receptor development in the mouse heart.

**J Pharmacol Exp Ther 222:** 7-13

**Dani C., Smith A.G., Dessolin S., Leroy P., Staccini L., Villageois P., Darimont C. & G. Ailhaud (1997):**

Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*.

**J Cell Sci 110:** 1279-1285

**Danner S. & M.J. Lohse (1996):**

Phosducin is a ubiquitous G-protein regulator.

**Proc Natl Acad Sci USA 93:** 10145-10150

**Devic E., Xiang Y., Gould D. & B. Kobilka (2001):**

$\beta$ -adrenergic receptor subtype-specific signaling in cardiac myocytes from  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptor knockout mice.

**Mol Pharmacol 60:** 577-583

**Doetschmann T.C., Eistetter H., Katz M., Schmidt W. & 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 87:** 27-45

**Doetschmann T.C., Gossler A., Serfling E., Schaffner W., Marcu K., Stanton L. & R. Kemler (1986):**

Introduction of genes into mouse embryonic stem cells.

**Prog Clin Biol Res 217:** 47-50

**Doevendans P.A., Kubalak S.W., An R.H., Becker D.K., Chien K.R. & R.S. Kass (2000):**

Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes.

**J Moll Cell Cardiol 32:** 839-851

**Drab M.**, Haller H., Bychkov R., Erdmann B., Lindschau C., Haase H., Morano I., Luft F.C. & A.M. Wobus (1997):

From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP *in vitro* differentiation model.

**FASEB J 11:** 905-915

**Drazner M.H.**, Peppel K.C., Dyer S., Grant A.O., Koch W.J. & R.J. Lefkowitz (1997):

Potential of  $\beta$ -adrenergic signaling by adenoviral-mediated gene transfer in adult rabbit ventricular myocytes.

**J Clin Invest 99:** 288-296

**Dzimiri N.** (1999):

Regulation of  $\beta$ -adrenoceptor signaling in cardiac function and disease.

**Pharmacol Rev 51:** 465-501

**El-Armouche A.**, Rau T., Zolk O., Ditz D., Pamminger T., Zimmermann W.H., Jackel E., Harding S.E., Boknik P., Neumann J. & T. Eschenhagen (2003):

Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in  $\beta$ -adrenergic signaling in cardiac myocytes.

**FASEB J 17:** 437-439

**Engelhardt S.**, Grimmer Y., Fan G.H. & M.J. Lohse (2001):

Constitutive activity of the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor in  $\beta_1$ -receptor transgenic mice.

**Mol Pharmacol 60:** 712-717

**Engelhardt S.**, Hein L., Wiesmann F. & M.J. Lohse (1999):

Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice.

**Proc Natl Acad Sci USA 96:** 7059-7064

**Evans M.J.** & M.H. Kaufman (1981):

Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos.

**Nature 292:** 154-156

**Fässler R. & M. Meyer (1996):**

Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice.

**Genes Dev 9:** 1896-1908

**Fässler R., Pfaff M., Murphy J. Noegel A.A., Johansson S., Timpl R. & R. Albrecht (1995):**

Lack of  $\beta_1$  integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts.

**J Cell Biol 128:** 979-988

**Fraichard A., Chassande O., Bilbaut G., Dehay C., Savatier P. & J. Samarut (1995):**

*In vitro* differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons.

**J Cell Sci 108:** 3181-3188

**Frielle T., Collins S., Daniel K.W., Caron M.G., Lefkowitz R.J. & B.K. Kobilka (1987):**

Cloning of the cDNA from the human  $\beta_1$ -adrenergic receptor.

**Proc Natl Acad Sci USA 84:** 7920-7922

**Ganim J.R., Luo W., Ponniah S., Grupp I., Kim H.W., Ferguson D.G., Kadambi V., Neumann J.C., Doetschman T. & E.G. Kranias (1992):**

Mouse phospholamban gene expression during development *in vivo* and *in vitro*.

**Circ Res 71:** 1021-1030

**Gao M., Ping P., Post S., Insel P.A., Tang R. & H.K. Hammond (1998):**

Increased expression of adenylylcyclase type VI proportionately increases  $\beta$ -adrenergic receptor-stimulated production of cAMP in neonatal rat cardiac myocytes.

**Proc Natl Acad Sci USA 95:** 1038-1043

**Gauthier C., Tavernier G., Charpentier F., Langin D. & H. Le Marec (1996):**

Functional  $\beta_3$ -adrenoceptor in the human heart.

**J Clin Invest 98:** 556-562

**Gilman A.G.** (1987):

G proteins: transducers of receptor-generated signals.

**Annu Rev Biochem** **56**: 615-649

**Gojo S.**, Kitamura S., Hatano O., Takakusu A., Hashimoto K., Kanegae Y. & I. Saito (1997):

Transplantation of genetically marked cardiac muscle cells.

**J Thorac Cardiovasc Surg** **113**: 10-18

**Gossler A.**, Doetschman T., Korn R., Serfling E. & R. Kemler (1986):

Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines.

**Proc Natl Acad Sci USA** **83**: 9065-9069

**Guan K.**, Furst D.O. & A.M. Wobus (1999a):

Modulation of sarcomere organization during embryonic stem cell-derived cardiomyocyte differentiation.

**Eur J Cell Biol** **78**: 813-823

**Guan K.**, Rohwedel J. & A.M. Wobus (1999b):

Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation *in vitro*.

**Cytotechnology** **30**: 211-226

**Hajjar R.J.**, Schmidt U., Matsui T., Guerrero J.L., Lee K.H., Gwathmey J.K.,

Dec G.W., Semigran M.J. & A. Rosenzweig (1998):

Modulation of ventricular function through gene transfer *in vivo*.

**Proc Natl Acad Sci USA** **95**: 5251-5256

**Hartzell H.C.**, Mery P.F., Fischmeister R. & G. Szabo (1991):

Sympathetic regulation of cardiac calcium current is due exclusively to cAMP-dependent phosphorylation.

**Nature** **351**: 573-576

**Hattori Y.** & M. Kanno (1998):

- Role of  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtypes in production of the positive inotropic effects in mammalian myocardium: implications for the  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype distribution.  
**Life Sci** 62: 1449-1453
- Hausdorff W.P.**, Caron M.G. & R.J. Lefkowitz (1990):  
Turning off the signal: desensitization of  $\beta$ -adrenergic receptor function.  
**FASEB J** 4: 2881-2889
- Hekman M.**, Bauer P.H., Söhlemann P. & M.J. Lohse (1994):  
Phosducin inhibits receptor phosphorylation by the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase in a PKA-regulated manner.  
**FEBS Lett** 343: 120-124
- Hescheler J.**, Fleischmann B.K., Lentini S., Maltsev V.A., Rohwedel J., Wobus A.M. & K. Addicks K. (1997):  
Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis.  
**Cardiovasc Res** 36: 149-162
- Hilal-Dandan R.**, Kanter J.R. & L.L. Brunton (2000):  
Characterization of G-protein signaling in ventricular myocytes from the adult mouse heart: differences from the rat.  
**J Mol Cell Cardiol** 32: 1211-1221
- Horwitz M.S.** (1990):  
Adenoviruses.  
**Virology**, 2nd Ed. Raven Press, New York: 1723-1740
- Hughes S.** (2002):  
Cardiac stem cells.  
**J Pathol** 197: 468-478
- Insel P.A.** & L.A. Ransnas (1988):  
G proteins and cardiovascular disease.

**Circulation 78:** 1511-1513

**Jaber M.**, Koch W.J., Rockman H., Smith B., Bond R.A., Sulik K.K., Ross J., Lefkowitz R.J., Caron M.G. & B. Giros (1996):

Essential role of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function.

**Proc Natl Acad Sci USA 93:** 12974-12979

**Kass-Eisler A.**, Falck-Pedersen E., Alvira M., Rivera J., Buttrick P.M., Wittenberg B.A., Cipriani L. & L.A. Leinwand (1993):

Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*.

**Proc Natl Acad Sci USA 90:** 11498-11502

**Kaumann A.J. & H. Lemoine** (1987):

$\beta_2$ -adrenoceptor-mediated positive inotropic effects of adrenaline in human ventricular myocardium. Quantitative discrepancies with binding and adenylate cyclase stimulation.

**Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 335:** 403-411

**Kehat I.**, Kenyagin-Karsenti D., Snir M., Segev H., Amit M., Gepstein A., Livne E., Binah O., Itskovitz-Eldor J. & L. Gepstein (2001):

Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.

**J Clin Invest 108:** 407-414

**Kennedy M.**, Firpo M., Choi K., Wall C., Robertson S., Kabrun N. & G. Keller (1997):

A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis.

**Nature 386:** 488-493

**Kirshenbaum L.A.**, MacLellan W.R., Mazur W., French B.A. & M.D. Schneider (1993):

Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant



adenovirus.

**J Clin Invest** 92: 381-387

**Kitsis R.N.**, Buttrick P.M., Kass A.A., Kaplan M.L. & L.A. Leinwand:

**In: Methods in Molecular Genetics, ed. Adolph K.W., Vol. 1: 374-392, Academic, New York 1993**

**Klinke R.** & N. Silbernagel:

**Lehrbuch der Physiologie.**

**Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 1996**

**Klug M.G.**, Soonpaa M.H., Koh G.Y. & L.J. Field (1996):

Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts.

**J Clin Invest** 98: 216-224

**Kolossov E.**, Fleischmann B.K., Liu Q., Bloch W., Viatchenko-Karpinski S., Manzke O., Ji G.J., Bohlen H., Addicks K. & J. Hescheler (1998):

Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein.

**J Cell Biol** 143: 2045-2056

**Lands A.M.**, Arnold A., McAuliff J.P., Luduena F.P. & T.G. Brown (1967):

Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines.

**Nature** 214: 597-598

**Langer S.Z.** (1974):

Presynaptic regulation of catecholamine release.

**Biochem Pharmac** 23: 1793-1800

**Lee R.H.**, Lieberman B.S. & R.N. Lolley (1987):

A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with  $\beta$ - and  $\gamma$ -transducin: purification and subunit structure.

**Biochemistry** 26: 3983-3990

- Li L.**, Desantiago J., Chu G., Kranias E.G. & D.M. Bers (2000):  
Phosphorylation of phospholamban and troponin I in  $\beta$ -adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation.  
**Am J Physiol Heart Circ Physiol** **278**: 769-779
- Lohse M.J.** (1999):  
G-proteins and their regulators.  
**Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** **360**: 3-4
- Lohse M.J.**, Benovic J.L., Codina J., Caron M.G. & R.J. Lefkowitz (1990):  
 $\beta$ -arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function.  
**Science** **248**: 1547-1550
- Lolley R.N.**, Brown B.M. & D.B. Farber (1977):  
Protein phosphorylation in rod outer segments from bovine retina: cyclic nucleotide-activated protein kinase and its endogenous substrate.  
**Biochem Biophys Res Commun** **78**: 572-578
- Lompre A.M.**, Nadal-Ginard B. & V. Mahdavi (1984):  
Expression of the cardiac ventricular  $\alpha$ - and  $\beta$ -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated.  
**J Biol Chem** **259**: 6437-6446
- Ludwig A.**, Zong X., Jeglitsch M., Hofmann F. & M. Biel (1998):  
A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels.  
**Nature** **393**: 587-591
- Maltsev V.A.**, Ji G.J., Wobus A.M., Fleischmann B.K. & J. Hescheler (1999):  
Establishment of  $\beta$ -adrenergic modulation of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current in the early stages of cardiomyocyte development.  
**Circ Res** **84**: 136-145
- Maltsev V.A.**, Rohwedel J., Hescheler J. & A.M. Wobus (1993):  
Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing

sinusnodal, atrial and ventricular cell types.

**Mech Dev 44:** 41-50

**Maltsev V.A.,** Wobus A.M., Rohwedel J., Bader M. & J. Hescheler (1994):

Cardiomyocytes differentiated *in vitro* from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents.

**Circ Res 75:** 233-244

**Martin G.R.** (1981):

Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.

**Proc Natl Acad Sci USA 78:** 7634-7638

**Metzger J.M.,** Lin W.I., Johnston R.A., Westfall M.V. & L.C. Samuelson (1995):

Myosin heavy chain expression in contracting myocytes isolated during embryonic stem cell cardiogenesis.

**Circ Res 76:** 710-719

**Metzger J.M.,** Lin W.I. & L.C. Samuelson (1996):

Vital staining of cardiac myocytes during embryonic stem cell cardiogenesis *in vitro*.

**Circ Res 78:** 547-552

**Miller-Hance W.C.,** LaCorbiere M., Fuller S.J., Evans S.M., Lyons G., Schmidt C., Robbins J. & K.R. Chien (1993):

*In vitro* chamber specification during embryonic stem cell cardiogenesis. Expression of the ventricular myosin light chain-2 gene is independent of heart tube formation.

**J Biol Chem 268:** 25244-25252

**Müller M.,** Fleischmann B.K., Selbert S., Ji G.J., Endl E., Middeler G., Müller O.J., Schlenke P., Frese S., Wobus A.M., Hescheler J., Katus H.A. & W.M. Franz (2000):

Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*.

**FASEB J 14:** 2540-2548

**Nagy A.,** Rossant J, Nagy R., Abramow-Newerly W. & J.C. Roder (1993):

Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells.

**Proc Natl Acad Sci USA 90:** 8424-8428

**Ochi R.** & Y. Kawashima (1990):

Modulation of slow gating process of calcium channels by isoprenaline in guinea-pig ventricular cells.

**J Physiol 424:** 187-204

**O'Connell T.D.**, Ishizaka S., Nakamura A., Swigart P.M., Rodrigo M.C., Simpson G.L., Cotecchia S., Rokosh D.G., Grossman W., Foster E. & P.C. Simpson (2003):

The  $\alpha_{1AC}$ - and  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse.

**J Clin Invest 111:** 1783-1791

**Ostrom R.S.**, Violin J.D., Coleman S. & P.A. Insel (2000):

Selective enhancement of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6: colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes.

**Mol Pharmacol 57:** 1075-1079

**Piasecki M.T.** & D.M. Perez (2001):

$\alpha_1$ -adrenergic receptors: new insights and directions.

**J Pharmacol Exp Ther 298:** 403-410

**Ping P.**, Anzai T., Gao M. & H.K. Hammond (1997):

Adenylyl cyclase and G protein receptor kinase expression during development of heart failure.

**Am J Physiol 273:** 707-717

**Post S.R.**, Hilal-Dandan R., Urasawa K., Brunton L.L. & P.A. Insel (1995):

Quantification of signalling components and amplification in  $\beta$ -adrenergic-receptor-adenylate cyclase pathway in isolated adult rat ventricular myocytes.

**Biochem J 311:** 75-80

**Rapundalo S.T.**, Solaro R.J. & E.G. Kranias (1989):

Inotropic responses to isoproterenol and phosphodiesterase inhibitors in intact guinea pig hearts: comparison of cyclic AMP levels and phosphorylation of sarcoplasmic reticulum and myofibrillar proteins.

**Circ Res 64:** 104-111

**Rathjen P.D.**, Lake J., Whyatt L.M., Bettess M.D. & J. Rathjen (1998):

Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy.

**Reprod Fertil Dev 10:** 31-47

**Reubinoff B.E.**, Pera M.F., Fong C.Y., Trounson A. & A. Bongso (2000):

Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*.

**Nat Biotechnol 18:** 399-404

**Robbins J.**, Freyer G.A., Chisholm D. & T.C. Gilliam (1982):

Isolation of multiple genomic sequences coding for chicken myosin heavy chain protein.

**J Biol Chem 257:** 549-556

**Robbins J.**, Gulick J., Sanchez A., Howles P. & T. Doetschman (1990):

Mouse embryonic stem cells express the cardiac myosin heavy chain genes during development *in vitro*.

**J Biol Chem 265:** 11905-11909

**Robbins J.**, Horan T., Gulick J. & K. Kropp (1986):

The chicken myosin heavy chain family.

**J Biol Chem 261:** 6606-6612

**Rohrer D.K.**, Chruscinski A., Schauble E.H., Bernstein D. & B.K. Kobilka (1999):

Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking both  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptors.

**J Biol Chem 274:** 16701-16708

**Rohrer D.K.**, Desai K.H., Jasper J.R., Stevens M.E., Regula D.P., Barsh G.S., Bernstein D. & B.K. Kobilka (1996):

Targeted disruption of the mouse  $\beta_1$ -adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects.

**Proc Natl Acad Sci USA 93:** 7375-7380

**Rohwedel J.**, Maltsev V., Bober E., Arnold H.H., Hescheler J. & A.M. Wobus (1994):

Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis *in vivo*: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents.

**Dev Biol 164:** 87-101

**Rohwedel J.**, Sehlmeier U., Shan J., Meister A. & A.M. Wobus (1996):

Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells *in vitro* resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution.

**Cell Biol Int 20:** 579-587

**Rowe W.P.**, Huebner R.J., Gimore L.K., Parrott R.H. & T.G. Ward (1953):

Isolation of cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture.

**Proc Soc Exp Biol Med 84:** 570-573

**Rudnicki M.A.** & M.W. McBurney (1987):

Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines.

**In: Robertson EJ (ed.) Teratocarcinomas and embryonic stem cells – a practical approach, (pp. 19-49) IRL Press Oxford, Washington DC, USA**

**Ruiz-Gomez A.**, Humrich J., Murga C., Quitterer U., Lohse M.J. & F. Mayor (2000):

Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G-protein-coupled receptor kinase 2.

**J Biol Chem** 275: 29724-29730

**Rust E.M.**, Westfall M.V., Samuelson L.C. & J.M. Metzger (1997):

Gene transfer into mouse embryonic stem cell-derived cardiac myocytes mediated by recombinant adenovirus.

**In Vitro Cell Dev Biol Anim** 33: 270-276

**Sabri A.**, Pak E., Alcott S.A., Wilson B.A. & S.F. Steinberg (2000):

Coupling function of endogenous  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes.

**Circ Res** 86: 1047-1053

**Sack M.N.**, Rader T.A., Park S., Bastin J., McCune S.A. & D.P. Kelly (1996):

Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart.

**Circulation** 94: 2837-2842

**Sanchez A.**, Jones W.K., Gulick J., Doetschman T. & J. Robbins (1991):

Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An *in vitro* developmental study.

**J Biol Chem** 266: 22419-22426

**Schneider M.D.** & B.A. French (1993):

The advent of adenovirus. Gene therapy for cardiovascular disease.

**Circulation** 88: 1937-1942

**Schröder S.** & M.J. Lohse (1996)

Inhibition of G-protein  $\beta\gamma$ -subunit functions by phosphodiesterase-like protein.

**Proc Natl Acad Sci USA** 93: 2100-2104

**Seamon K.B.**, Padgett W. & J.W. Daly (1981):

Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells.

**Proc Natl Acad Sci USA** 78: 3363-3367

**Shamblott M.J.**, Axelman J., Wang S., Bugg E.M., Littlefield J.W., Donovan P.J.,

- Blumenthal P.D., Huggins G.R. & J.D. Gearhart (1998):  
Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.  
**Proc Natl Acad Sci USA 95:** 13726-13731
- Shimotohno K.** & H.M. Temin (1981):  
Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus.  
**Cell 26:** 67-77
- Singh K.**, Xiao L., Remondino A., Sawyer D.B. & W.S. Colucci (2001):  
Adrenergic regulation of cardiac myocyte apoptosis.  
**J Cell Physiol 189:** 257-265
- Smith S.C.**, Reuhl K.R., Craig J. & M.W. McBurney (1987):  
The role of aggregation in embryonal carcinoma cell differentiation.  
**J Cell Physiol 131:** 74-84
- Spielmann H.**, Pohl I., Döring B., Liebsch M. & F. Moldenhauer:  
The embryonic stem cell test (EST), an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells.  
**In: Van Zutphen LFM and Balls M (eds) Animal Alternatives, Welfare and Ethics, 663-669, Elsevier Science Amsterdam 1997**
- Starke K.**, Montel H., Gayk W. & R. Merker (1974):  
Comparison of the effects of clonidine on pre- and postsynaptic adrenoceptors in the rabbit pulmonary artery.  
**Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 285:** 133-150
- Steinberg S.F.** (1999):  
The molecular basis for distinct  $\beta$ -adrenergic receptor subtype actions in cardiomyocytes.  
**Circ Res 85:** 1101-1111



**Steinberg S.F.** (2002):

$\alpha_1$ -adrenergic receptor subtype function in cardiomyocytes: lessons from genetic models in mice.

**J Mol Cell Cardiol** **34**: 1141-1145

**Strader C.D.**, Sigal I.S. & R.A. Dixon (1989):

Structural basis of  $\beta$ -adrenergic receptor function.

**FASEB J** **3**: 1825-1832

**Strubing C.**, Ahnert-Hilger G., Shan J., Wiedenmann B., Hescheler J. & A.M. Wobus (1995):

Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage *in vitro* gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons.

**Mech Dev** **53**: 275-287

**Tabin C.J.**, Hoffmann J.W., Goff S.P. & R.A. Weinberg (1982):

Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene.

**Mol Cell Biol** **2**: 426-436

**Tanoue A.**, Koshimizu T., Shibata K., Nasa Y., Takeo S. & G. Tsujimoto (2003):

Insights into  $\alpha_1$ -adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies.

**Trends Endocrinol Metab** **14**: 107-113

**Taussig R.** & A.G. Gilman (1995):

Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.

**J Biol Chem** **270**: 1-4

**Tepe N.M.**, Lorenz J.N., Yatani A., Dash R., Kranias E.G., Dorn G.W. & S.B. Liggett (1999):

Altering the receptor-effector ratio by transgenic overexpression of type V adenylyl cyclase: enhanced basal catalytic activity and function without increased cardiomyocyte  $\beta$ -adrenergic signalling.

**Biochemistry** 38: 16706-16713

**Thomson J.A.**, Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S. & J.M. Jones (1998):

Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.

**Science** 282: 1145-1147

**Townsend P.J.**, Barton P.J., Yacoub M.H. & H. Farza (1995):

Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart.

**J Mol Cell Cardiol** 27: 2223-2236

**Ungerer M.**, Böhm M., Elce J.S., Erdmann E. & M.J. Lohse (1993):

Altered expression of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase and  $\beta_1$ -adrenergic receptors in the failing human heart.

**Circulation** 87: 454-463

**Vittet D.**, Prandini M.H., Berthier R., Schweitzer A., Martin-Sisteron H., Uzan G. & E. Dejana (1996):

Embryonic stem cells differentiate *in vitro* to endothelial cells through successive maturation steps.

**Blood** 88: 3424-3431

**Wartenberg M.**, Gunther J., Hescheler J. & H. Sauer (1998):

The embryoid body as a novel *in vitro* assay system for antiangiogenic agents.

**Lab Invest** 78: 1301-1314

**Wei C.M.**, Gibson M., Spear P.G. & E.M. Scolnick (1981):

Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1.

**J Virol** 39: 935-944

**Westfall M.V.**, Pasyk K.A., Yule D.I., Samuelson L.C. & J.M. Metzger (1997):

Ultrastructure and cell-cell coupling of cardiac myocytes differentiating in embryonic stem cell cultures.

**Cell Motil Cytoskeleton 36:** 43-54

**White M.**, Roden R., Minobe W., Kahn F., Larrabee P., Wollmering M., Port J.D., Anderson F., Campbell D., Feldman A.M. & M.R. Bristow (1994):

Age-related changes in  $\beta$ -adrenergic neuroeffector systems in the human heart.

**Circulation 90:** 1225-1238

**Wieland T.** & C.K. Chen (1999):

Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G-proteins.

**Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 360:** 14-26

**Wiles M.V.** (1993):

Embryonic stem cell differentiation *in vitro*.

**Methods Enzymol 225:** 900-918

**Wiles M.V.** & G. Keller (1991):

Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture.

**Development 111:** 259-267

**Wilkins J.F.**, Bitensky M.W. & B.M. Willardson (1996):

Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods.

**J Biol Chem 271:** 19232-19237

**Willardson B.M.**, Wilkins J.F., Yoshida T. & M.W. Bitensky (1996):

Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin-dependent adenylyl cyclase.

**Proc Natl Acad Sci USA 93:** 1475-1479

**Williams R.L.**, Hilton D.J., Pease S., Willson T.A., Stewart C.L., Gearing D.P., Wagner E.F., Metcalf D., Nicola N.A. & N.M. Gough (1988):

Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.

**Nature 336:** 684-687

**Wobus A.M., Grosse R. & J. Schoneich (1988):**

Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells *in vitro*.

**Biomed Biochim Acta 47:** 965-973

**Wobus A.M., Holzhausen H., Jakel P. & J. Schoneich (1984):**

Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo.

**Exp Cell Res 152:** 212-219

**Wobus A.M. & G. Kaomei (1998):**

Embryonic stem cell-derived cardiac differentiation: Modulation of differentiation and "loss of function" analysis *in vitro*.

**Trends Cardiovasc Med 8:** 64-74

**Wobus A.M., Kaomei G., Shan J., Wellner M.C., Rohwedel J., Ji G., Fleischmann B., Katus H.A., Hescheler J. & W.M. Franz (1997):**

Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes.

**J Mol Cell Cardiol 29:** 1525-1539

**Wobus A.M., Kleppisch T., Maltsev V. & J. Hescheler (1994):**

Cardiomyocyte-like cells differentiated *in vitro* from embryonic carcinoma cells P19 are characterized by functional expression of adrenoceptors and Ca<sup>2+</sup> channels.

**In Vitro Cell Dev Biol Anim 30:** 425-434

**Wobus A.M., Rohwedel J., Maltsev V. & J. Hescheler (1995):**

Development of cardiomyocytes expressing cardiac-specific genes, action potentials, and ionic channels during embryonic stem cell-derived cardiogenesis.

**Ann N Y Acad Sci 752:** 460-469

**Wobus A.M., Wallukat G. & J. Hescheler (1991):**

Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into

cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers.

**Differentiation 48:** 173-182

**Xiang Y.** & B.K. Kobilka (2003):

Myocyte adrenoceptor signaling pathways.

**Science 300:** 1530-1532

**Xiao R.P.** (2000):

Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> proteins.

**Circ Res 87:** 635-637

**Xu C.**, Police S., Rao N. & M.K. Carpenter (2002):

Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells.

**Circ Res 91:** 501-508

**Yang Y.**, Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczol E. & J.M. Wilson (1994):

Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy.

**Proc Natl Acad Sci USA 91:** 4407-4411

**Yoshida T.**, Willardson B.M., Wilkins J.F., Jensen G.J., Thornton B.D. &

M.W. Bitensky (1994):

The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin.

**J Biol Chem 269:** 24050-24057

**Zhang R.**, Zhao J., Mandveno A. & J.D. Potter (1995):

Cardiac troponin I phosphorylation increases the rate of cardiac muscle relaxation.

**Circ Res 76:** 1028-1035

**Zhou Y.Y.**, Wang S.Q., Zhu W.Z., Chruscinski A., Kobilka B.K., Ziman B., Wang S.,

Lakatta E.G., Cheng H. & R.P. Xiao (2000a):

Culture and adenoviral infection of adult mouse cardiac myocytes: methods for

cellular genetic physiology.

**Am J Physiol Heart Circ Physiol** **279**: 429-436

**Zhou Y.Y.**, Yang D., Zhu W.Z., Zhang S.J., Wang D.J., Rohrer D.K., Devic E., Kobilka B.K., Lakatta E.G., Cheng H. & R.P. Xiao (2000b):

Spontaneous activation of  $\beta_2$ - but not  $\beta_1$ -adrenoceptors expressed in cardiac myocytes from  $\beta_1\beta_2$  double knockout mice.

**Mol Pharmacol** **58**: 887-894

**Zhu W.Z.**, Wang S.Q., Chakir K., Yang D., Zhang T., Brown J.H., Devic E., Kobilka B.K., Cheng H. & R.P. Xiao (2003):

Linkage of  $\beta_1$ -adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulin kinase II.

**J Clin Invest** **111**: 617-625

**Zhu W.Z.**, Zheng M., Koch W.J., Lefkowitz R.J., Kobilka B.K. & R.P. Xiao (2001):  
Dual modulation of cell survival and cell death by  $\beta_2$ -adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes.

**Proc Natl Acad Sci USA** **98**: 1607-1612

**Zolk O.**, Kilter H., Flesch M., Mansier P., Swynghedauw B., Schnabel P. & M. Böhm (1998):

Functional coupling of overexpressed  $\beta_1$ -adrenoceptors in the myocardium of transgenic mice.

**Biochem Biophys Res Commun** **248**: 801-805

**H Abkürzungsverzeichnis**

Ad5 $\beta_1$ AR	Adenovirus Serotyp 5 mit dem humanen $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor
Ad5GFP	Adenovirus Serotyp 5 mit dem GFP-Transgen
Ag	Antigen
AK	Antikörper
5'-AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AR	adrenerger Rezeptor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
B <sub>max</sub>	Ligandenkonzentration bei maximaler Rezeptorsättigung
BSA	Albumin Fraction V aus Rinderserum
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cpm	radioaktive Impulse pro Minute
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB	Embryoid Body
EC <sub>50</sub>	Konzentration der halbmaximalen Stimulation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	et alii
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (1 g = 9,8 m/s <sup>2</sup> )
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Komplex des G-Proteins
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
G <sub>s</sub>	stimulatorisches G-Protein
G <sub>sa</sub>	$\alpha$ -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins
GDP	Guanosin-5'-diphosphat

---

GFP	Green Fluorescent Protein
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCN-Kanal	Hyperpolarisations- und zyklisches Nukleotid-aktivierter Kationen-Kanal
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IMDM	Iscove's modification of Dulbecco Medium
lacZ-Gen	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MHC	Myosin Heavy Chain
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTG	$\alpha$ -Monothioglycerol
n	Anzahl durchgeführter Experimente
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
PBS	Phosphate-buffered Saline
PDE	zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
RIA	Radioimmunassay
RT	Raumtemperatur
U	Unit



## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. M. J. Lohse für die Überlassung des Promotionsthemas und für sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit sowie für die begleitenden Diskussionen.

Sehr verbunden bin ich Herrn Dr. med. S. Freund, der an der Durchführung meiner Arbeit großes Interesse gezeigt hat. Er stand mir bei allen theoretischen sowie praktischen Problemen hilfreich zur Seite.

Herrn Professor Dr. Hein und Frau K. Hadamek danke ich für die freundliche Überlassung der embryonalen Stammzellen und den Phosducin-Zellklonen, sowie Herrn Professor Dr. Eschenhagen für die Bereitstellung der Adenoviren.

Ebenso möchte ich mich bei Frau K. Lorenz und Frau Dr. M. Philipp für ihre Ratschläge und ihre zuverlässige und freundliche Hilfsbereitschaft zu jeder Tages- und Nachtzeit danken. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bin ich sehr verbunden, weil sie durch das freundschaftliche Arbeitsklima zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

Schließlich möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Familie und meinen Freunden für ihren Zuspruch und ihre liebevolle Unterstützung bedanken.



## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name	Gärtner
Vorname	Carola
Geburtsdatum	08. Februar 1977
Geburtsort	Heidenheim an der Brenz
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Traude Gärtner, geb. Bäder; verstorben Dipl.-Phys. Walter Gärtner; Studiendirektor a.D.
Geschwister	Claudia Gärtner; approbierte Apothekerin

### Schulabschlussdaten

1983-1987	Grundschule; Heidenheim
1987-1996	Gymnasium; Heidenheim
Juli 1996	Abschluß der allgemeinen Hochschulreife

### Studium

Okt. 1996 – Dez. 1997	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Dez. 1997 – Feb. 1998	Studienplatz der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
April 1998	Studienortwechsel an die Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Sept. 1999	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

*Carola Gärtner*



