

Identifizierung und Charakterisierung  
neuer Stimulatoren der kardialen Differenzierung  
pluripotenter Stammzellen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie  
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von  
Jonas Halver

Dortmund 2017

Dekan: Prof. Dr. Roland Winter

1. Gutachter: Prof. Dr. Dennis Schade

2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2012 bis Juni 2017 unter der Leitung von Prof. Dr. Dennis Schade in der Nachwuchsgruppe Medizinische Chemie an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen publiziert:

### **Tagungsbeiträge**

Halver, J.; Carrillo García, C.; Schade, D. *A new pharmacology for Crataegus ssp.? The standardized extract WS®1442 promotes cardiogenesis from stem cells in vitro.* 9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference, Kopenhagen, **2016**

Halver, J.; Carrillo García, C.; Willems, E.; Schade, D. *A natural product approach to targeting late-stage cardiac differentiation and regeneration.* 63<sup>rd</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Budapest, **2015**

Halver, J.; Carrillo García, C.; Willems, E.; Schade, D. *A natural product approach to targeting late-stage cardiac differentiation and regeneration.* DPhG-Jahrestagung, Düsseldorf, **2015**

### **Patente**

Schade, D. und Halver, J. *BMP-Mimetics*. Nr. EP17189054.4, **2017**

### **Manuskripte in Vorbereitung**

Halver, J.; Wenzel, K.; Carrillo García, C.; Willems, E.; Koenemann, S.; Schade, D.; *The Crataegus extract WS®1442 stimulates cardiomyogenesis from stem cells in vitro: A new pharmacology?*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Kardiopoietische Differenzierung von Stammzellen .....	3
1.1.1. Die Bedeutung des Wnt-Signalweges in der Kardiogenese.....	4
1.1.2. Die Bedeutung des BMP-Signalweges in der Kardiogenese .....	6
1.2. Stammzell-Technologien in der modernen Arzneistoffentwicklung.....	8
1.3. Stammzellen in der Regenerativen Medizin .....	11
1.4. Murine embryonale Stammzellen .....	13
<b>2. Zielsetzung und Motivation</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Etablierung eines universellen kardialen <i>HT</i>-Assays mit murinen ES-Zellen</b> .....	<b>17</b>
3.1. Einleitung.....	17
3.2. Assay-Transfer und Bild-basierte Quantifizierung der Kardiomyogenese ...	18
3.3. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen .....	20
3.4. Charakterisierung bekannter kardiogener Substanzen.....	21
3.4.1. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von DMSO .....	21
3.4.2. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Wasserstoffperoxid .....	22
3.4.3. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Ascorbinsäure .....	23
3.4.4. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsfaktoren Activin A, BMP4, FGF2, TGF $\beta$ 1 und VEGF auf die Mesoderm-Induktion.....	24
3.4.5. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren der p38 MAP-Kinase .....	26
3.4.6. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des BMP-Signalweges.....	29
3.4.7. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des TGF $\beta$ -Signalweges .....	31
3.4.8. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges .....	32
3.5. Zusammenfassung .....	35
<b>4. Entwicklung eines neuen phänotypischen Assays für die Identifizierung niedermolekularer BMP-Mimetika</b> .....	<b>37</b>
4.1. Einleitung.....	37
4.2. Optimierung des mESC-basierten <i>HT</i> -Assays .....	42
4.2.1. Optimierung mechanistischer Aspekte.....	42

4.2.2.	Optimierung <i>HT</i> -relevanter technischer Aspekte .....	47
4.3.	Pilotscreen mit einer Bibliothek etablierter Arzneistoffe (LOPAC-Screen)...	49
4.3.1.	Durchführung des Pilotscreens .....	49
4.3.2.	Validierung der Screening-Hits mittels Signalweg-Reporterassays	55
4.4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	57
<b>5.</b>	<b>Charakterisierung von <i>Crataegus ssp.</i> als Modulator der kardialen Differenzierung von murinen ES-Zellen .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Einleitung.....	59
5.2.	Identifizierung der kardiogenen Aktivität des Weißdorn-Spezialextraktes WS®1442 in humanen und murinen ES-Zellen.....	63
5.3.	Validierung der WS®1442-induzierten Kardiogenese im mESC-Differenzierungsassay .....	65
5.4.	Identifizierung der kardiogen wirksamen Inhaltsstoffe des Weißdorn-Spezialextraktes WS®1442.....	66
5.5.	Charakterisierung des Wirkmechanismus von WS®1442 auf zellulärer Ebene mittels qPCR .....	68
5.6.	Untersuchung eines proliferationsstimulierenden Effektes von WS®1442 auf frühe kardiale Vorläuferzellen .....	72
5.7.	Untersuchung der Modulation entwicklungsbiologischer Signalwege durch WS®1442 und Extrakt-Fraktionen.....	77
5.8.	Genom-weite Transkriptomanalysen der mESC-Differenzierung nach Behandlung mit WS®1442 und dem Methanol Eluat .....	81
5.8.1.	Expressionsprofil der Gene, die durch 6-stündige Behandlung mit WS®1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant herunterreguliert wurden .....	83
5.8.2.	Expressionsprofil der Gene, die durch 6-stündige Behandlung mit WS®1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant hochreguliert wurden ..	85
5.8.3.	Expressionsprofil der Gene, die durch 24-stündige Behandlung mit WS®1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant herunterreguliert wurden .....	88
5.8.4.	Expressionsprofil der Gene, die durch 24-stündige Behandlung mit WS®1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant hochreguliert wurden ..	92
5.8.5.	Untersuchung von <i>upstream</i> -Regulatoren Extrakt- und Eluat-induzierter Effekte auf Transkriptomebene nach 6-stündiger Exposition .....	96
5.8.6.	Untersuchung von <i>upstream</i> -Regulatoren Extrakt- und Eluat-induzierter Effekte auf Transkriptomebene nach 24-stündiger Exposition .....	98
5.9.	Bioverfügbarkeitsstudien .....	100
5.10.	Zusammenfassung und Ausblick .....	102



---

<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>105</b>
<b>7. Abstract</b> .....	<b>107</b>
<b>8. Material und Methoden</b> .....	<b>109</b>
8.1. Material.....	109
8.1.1. Chemikalien und Reagenzien .....	109
8.1.2. Antikörper.....	110
8.1.3. Assay-Kits .....	111
8.1.4. Proteine.....	111
8.1.5. Laborgeräte.....	111
8.1.6. qPCR-Primer.....	113
8.1.7. Zelllinien.....	113
8.1.8. Verbrauchsmaterialien .....	114
8.1.9. Medien und Puffer.....	115
8.2. Methoden .....	117
8.2.1. Zellkultivierung .....	117
8.2.2. Immunzytochemische Methoden .....	119
8.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	120
8.2.4. Biochemische Methoden.....	122
8.2.5. Zellviabilitätsbestimmungen .....	123
<b>9. Strukturformelverzeichnis</b> .....	<b>125</b>
<b>10. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>127</b>
<b>11. Anhang</b> .....	<b>169</b>
11.1. p38 MAP-Kinase-Inhibitoren .....	169
11.2. Genexpressionsdaten (Transkriptomanalyse).....	171
<b>Danksagung</b> .....	<b>173</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>175</b>

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
Acta2	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
Actb	<i>actin, beta</i>
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus, Elimination
Akt	Proteinkinase B
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>
ANF	<i>atrial natriuretic factor</i> ; auch <i>Nppa</i>
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i> ; auch <i>ANF</i> bzw. <i>Nppa</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atf	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAV <sub>r</sub>	<i>bicuspid aortic valve disease with redundant leaflets and/or minimal calcification</i>
BCA	Bicinchoninsäure, engl. <i>bicinchoninic acid</i>
Bcl2	<i>B cell leukemia/lymphoma 2</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
BIO	<i>6-bromoindirubin-3'-oxime</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMPR	BMP-Rezeptor(en)
BRE	<i>BMP responsive element</i>
<i>C. monogyna</i>	eingriffeliger Weißdorn, lat. <i>Crataegus monogyna</i>
<i>C. laevigata</i>	zweigriffeliger Weißdorn, lat. <i>Crataegus laevigata</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cas	<i>CRISPR-associated proteins</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
Ccl2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i> ; auch <i>MCP1</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-kit	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>

---

c-Myc	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
COX	Cyclooxygenasen
CRISPR	<i>clustered, regularly interspaced short palindromic repeats</i>
cTnT	<i>troponin T2, cardiac; auch Tnnt2</i>
Cx40	<i>gap junction protein, alpha 5 (Gja5)</i>
D	Tag, engl. <i>day</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHP	Dihydropyridine
DM	Dorsomorphin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMH-1	Dorsomorphin Homolog-1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DP	Polymerisierungsgrad, engl. <i>degree of polymerization</i>
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
DPhG	Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft
EB	<i>embryoid bodies</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EHT	<i>engineered heart tissue</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Eomes	<i>eomesodermin</i>
EphB4	Ephrin Rezeptor B4
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinases, auch MAPK</i>
ESC	embryonale Stammzellen, engl. <i>embryonic stem cells</i>
ES-Zellen	embryonale Stammzellen
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	fötales Rinderserum, engl. <i>fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, engl. <i>fibroblast growth factor</i>
FHF	<i>first heart field</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
<i>g</i>	Einheit der Beschleunigung als Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
GA	Gesellschaft für Arzneipflanzen- und Naturstoff-Forschung
Gapdh	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSK3 $\beta$	<i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
h	Stunde, engl. <i>hour</i>
Hand1	<i>heart and neural crest derivatives expressed 1</i>
HT	Hochdurchsatz, engl. <i>high throughput</i>
HC	<i>high content</i>
Hcn4	<i>hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K<sup>+</sup> 4</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hERG	<i>human ether-à-go-go related gene</i>
hESC	humane embryonale Stammzellen, engl. <i>human embryonic stem cells</i>
HFpEF	Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion, engl. <i>heart failure with preserved ejection fraction</i>
HFrfEF	Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion, engl. <i>heart failure with reduced ejection fraction</i>
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
hPSC	humane pluripotente Stammzellen, engl. <i>human pluripotent stem cells</i>
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HSC	<i>hematopoietic stem cells</i>
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
Icam1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
Id1/2	<i>inhibitor of DNA binding 1/2</i>
IL	Interleukin
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen, engl. <i>induced pluripotent stem cells</i>

---

Isl1	<i>ISL transcription factor, LIM/homeodomain</i>
ITD	<i>inducers of TGF<math>\beta</math> receptor degradation</i>
IWP	<i>inhibitors of Wnt production</i>
IWR	<i>inhibitors of Wnt response</i>
JNK3	<i>c-Jun N-terminal kinase 3</i>
KCNE2	<i>potassium voltage-gated channel subfamily E member 2</i>
KD	<i>knockdown</i>
Kdr	<i>kinase insert domain protein receptor</i>
Kit	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
Klf4	<i>Kruppel-like factor 4</i>
lat.	lateinisch
LIF	Leukämiehemmender Faktor, engl. <i>leukemia inhibitory factor</i>
LIF 2i	LIF + 2 Inhibitoren (PD0325901, CHIR99021)
LOPAC	<i>library of pharmacologically active compounds</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M	mol/L
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mCherry	<i>monomeric cherry fluorescent protein</i>
Mef2c	<i>myocyte enhancer factor 2c</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase; auch MAP2K/MAPKK</i>
mESC	murine embryonale Stammzellen, engl. <i>murine embryonic stem cells</i>
Mesp1	<i>mesoderm posterior 1</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
miRNA	microRNA, auch miR
Mixl1	<i>Mix1 homeobox-like 1</i>
Mlc1f	<i>myosin, light polypeptide 1 (Myl1), transcript variant 1f</i>
Mlc2a	<i>myosin regulatory light chain 2, atrial isoform, auch Myl7</i>
Mlc2v	<i>myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform, auch Myl2</i>
Mlc3f	<i>myosin, light polypeptide 1 (Myl1), transcript variant 3f</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC	<i>mTOR complex</i>
Myc	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
Myh6	<i>myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha, auch <math>\alpha</math>MHC</i>
Myocd	<i>myocardin</i>
MyoD	<i>myogenic differentiation 1 (Myod1)</i>
NAC	<i>N-Acetylcystein</i>
nACh	<i>nicotinic acetylcholine</i>
NADPH	<i>Nicotinamidadenindinukleotidphosphat</i>
NCAM1	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>
NEAA	nicht-essentielle Aminosäuren, engl. <i>non-essential amino acids</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
Nkx2.5	<i>NK2 homeobox 5</i>
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NMR	kernmagnetische Resonanz, engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>
Nppa	<i>natriuretic peptide type A</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
Oct4	<i>octamer binding transcription factor 4, auch <i>Pou5f1</i></i>
OPC	oligomere Procyanidine
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
p.o.	peroral, lat. <i>per os</i>
p21	synonym für <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Cdkn1a)</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PD	Pharmakodynamik
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Pecam1	<i>platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Konzentration
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen

---

PK	Pharmakokinetik
PKC	Proteinkinase C
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PSC	pluripotente Stammzelle, engl. <i>pluripotent stem cell</i>
PTK	Protein Tyrosinkinase
<i>p</i> -Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
QT-Zeit	Messgröße bei der Auswertung des Elektrokardiogramms (EKG)
RA	Retinsäure, engl. <i>retinoic acid</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
rhBMP	rekombinantes humanes BMP
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. <i>reactive oxygen species</i>
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur, engl. <i>room temperature</i>
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase, engl. <i>receptor tyrosine kinase</i>
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehung, engl. <i>structure-activity relationship</i>
Sca1	<i>stem cell antigen 1</i>
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SD Ratten	<i>Sprague Dawley</i> <sup>®</sup> Ratten
SDS	Natriumlaurylsulfat, engl. <i>sodium lauryl sulfate</i>
SEM	Standardfehler, engl. <i>standard error of the mean</i>
SHF	<i>second heart field</i>
Shh	<i>sonic hedgehog</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Slc7a5	<i>solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter), member 5</i>
Smad2	<i>SMAD family member 2</i>
SMC	glatte Muskelzelle, engl. <i>smooth muscle cell</i>
SRF	<i>serum response factor</i>

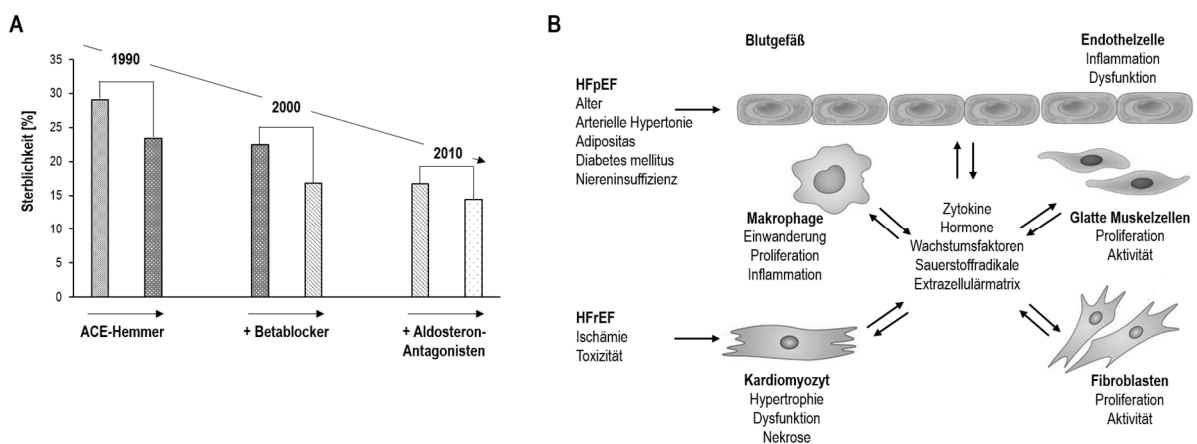
---

ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
ssp.	Unterart bzw. Subspezies
Stat	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
STF	SuperTOPflash
T	<i>brachyury</i> , auch <i>Bra</i>
T3	Triiodthyronin
Tak1	synonym für <i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (Map3k7)</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
Tbx	<i>T-box</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFBR	<i>transforming growth factor beta receptor</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i>
Tnf	<i>tumor necrosis factor</i>
TNKS	Tankyrase
Tnnt2	<i>troponin T2, cardiac</i> , auch <i>cTnT</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Polyethylenglycol <i>p</i> -(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)-phenylether
Tween20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
V	Volt
VECAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vwf	<i>von Willebrand factor</i>
w/w	Gewichtsprozent, engl. <i>weight per weight</i>
Wnt	<i>wingless intergrated or int-1</i>
WST1	<i>water soluble tetrazolium salt 1</i>
WT	Wildtyp, engl. <i>wild type</i>
X-ray	Röntgenstrahlen
Z'-Faktor	Maß der statistischen Effektgröße



## 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen waren im Jahr 2013 mit schätzungsweise 17,3 Millionen Toten und einem Anteil von 31,5 % weltweit die Haupttodesursache<sup>[1]</sup> und auch in Deutschland waren nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahr 2015 38,5 % aller Sterbefälle auf diese Erkrankungen zurückzuführen<sup>[2]</sup>. Die drei häufigsten Todesursachen insgesamt stellten hierbei die chronische ischämische Herzkrankheit (8,2 %), der akute Herzinfarkt (5,3 %) und die Herzinsuffizienz (5,1 %) dar. Auch wenn hierbei in den vergangenen Jahren die Sterbeziffer sukzessive abgenommen hat (Abbildung 1, A), adressiert die Pharmakotherapie lediglich die Symptome und nicht deren Ursache. So kommt es in Folge eines Herzinfarktes zu einem Umbau des Herzmuskels, bei dem Fibroblasten im Zuge des Heilungsprozesses aktiviert werden und zu Myofibroblasten differenzieren sowie verbliebene Kardiomyozyten hypertrophieren, um die Pumpleistung des Herzens aufrecht zu erhalten<sup>[3]</sup> (Abbildung 1, B). Diese Umbauvorgänge können jedoch langfristig zu einer chronischen Herzinsuffizienz führen, die nach aktuellem Stand der Wissenschaft nicht geheilt werden kann. Eine Pharmakotherapie, die nach aktueller Leitlinie ACE-Hemmer, Betablocker, Aldosteron-Antagonisten sowie Diuretika einschließt, führt zwar zu einer Verlängerung der Lebensdauer der Patienten und einer Verbesserung der Symptomatik, jedoch nicht zu einer vollständigen Regeneration des Herzens.



**Abb. 1:** Pharmakotherapie und Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. Die Prognose von Patienten mit chronischer systolischer Herzinsuffizienz konnte in den vergangenen Jahrzehnten durch die Therapie mit ACE-Hemmern, Betablockern und Aldosteron-Antagonisten signifikant verbessert werden (**A**) (modifiziert von Ertl *et al.* 2017)<sup>[4]</sup>. Die direkte Schädigung von Kardiomyozyten löst Nekrose oder Hypertrophie aus und führt zu Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion (HF<sub>r</sub>EF). Kardiovaskuläre Risikofaktoren begünstigen einen chronisch-inflammatorischen Zustand des Endothels und führen langfristig zu Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HF<sub>p</sub>EF). Kardiomyozyten, Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen im Herzen interagieren über die Sekretion von Signalmolekülen und beeinflussen gegenseitig ihre Funktion (**B**) (modifiziert von Lothar *et al.* 2017)<sup>[5]</sup>.

Möglicherweise könnte in naher Zukunft die Herzinsuffizienz-Therapie darüber hinaus erweitert werden, da Ergebnisse jüngster präklinischer Studien den Schluss zulassen, dass partielle Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten wie Neladenoson bialanate (BAY 1067197)<sup>[6]</sup> kardioprotektiv wirken und die Herzfunktion von Herzinsuffizienz-

Patienten verbessern<sup>[7]</sup>. Ferner startete Bayer im September 2016 eine klinische Phase-III-Zulassungsstudie mit dem Wirkstoff Vericiguat (BAY 1021189)<sup>[8]</sup>, die den Einfluss der Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz bei verminderter Auswurfleistung untersucht. Aber auch wenn sich momentan zudem einige weitere interessante Ansätze für die Therapie der Herzinsuffizienz in fortgeschrittenen klinischen Studien befinden wie die neuartige Steigerung der Inotropie durch den ersten selektiven niedermolekularen Aktivator von kardialem Myosin Omecamtiv-mecarbil<sup>[9]–[12]</sup> oder durch eine gezielte, virusvermittelte *SERCA2a* (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2a*)-Überexpression<sup>[13]–[16]</sup> scheint auch in naher Zukunft die Therapie der Herzinsuffizienz auf die Behandlung der Symptome und nicht der Ursache beschränkt zu bleiben. Ein Fortschritt zugunsten einer optimalen Postinfarkt-Therapie kann also nur über ein besseres Verständnis der Herzmuskel-Regeneration und der zugrunde liegenden Mechanismen erfolgen<sup>[17]</sup>.

Lange Zeit hielt sich die wissenschaftliche Lehrmeinung, dass das adulte Herz terminal ausdifferenziert ist und nicht regenerieren kann. Jedoch weisen jüngste Studien darauf hin, dass das Herz auch über die neonatale Phase hinaus eine – wenn auch geringe – regenerative Kapazität besitzt, die mit einer Erneuerungsrate der Kardiomyozyten von 1 bis 2 % im Alter von 25 Jahren angegeben wird und im Laufe des Lebens abnimmt<sup>[18],[19]</sup>. Da diese Regenerationsprozesse vor allem im Infarkt-geschädigten Herzen wenig untersucht sind und als letzte Möglichkeit der vollständigen Wiederherstellung der Herzfunktion nur eine Transplantation bleibt, die auf Grund der limitierten Zahl an Spender-Hezen lediglich für <1 % der Patienten eine Option darstellt und zudem mit der lebenslangen Einnahme von Immunsuppressiva verbunden ist, stellt die Erforschung von Wegen zur Wiederherstellung der Herzfunktion durch Ersetzen und/oder Regeneration verloren gegangener Kardiomyozyten eine interessante und richtungsweisende Herausforderung dar. In diesem Zusammenhang werden vor allem zwei Strategien verfolgt: zum einen die Regeneration durch Transplantation Stammzell-abgeleiteter kardialer Vorläuferzellen, Kardiomyozyten oder hergestellter Herzgewebe (*engineered heart tissue*, EHT)<sup>[20]</sup>, und zum anderen die Stimulation endogener Regenerationsprozesse *in vivo*, die vor allem vorhandene Kardiomyozyten (Proliferation) und multipotente Vorläuferzellen adressiert. Darüber hinaus beinhaltet eine *in vivo*-Regeneration zudem die Förderung der Gefäßneubildung (Vaskularisation) sowie die Minderung der Fibrose und des pathologischen Umbaus des Herzens (Remodeling)<sup>[21]–[24]</sup>.

Seit den revolutionären Erkenntnissen des späteren Nobelpreis-Trägers Shinya Yamanaka in der Stammzellforschung im Jahre 2006, dass somatische Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) reprogrammiert werden können<sup>[25]</sup>, wurden in den darauffolgenden Jahren durch verschiedene Arbeitsgruppen immer effizientere Differenzierungsprotokolle entwickelt, um in hohem Maße iPSC-abgeleitete Kardiomyozyten zu generieren. Auch wenn mittels Biopsie patientenpersonalisierte Kardiomyozyten generiert werden können, bleibt jedoch neben der noch unzureichenden Effizienz vor allem das Problem des Anwachsens ans

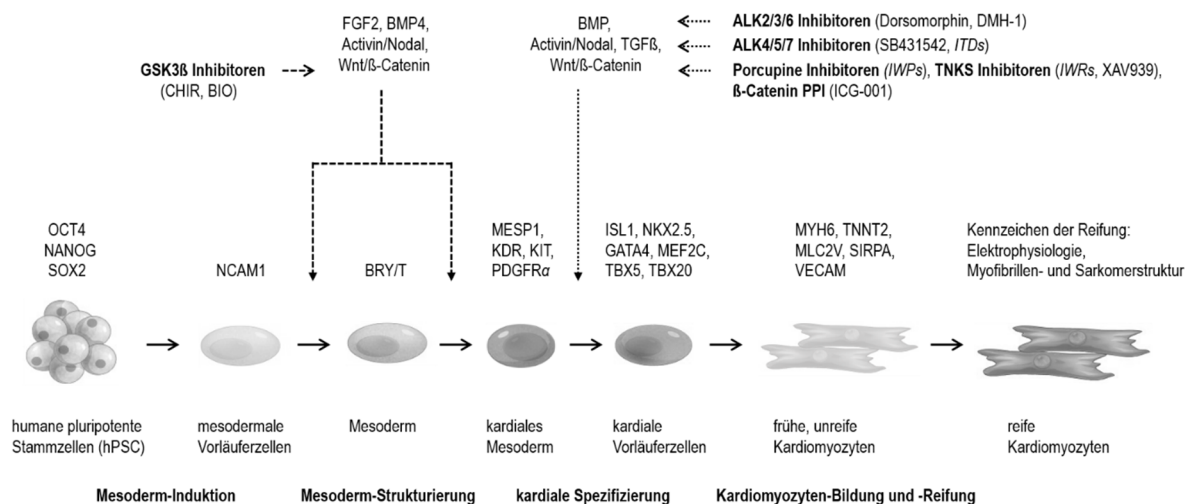
Gewebe, das zum momentanen Zeitpunkt die exogene Therapie zur Herz-Regeneration limitiert. Jüngste *proof-of-concept*-Studien von Chong *et al.* belegen zwar diesbezüglich eine erfolgreiche Transplantation hESC-abgeleiteter Kardiomyozyten in das Infarkt-Herz von nicht-menschlichen Primaten<sup>[20]</sup>, die Anwendung am Menschen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt aber noch ausstehend. Besonders interessant scheint deshalb der endogene Regenerationsansatz, bei dem existente Zellpopulationen adressiert und stimuliert werden. Sowohl im Fall eines exogenen als auch in dem eines endogenen Therapieansatzes ist dabei im Sinne einer effizienten, kostengünstigen und reproduzierbaren Methodik die Verwendung niedermolekularer Substanzen (*small molecules*) von Vorteil. Darüber hinaus finden sich auch Anwendungen von Ribonukleinsäuren (miRNA, anti-miRNA), Peptiden und Proteinen<sup>[26],[27]</sup>, die jedoch hinsichtlich (physiko-)chemischer Eigenschaften und der Möglichkeit einer pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Optimierbarkeit benachteiligt sind. Zudem besteht die Möglichkeit niedermolekulare Substanzen zielgerichtet zu applizieren und auf Grund des pharmakodynamischen und -kinetischen Verständnisses deren Dosis optimal dem Bedarf anzupassen<sup>[17]</sup>. In Folge dessen finden niedermolekulare Substanzen mittlerweile in der Stammzellbiologie und Regenerativen Medizin eine breite Anwendung<sup>[28]–[31]</sup>.

### 1.1. Kardiopoietische Differenzierung von Stammzellen

Für die Differenzierung von Stammzellen zu Kardiomyozyten sind in den vergangenen Jahren immer effizientere Protokolle entwickelt worden, die immer höhere Quantitäten an Kardiomyozyten hervorgebracht haben. Während hierbei Anfang des Jahrtausends lediglich einige wenige Substanzen bekannt waren, die die kardiale Differenzierung stimulierten wie die 2003 von Takahashi und Kollegen in einem Screen mit einer mESC-Reporterzelllinie (CGR8  $\alpha$ MHC-GFP) identifizierte Ascorbinsäure<sup>[32]</sup>, die einen eher unspezifischen Wirkmechanismus aufweist, wurden im Laufe der Zeit weitere Substanzen identifiziert und medizinisch optimiert, die selektiv bestimmte entwicklungsbiologische Signalwege adressieren und in diesem Zusammenhang auch zu einem besseren Verständnis der mechanistischen Vorgänge während der Kardiogenese führten. Ein Beispiel hierfür bildet der Inhibitor des BMP-Signalweges Dorsomorphin<sup>[33]</sup>, der 2008 von Hao *et al.* als kardiogene Substanz identifiziert wurde<sup>[34]</sup> und in nachfolgenden SAR-Studien hinsichtlich einer höheren ALK2/ALK3-Selektivität über LND-193189<sup>[35]</sup> und DMH-1<sup>[36]</sup> zu ML347 optimiert wurde<sup>[37]</sup>.

Mittlerweile sind neben weiteren kardiogenen Faktoren zahlreiche solcher niedermolekularen Substanzen bekannt, die in Wechselwirkung mit verschiedenen Signalwegen treten und diese in Folge dessen entweder inhibieren oder aktivieren und so die Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu Kardiomyozyten fördern<sup>[17]</sup>. Die kardiale Differenzierung kann dabei in verschiedene Abschnitte unterteilt werden: die Mesoderm-Induktion, die Mesoderm-Strukturierung, die Bildung des kardialen Mesoderms und der kardialen Vorläuferzellen, und die Kardiomyozyten-Induktion mit nachfolgender Kardiomyozyten-Reifung (Abbildung 2). Auch wenn ein komplexes Zusammenspiel vieler Signalwege diesen Entwicklungsschritten zugrunde liegt,

kommt sowohl dem BMP- als auch dem Wnt-Signalweg für die Kardiogenese eine besondere Rolle zu, sodass ein Großteil gegenwärtiger Differenzierungsprotokolle diese beiden Signalwege adressiert. Beide Signalwege weisen dabei eine biphasische Rolle auf, die durch einen kardiogenen Einfluss einer Signalweg-Aktivierung in der frühen kardialen Entwicklungsphase der Mesoderm-Induktion und den einer Inhibierung zum späteren Zeitpunkt der kardialen Spezifizierung gekennzeichnet ist<sup>[38]</sup>. Vor allem frühe Protokolle beinhalten dabei vornehmlich Wnt-Aktivatoren und -Inhibitoren zugunsten einer gerichteten kardialen Differenzierung<sup>[39]–[41]</sup>. Gonzalez *et al.* verwendeten darüber hinaus zudem den Nodal/Activin/TGF $\beta$ -Inhibitor SB431542 sowie den Hedgehog-Agonisten Purmorphamin<sup>[42]</sup>, und Burrige und Kollegen entwickelten jüngst ein Protokoll zur effizienten Generierung hPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten unter Verwendung einer Vielzahl an niedermolekularen Substanzen, die nicht nur Wnt-aktivierend bzw. -inhibierend wirkten<sup>[43]</sup>. Während im Sinne einer effizienten Mesoderm-Induktion eine Aktivierung des Wnt-Signalweges mittels niedermolekularer Substanzen, die die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibieren, möglich ist, steht zum gegenwärtigen Zeitpunkt für eine BMP-Aktivierung lediglich das rekombinante Protein zur Verfügung, das eine breite Anwendung in verschiedenen Protokollen zur kardialen Differenzierung muriner oder humaner Stammzellen findet.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der kardialen Differenzierung von humanen pluripotenten Stammzellen und der dabei entscheidenden Faktoren und Signalwege sowie der für eine direkte Differenzierung verwendeten niedermolekularen Modulatoren (modifiziert von Schade *et al.* 2015)<sup>[17]</sup>. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen eine Signalweg-Aktivierung, die gepunkteten Pfeile eine Signalweg-Inhibierung.

### 1.1.1. Die Bedeutung des Wnt-Signalweges in der Kardiogenese

Der Wnt-Signalweg (Abbildung 3, A) ist für eine Vielzahl wichtiger biologischer Prozesse bei der Entwicklung des Herzens verantwortlich und nimmt bei der Proliferation und Differenzierung verschiedener Stamm- und Vorläuferzellen eine entscheidende Rolle ein<sup>[44],[45]</sup>. In Folge dessen stellt die Wnt-Modulation ein potentiell pharmakologisches Ziel für die Regeneration des beschädigten Herzwes dar und findet sich in nahezu allen Differenzierungsprotokollen zur Generierung Stammzell-abgeleiteter Kardiomyozyten. Wie oben bereits erwähnt, ist

für eine effiziente Mesoderm-Induktion die Aktivierung des Signalweges essentiell, wobei niedermolekulare Substanzen wie die Wntepane<sup>[46],[47]</sup> nur selten Verwendung finden und die Inhibition der Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) in nahezu allen Differenzierungsprotokollen verwendet wird, um den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg zu aktivieren. Obwohl mittlerweile mehrere GSK3 $\beta$ -Inhibitoren bekannt sind, finden vor allem CHIR99021 und BIO eine breite Anwendung und scheinen laut Studien von Burridge *et al.* anderen Inhibitoren bezüglich einer effizienten Kardiogenese überlegen zu sein<sup>[43]</sup>. Die Inhibition des Wnt-Signalweges hingegen ist entscheidend für eine effiziente kardiale Spezifizierung<sup>[48],[49]</sup> und scheint *in vivo* zudem positive Effekte auf das Infarktmyokardium auszuüben<sup>[50]–[52]</sup>. Mittlerweile ist eine Vielzahl an Wnt-Inhibitoren beschrieben, die den Signalweg auf unterschiedlichen Ebenen der Signalkaskade inhibieren. Auf Rezeptor- und Zelloberfläche-Ebene können Porcupine-Inhibitoren wie Wnt-C59 die Palmitoylierung der Wnt-Liganden und damit die Freisetzung der Wnt-Proteine verhindern und so den Wnt-Signalweg inhibieren<sup>[43],[53],[54]</sup>. Auf zytosolischer Ebene führt die Inhibition der Axin-destabilisierenden Tankyrase (TNKS) durch beispielsweise DS-I-6, XAV939 und NVP-TNKS656 sowie die Aktivierung von CK1 $\alpha$  durch Pyrinium zu einer Aktivierung des  $\beta$ -Catenin-Abbau-Komplexes und damit zu einer Verringerung des  $\beta$ -Catenin-Proteinlevels. Darüber hinaus sind einige niedermolekulare Substanzen beschrieben, die zudem auf Transkriptionsebene den Wnt-Signalweg inhibieren können. Einige von ihnen inhibieren dabei spezifische Protein-Protein-Interaktionen (PPI) von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren oder Cofaktoren der Transkriptionskaskade<sup>[55]</sup>. In diesem Zusammenhang beschreiben Sasaki *et al.* die Inhibition der  $\beta$ -Catenin/CBP-Interaktion durch ICG-001 als möglichen Ansatz der Postinfarkt-Therapie durch Förderung endogener Regenerationsprozesse wie der Differenzierung kardialer Vorläuferzellen<sup>[56]</sup>. Die Autoren verweisen dabei zudem auf weitere biologische Mechanismen wie der Inhibition der Fibrose, der Apoptose und der Hypertrophie des Herzens als zusätzlich nutzbringenden Effekt der Modulation der Wnt/ $\beta$ -Catenin/CBP-Signalisierung<sup>[57]–[60]</sup>. Des Weiteren findet sich mit KY02111 eine weitere interessante niedermolekulare Substanz, die basierend auf kardiogenen Hits eines Screens mit ES-Zellen von Affen entwickelt wurde und den Wnt-Signalweg möglicherweise auf der Ebene des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes inhibiert<sup>[61]</sup>. Die kardiogene Wirkung wird dabei in Kombination mit Wnt-Inhibitoren des Porcupine- und TNKS-Typs verstärkt, weshalb Schade *et al.* postulieren, dass die besondere kardiogene Aktivität von KY02111 im Wirkprofil begründet liegen könnte, dass mehrere zelluläre Ziele adressiert werden<sup>[17]</sup>. Arbeiten von Lanier *et al.* und Burridge *et al.* verglichen jüngst verschiedene Wnt-Inhibitoren bezüglich ihrer kardiogenen Aktivität, wobei ähnliche Einschätzungen zu dem vorteilhaften Wirkprofil der Inhibitoren des IWR-Typs erhalten wurden, welches vor allem in der geringen Toxizität und den wenigen *off-targets* begründet liegt<sup>[43],[62]</sup>. Darüber hinaus finden vor allem Wnt-Inhibitoren des Porcupine- und TNKS-Typs in Protokollen zur gerichteten kardialen Differenzierung von Stammzellen die häufigste Anwendung<sup>[17]</sup>.



zuvor als Inhibitor der Smad1/5/8-Phosphorylierung von BMP Typ I-Rezeptoren (ALK2, -3 und -6) in einem phänotypischen Screen zur Identifizierung von Substanzen, die die Bildung der embryonalen dorsoventralen Achse im Zebrafisch beeinflussen, entdeckt<sup>[33]</sup>. Nachfolgende Studien belegen jedoch, dass Dorsomorphin nicht nur den Smad-abhängigen Signalweg adressiert, sondern auch die AMP-Kinase (AMPK) sowie die Rezeptor Tyrosin Kinasen des PDGF- und VEGF-Signalweges<sup>[33],[66],[67]</sup>, woraus Hao *et al.* das besondere kardiogene Wirkprofil von Dorsomorphin auf mesodermale (Brachyury T<sup>+</sup>) und kardiovaskuläre Vorläuferzellen (Mesp1<sup>+</sup>) in ihren Studien ableiteten<sup>[34]</sup>. In der Folge entwickelten die Autoren in einer großen *in vivo*-SAR-Studie einen niedermolekularen BMP-Inhibitor der 2. Generation, Dorsomorphin Homolog-1 (DMH-1), der eine höhere Selektivität gegenüber BMP Typ I-Rezeptoren als Dorsomorphin und LDN193189 aufweist und keine inhibitorische Aktivität für die p38 MAPK-Phosphorylierung, der Activin A-induzierten Smad2-Phosphorylierung oder der VEGF-induzierten Flk1-Phosphorylierung besitzt<sup>[67]</sup>. DMH-1 zeigt dabei nicht nur im Vergleich zu Dorsomorphin einen größeren Effekt auf die frühe kardiale Entwicklung, sondern führt auch zu einer Anreicherung Wnt-responsiver prokardialer Vorläuferzellen, die nachfolgend die späte Phase der Kardiogenese durchlaufen<sup>[36]</sup>. Dieses steht im Einklang mit weiteren Studien, die belegen, dass im späteren Verlauf der kardialen Differenzierung, nachdem das Mesoderm ausgebildet ist, die BMP- sowie Nodal/Activin/TGF $\beta$ -Signalwege von großer Bedeutung für die Strukturierung zum kardialen Mesoderm und der kardialen Vorläuferzellen sind<sup>[68]–[70]</sup>. In dieser Phase des kardialen Mesoderms fördert die BMP- und Nodal/Activin/TGF $\beta$ -Inhibition durch niedermolekulare Substanzen die Bildung kardialer Vorläuferzellen, wobei Kattman *et al.* in diesem Zusammenhang eine effiziente Möglichkeit zur Förderung dieses Entwicklungsschrittes durch Kombination von Dorsomorphin und SB431542, einem pan-TGF $\beta$ -Inhibitor mit mangelnder Selektivität für Nodal/Activin und TGF $\beta$ , angeben<sup>[70]</sup>. Dabei stellt auch A-83-01 eine vielversprechende Alternative zu SB431542 als Inhibitor der TGF $\beta$ -Superfamilie ALK4, -5 und -7 dar<sup>[71]</sup>. In einem mESC-basierten *HT*-Screen mit 17 000 Substanzen identifizierte die Mercola-Arbeitsgruppe darüber hinaus eine neue Klasse an TGF $\beta$ -Inhibitoren, die die Kardiogenese muriner und humaner ES-Zellen zum Zeitpunkt der kardialen Mesoderm-Spezifizierung fördert<sup>[72]</sup>. Diese spezifische Klasse *b*-annelierter 1,4-Dihydropyridine übt dabei ihre neuartige inhibitorische Wirkung auf den Signalweg über eine Abspaltung des TGF $\beta$  Typ II-Rezeptors von der Zelloberfläche und dessen anschließenden proteasomalen Abbau aus, was folglich zu ihrer Namensgebung, *inducers of TGF $\beta$  receptor degradation* (ITD), führte<sup>[72]</sup>.

Die Modulation der vier Signalwege von Wnt, BMP, TGF $\beta$ /Nodal/Activin und FGF stellt folglich die Hauptstrategie für die effiziente Differenzierung pluripotenter Stammzellen zu Kardiomyozyten dar. Alle vier sind dabei in der frühen Phase der kardialen Entwicklung wie der Mesoderm-Induktion von Bedeutung, wobei niedermolekulare Aktivatoren des Wnt-Signalweges wie CHIR99021 und BIO ebenso verwendet werden wie die rekombinanten Proteine BMP4 und FGF für die Stimulation ihrer Signalwege. Die späte Phase der kardialen Differenzierung wie die kardiale Spezifizierung kann unter chemisch kontrollierten Bedingungen vor allem durch die Inhibierung des Wnt-Signalweges gefördert werden, wobei viele Protokolle jedoch auch die Modulation der

Signalwege der TGF $\beta$ -Superfamilie für eine effiziente Kardiomyozyten-Bildung verwenden<sup>[17]</sup>.

## 1.2. Stammzell-Technologien in der modernen Arzneistoffentwicklung

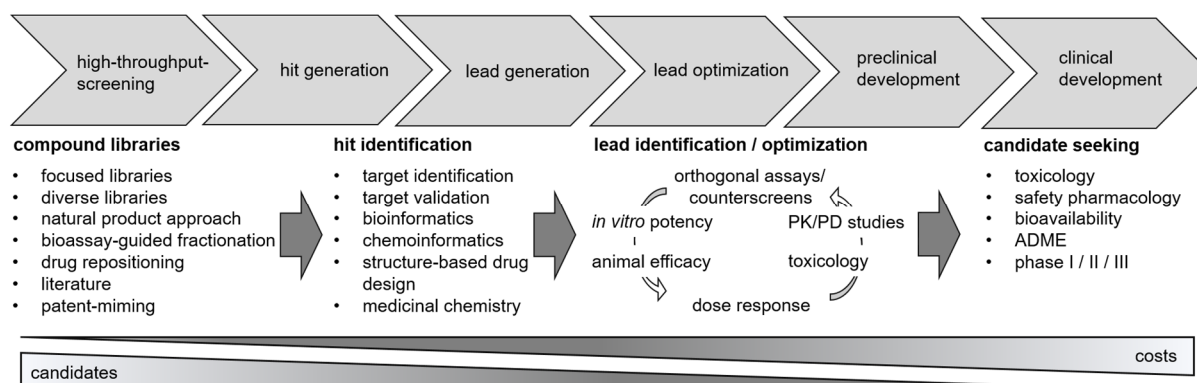
Wie sich anhand oben bereits erwähnter Beispiele belegen lässt, erfolgt die Identifizierung neuer aktiver Substanzen in der Regel über Screening-basierte Methoden. Diese stellen dabei im Zuge einer nachfolgenden Weiterentwicklung den Ausgangspunkt für weitere Optimierungen hinsichtlich der biologischen Aktivität und Selektivität sowie der physikochemischen und toxikologischen Eigenschaften dieser *hits* dar. Neben virtuellen Screening-Methoden, die u.a. die computergestützte Ligandenbindung (*docking*) dreidimensionaler Pharmakophor-Modelle und deren wechselseitige Passgenauigkeit bewerten (*scoring*)<sup>[73]</sup>, kann in diesem Zusammenhang vor allem zwischen *target*-basierten und phänotypischen Screening-Methoden unterschieden werden. Während *target*-basierte Ansätze hierbei in biochemischen oder zellulären Assays unter Kenntnis des genauen *targets* und molekularen Wirkmechanismus (*molecular mechanism of action*) vergleichsweise kostengünstig und im Hochdurchsatzformat (*high throughput format*) durchgeführt werden können, jedoch die Übertragbarkeit auf komplexe physiologische Prozesse *in vivo* auf Grund der artifiziellen immortalisierten Zellsysteme eingeschränkt ist, können phänotypische Screens auch Substanzen identifizieren, deren *target* noch unbekannt ist oder deren pharmakologischer Effekt auf eine zeitgleiche Aktivität an mehreren *targets* zurückzuführen ist<sup>[74]</sup>. So wurde beispielsweise Ezetimibe auf Grund seiner cholesterinsenkenden Wirkung entdeckt noch bevor das *Niemann-Pick C1-like Protein 1* (NPC1L1) als sein therapeutisches *target* validiert wurde<sup>[75],[76]</sup>. Darüber hinaus erlauben phänotypische *High-Content (HC)*-Screens zeitgleich eine aussagekräftigere Bewertung toxischer Einflüsse der getesteten Substanzen, sodass solche Substanzen bereits frühzeitig aus dem Entwicklungsprozess ausgeschlossen werden können. Hingegen ist jedoch von Nachteil, dass durch Unkenntnis des *targets* und des molekularen Wirkmechanismus die *hit*-Optimierung durch Struktur-Wirkungsbeziehungen (*SAR*) erschwert ist. Nichtsdestotrotz belegen vergleichende Studien von Swinney *et al.*, dass im Vergleich zu *target*-basierten Screens (17) die Mehrzahl der von der FDA zwischen 1999 und 2008 zugelassenen niedermolekularen *first-in-class* Arzneimittel durch phänotypische Screens (28) entdeckt worden ist<sup>[77]</sup>. Folglich stellen phänotypische Screening-Assays eine produktive Methode zur Identifizierung neuartiger Wirkstoffe dar und sind generell komplexer und in ihrer Entwicklung und Durchführung kostenintensiver als *target*-basierte Assays<sup>[78]</sup>.

Screens mit Zebrafischen stellen dabei eine besonders komplexe Form phänotypischer Assays dar. Diese werden normalerweise mit lebenden Zebrafisch-Embryonen oder -Larven durchgeführt und ermöglichen die Untersuchung verschiedener biologischer Prozesse und Organsysteme. Dadurch wird eine größere phänotypische Vielfalt als in zellbasierten Assays untersucht und es lassen sich zudem nicht nur Informationen über die Toxizität, sondern auch über die pharmakodynamischen Eigenschaften der getesteten Substanzen erhalten<sup>[74]</sup>.



Visnagin wurde beispielsweise als kardioprotektive Substanz (arrhythmogenen Kardiomyopathie-Modell) ebenso in einem Zebrafisch-basierten Screen identifiziert<sup>[79]</sup> wie der bereits oben vorgestellte BMP-Inhibitor Dorsomorphin. Bei letzterem konnte dabei durch den Vergleich des substanzinduzierten Phänotyps mit dem genetischen Phänotyp ALK2 als *target* identifiziert werden, da das Protein von der Mutation betroffen und für den Phänotyp einer nicht ausgebildeten Schwanzflosse (*lost-a-fin phenotype*) verantwortlich war<sup>[33]</sup>.

Wichtige Assay-Parameter zur Identifizierung aktiver Substanzen (*hit identification*) stellen dabei u.a. die Qualität (Z'-Faktor), Robustheit und Reproduzierbarkeit dar. In Abhängigkeit von dem gewählten *cut-off*, der beispielsweise die dreifache Standardabweichung der mittleren Aktivität ( $3\sigma$ ) darstellen kann, resultieren aus einer solchen Screening-Kampagne mehr oder weniger aktive Primär-*hits*, deren entscheidendstes Bewertungskriterium jedoch vor allem die Möglichkeit der Optimierbarkeit zu wirkstoffähnlichen (*drug-like*) Kandidaten im Rahmen einer Leitstruktur-Generierung (*lead generation*) ist<sup>[80]</sup> (Abbildung 4). Eine Bewertung promiskuitiver und artifizierender Eigenschaften wie Chelat-Bildung, Fluoreszenz, Fluoreszenz-Quenching oder Redox-Eigenschaften, die den *Readout* vieler proliferativer und fluoreszenzbasierter Assays beeinflussen können, findet im Zuge einer Priorisierung und Reduzierung der *hits* zugunsten eines frühzeitigen Ausschlusses einiger Substanzen aus dem weiteren Entwicklungsprozess ebenso statt wie eine Bewertung physikochemischer Eigenschaften (Größe, Lipophilie und Polarität) unter beispielsweise Zuhilfenahme von Methoden wie der Chemoinformatik<sup>[81]</sup>.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Arzneistoffentwicklung (*drug development*).

In der nachfolgenden *hit-to-lead*-Phase dienen orthogonale Assays und *counterscreens* dazu die SAR der *hit*-Serien (*hit series*) weiterzuentwickeln und die Eigenschaften dieser Substanzen wie Wirksamkeit und Selektivität sowie Löslichkeit und Bioverfügbarkeit zu verbessern. Dabei können strukturbasierte Design-Techniken wie das molekulare Modellierung (*molecular modelling*) und Methoden wie die X-ray Kristallografie und NMR verwendet werden, um die SAR schneller und zielgerichteter zu entwickeln<sup>[82]</sup>. Die Notwendigkeit sich bereits in den frühen Entwicklungsphasen der

*hit* und *lead generation* mit den chemischen Eigenschaften der Substanzen zugunsten einer kosteneffizienten Entwicklung kritisch auseinanderzusetzen, belegen hierbei Untersuchungen von Waring *et al.* zu dem Einfluss der physikochemischen Eigenschaften auf die Promiskuität<sup>[83],[84]</sup> und die toxische Wirkung *in vivo*<sup>[85],[86]</sup> und dem damit verbundenen Scheitern dieser Substanzen im fortlaufenden Entwicklungsprozess<sup>[87]</sup>. Im Rahmen dieser präklinischen Entwicklungsphase erlauben Unbedenklichkeits- und Toxizitätsstudien (*safety pharmacology, toxicology*) *in vitro* und *in vivo* zudem eine Erhöhung der Erfolgchancen zukünftiger wirkstoffähnlicher Kandidaten, wobei jüngste technologische Fortschritte im *gene editing* wie die CRISPR-Cas9-Technologie<sup>[88]</sup> sowie in der iPSC-Technologie durch krankheits- und patientenspezifische Modelle („*disease-in-a-dish*“, „*organs-on-a-chip*“<sup>[89]</sup>) eine immer bessere *in vivo*-Prognose ermöglichen und so die Lücke zwischen präklinischer Vorhersage basierend auf Studien im Zell- und Tiermodell und tatsächlichem Ergebnis klinischer Studien im Menschen verringert wird<sup>[90]</sup>.

Die Entwicklung eines neuen Medikamentes von der ursprünglichen Idee bis zu seiner Markteinführung ist folglich ein komplexer Prozess, der bis zu 15 Jahren dauert und bis zu 1 Mrd. US \$ kostet<sup>[82]</sup>. Vor allem der Kostenanteil an Forschung und Entwicklung (*research and development, R&D*) hat in den vergangenen Jahrzehnten sukzessive zugenommen, wobei Toxizität nach wie vor der führende Grund für ein Scheitern potentieller Arzneikandidaten in den späten Phasen der Entwicklung ist<sup>[91]</sup>, und führte zu einem immer größeren Ungleichgewicht zwischen Aufwand und Ertrag. Aus diesem Produktivitätsproblem resultierte eine neue Entwicklungsstrategie, bei der vorhandene Medikamente außerhalb ihres bestehenden Indikationsgebietes getestet und eingesetzt werden (*repositioning, repurposing*)<sup>[92]</sup>. Dadurch, dass diese Medikamente bereits hinsichtlich ihrer Unbedenklichkeit und Qualität sowie ihrer pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften optimiert wurden, kann ein rascher Einstieg in die klinische Weiterentwicklung erfolgen. Ein Beispiel für diese Strategie bilden die COX-Inhibitoren, die in einem Zebrafisch-basierten Screen wirkungsvoll den Leukämie-ähnlichen Phänotyp unterdrückten sowie den Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg in den Zusammenhang mit der Bildung der Leukämie stellten<sup>[93]</sup> und auf Grund ihres bekannten Wirkprofils rasch in Phase I-Studien eingebracht werden konnten, um die Hypothese zu überprüfen<sup>[94]</sup>.

Die bahnbrechende Entdeckung von Yamanaka *et al.* im Jahre 2006 murine somatische Zellen mittels eines Cocktails der Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, Klf4 und Myc („Yamanaka-Faktoren“) in den Zustand der Pluripotenz reprogrammieren zu können und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) zu generieren läutete eine neue Ära in der Stammzellbiologie ein und wurde dementsprechend im Jahre 2012 mit dem Nobelpreis gewürdigt<sup>[25]</sup>. Bereits ein Jahr nach dieser Entdeckung berichteten 2007 zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die iPSC-Generierung aus humanen Fibroblasten<sup>[95],[96]</sup> und öffneten so das weite Feld der Anwendungsmöglichkeiten dieser Technologie in der Regenerativen Medizin, der Krankheitsmodellbildung (*disease modelling*) und der Medikamentenforschung (*drug discovery*)<sup>[97]</sup>. Wie oben bereits erwähnt, wurden humane iPSC-Zellen seitdem in

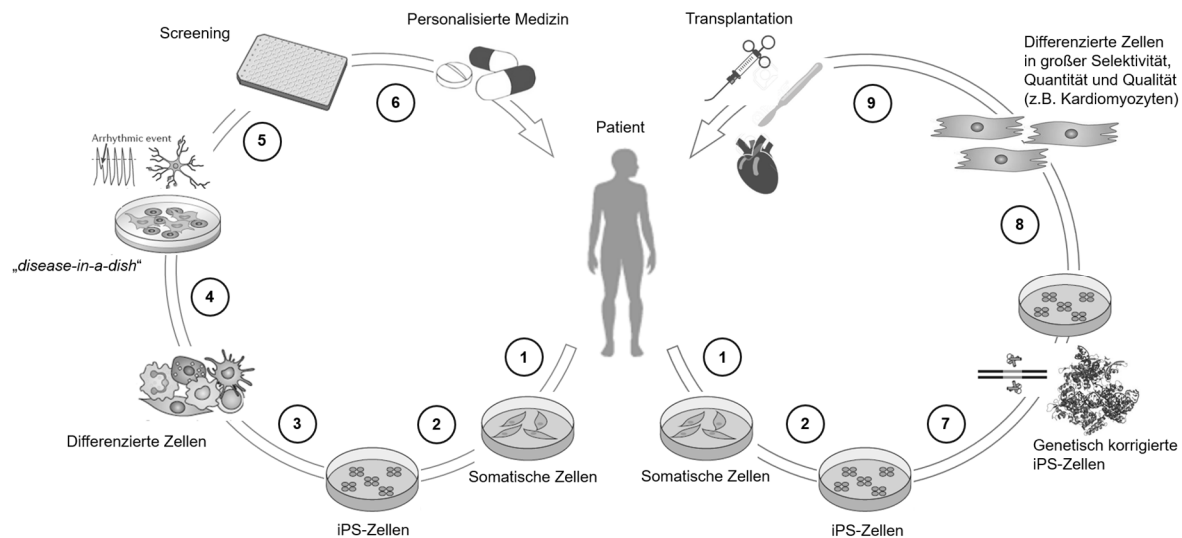
verschiedenen „*disease-in-a-dish*“-Modellen und in Screens zur Untersuchung der Wirksamkeit (*efficacy*) und Unbedenklichkeit/Toxizität (*toxicity*) neuer Arzneistoffe verwendet. Die Vorteile gegenüber den herkömmlichen Modellen bestand zum einen in dem humanen Ursprung und der leichten Zugänglichkeit dieser Zellen sowie deren Potential neue patientenspezifische therapeutische Ansätze zu ermöglichen. In Kombination mit jüngsten Innovationen im *gene editing* wie der CRISPR-Cas9-Technologie<sup>[88]</sup> und der 3D-Zellkonstruktion (*organoids*) ist es nun möglich *in vitro*-Modelle für Wirksamkeits- und Toxizitätsstudien zu schaffen, die in krankheits-, organ- und patientenspezifischen Zellsystemen durchgeführt werden können und so eine höhere *in vivo*-Vorhersage ermöglichen. Grskovic *et al.* berichten in diesem Zusammenhang von der interessanten Möglichkeit „klinischer *in vitro*-Studien“ („*in vitro clinical trials*“), bei denen potentielle Arzneimittel in zellbasierten Assays mit iPSC-Zellen einer breiten Patientenpopulation durchgeführt werden könnten, um so die Vorhersagekraft für nachfolgende klinische *in vivo*-Studien am Menschen zu erhöhen und deren Scheitern und womöglich auch den Einsatz weniger aussagekräftigerer Tiermodelle zu reduzieren<sup>[98]</sup>.

Ein häufiger Grund für das Scheitern potentieller Arzneistoffe in den klinischen Studien sind unerwünschte Nebenwirkungen (*adverse effects*) wie arrhythmogene und kardiotoxische Effekte. Unbedenklichkeitsstudien (*safety testing*) in der frühen Phase der Entwicklung untersuchen in diesem Zusammenhang deshalb die Wirkung auf die hERG/KCNE2-Kanäle, deren Inhibierung mit der tödlichen ventrikulären Arrhythmie namens *Torsade de Pointes* assoziiert ist<sup>[78]</sup>. Bisher werden für diese Untersuchungen Tumorzelllinien verwendet, wobei jedoch jüngste Arbeiten belegen, dass aus humanen iPSC-Zellen abgeleitete Kardiomyozyten eine zuverlässige und kosteneffiziente Alternative bei der Beurteilung des pro-arrhythmischen Risikos innerhalb der präklinischen *in vitro*-Untersuchung darstellen<sup>[99],[100]</sup>. Folglich dient die Verwendung von iPSC-Zellen zur Untersuchung kardiotoxischer Effekte als ein Beispiel für die mögliche frühe Positionierung iPSC-basierter Methoden in den Entwicklungsprozess neuer Medikamente, um in Zukunft diesen effizienter und erfolgreicher zu gestalten.

### 1.3. Stammzellen in der Regenerativen Medizin

Die iPSC-Technologie ist auch für die Regenerative Medizin mit ihrer Möglichkeit Stammzellen für die Unterstützung endogener Regenerationsprozesse sowie für exogene Transplantationsansätze zu verwenden von großem Interesse<sup>[97]</sup> (Abbildung 5) und hat mittlerweile Einzug in verschiedene Studien gefunden<sup>[97],[101]</sup>. Die erste wurde 2014 mit hiPSC-abgeleiteten Retina-Pigment-Endothelzellen (RPE) zu Behandlung der Makuladegeneration durchgeführt und verbesserte erwiesenermaßen die Sehkraft der Probanden<sup>[102],[103]</sup>. Darüber hinaus zeigte jüngst eine Studie mit hESC-abgeleiteten kardialen Vorläuferzellen, dass diese erfolgreich Patienten mit geringer Herzinsuffizienz transplantiert werden konnten, wenn die Zellen in einem Gewebe aus Fibrin eingebettet waren<sup>[104]</sup>.

Für einen routinemäßigen Einsatz stammzellbasierter Therapien in der Klinik müssen zuvor jedoch noch einige Hindernisse überwunden werden<sup>[105]</sup>. Diese betreffen zum einen das Tumorrisiko von ESC und iPSC<sup>[106]</sup> und zum anderen den Umstand, dass es bei der Kultivierung dieser Zellen zu genetischen Veränderungen kommen kann<sup>[107]</sup>. Dementsprechend müssen Reinheit und Qualität dieser Zellen und der aus ihnen erhaltenen Gewebe vor ihrer klinischen Verwendung überprüft werden. Obwohl das PSC-abgeleitete Produkt über kein teratogenes Risiko verfügt, muss gewährleistet sein, dass das Produkt nicht noch undifferenzierte Zellen enthält, die Teratome bilden könnten, wobei hierbei optimierte Differenzierungsprotokolle oder FACS-basierte Methoden von Nutzen sein können.



**Abb. 5:** Verwendung humaner iPS-Zellen für endogene und exogene Therapieansätze. Die Entwicklung regenerativer Arzneimittel für die endogene Therapie beginnt mit der Biopsie (1) und der Reprogrammierung der erhaltenen somatischen Zellen in iPS-Zellen (2). Diese werden anschließend in Zellen des gewünschten Typs differenziert (3) und in einem organ- oder krankheitsspezifischem *in vitro*-Modell (4) auf wirksame Substanzen gescreent (5), die nachfolgend zu Arzneimitteln weiterentwickelt werden können (6). Für einen exogenen (patientenspezifischen) iPSC-basierten Therapieansatz werden die erhaltenen iPS-Zellen mittels gentechnologischer Methoden (z.B. CRISPR-Cas9) korrigiert (7) und in die gewünschten Zelltypen differenziert (8). Nach einer ausführlichen Qualitätskontrolle können die Zellen dem Patienten transplantiert werden (9).

Eine weitere Herausforderung für die Anwendung stammzellbasierter Therapien besteht darüber hinaus in der Vermeidung immunologischer Reaktionen. Weil die Transplantation allogenetischer iPS-Zellen in diesem Zusammenhang mit einer lebenslangen Einnahme von Immunsuppressiva verbunden wäre, scheinen folglich Zellen autologen Ursprungs attraktiver zu sein<sup>[108]</sup>. Jedoch wäre vor allem für weitverbreitete Krankheit wie beispielsweise dem Herzinfarkt eine Anwendung allogenetischer Zellen im Sinne einer kosteneffizienten Therapie erstrebenswert. Eine Vorratshaltung (*banking*) könnte dementsprechend schnell und günstig für mehrere Patienten zeitgleich genutzt werden. Die Entwicklung neuer Strategien wie Protokolle zur Immunsuppression oder das *gene editing* könnten in Zukunft aber universal anwendbare Spenderzellen ermöglichen<sup>[97]</sup>. An genetisch veränderten murinen iPS-Zellen konnte der *proof-of-principle* jüngst erbracht werden, wobei diese zu hämatopoetischen Vorläuferzellen differenziert wurden, um Sichelzellenanämie zu behandeln<sup>[109]</sup>. Zudem zeigte eine Studie mit hiPSC-abgeleiteten Leber-3D-*organoids*,

dass sich aus diesen Leber-ähnliches Gewebe nach Transplantation in Mäusen bildete und belegt die Durchführbarkeit dieses Prinzips<sup>[110]</sup>.

#### 1.4. Murine embryonale Stammzellen

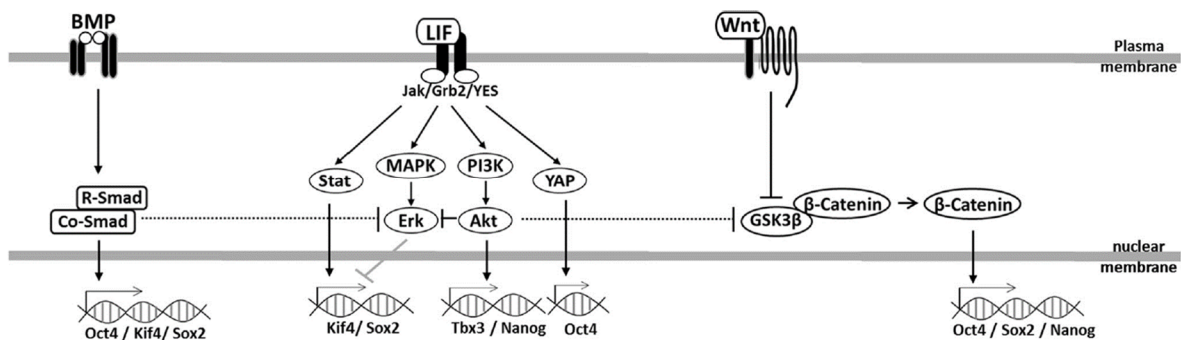
Ein Vierteljahrhundert bevor Yamanaka und Kollegen im Jahre 2006 ihre bahnbrechende Entdeckung zur Reprogrammierbarkeit muriner somatischer Zellen in induzierte pluripotente Stammzellen veröffentlichten<sup>[25]</sup>, wurden 1981 erstmals pluripotente Stammzellen aus Embryonen von Mäusen, sogenannte murine embryonale Stammzellen (mESC), gewonnen<sup>[111],[112]</sup>. Embryonale Stammzellen werden dabei aus der inneren Zellmasse der Blastozyste erhalten und sind durch ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern (*self-renewal*) und in alle somatischen Zellen und Keimzellen differenzieren zu können (*pluripotency*, „stemness“) gekennzeichnet<sup>[113]</sup>. Anhand dieser Zellen war es möglich ein *in vitro*-Modellsystem zur Darstellung embryologischer Prozesse zu entwickeln und die Regulation von Signalwegen sowie der Genexpression während der Entwicklung zu untersuchen. Die Erkenntnisse, die in diesem Zusammenhang für die Erhaltung der Pluripotenz erhalten wurden, stellten dabei u.a. die Grundlage für die spätere Identifizierung der „Yamanaka-Faktoren“ dar.

Die Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen liegt in einem komplexen Gleichgewicht regulatorischer Mechanismen zur Expression verschiedener Pluripotenzgene begründet, wobei selbst kleinste Veränderungen eine spontane Differenzierung der Zellen zur Folge haben können<sup>[114]</sup>. Die Transkriptionsfaktoren, die bei der Aufrechterhaltung des pluripotenten Status von entscheidender Bedeutung sind, sind Oct4, Sox2 und Nanog und bilden einen zentralen Regelkreis, der durch eine auto-regulatorische Feedback-Schleife reguliert wird<sup>[115],[116]</sup>. Oct4, auch Pou5f1, wirkt synergistisch mit Sox2, um die Genexpression zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz positiv zu regulieren<sup>[117]–[119]</sup> und unterdrückt die Differenzierung durch Wechselwirkung mit dem Transkriptionsfaktor FoxD3<sup>[120]</sup>. Sox2 wirkt zeitgleich nicht nur synergistisch mit Oct4, sondern hält auch bestimmte Expressionslevel zugunsten einer Vermeidung einer spontanen Differenzierung aufrecht. Die Expression von Nanog ist durch Bindung des Oct4-Sox2-Komplexes unter Beteiligung anderer Transkriptionsfaktoren wie FoxD3 an seinen proximalen Promoter reguliert<sup>[121]</sup>, kann aber unabhängig davon auch selbstregulatorisch erfolgen<sup>[122]</sup>. Die Inhibition von Trp53, einem negativen Regulator der Pluripotenz, wird dabei als möglicher pluripotenzerhaltender Mechanismus diskutiert<sup>[123]</sup>. Darüber hinaus ist auch Klf4 für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Bedeutung, indem es mit dem Oct4/Sox2/Nanog-Regulationskomplex wechselwirkt<sup>[124]</sup>, und stellt neben Oct4, Sox2 und cMyc einen der vier „Yamanaka-Faktoren“ dar.

Die Transkriptionsfaktoren werden dabei von verschiedenen Signalwegen reguliert, die ebenfalls untereinander wechselwirken, um die Pluripotenz aufrechtzuerhalten (Abbildung 6). Zu diesen zählen der BMP-, der Wnt- und der LIF-Signalweg. Letzterer wird durch Bindung des Liganden *leukemia inhibitory factor* (LIF) an den LIFR $\beta$ /gp130-

Rezeptorkomplex aktiviert und fördert die Pluripotenz durch Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege wie dem Jak/Stat3-, dem PI3K/Akt- und dem YES/YAP-Signalweg. Während hierbei pStat3 den Pluripotenz-Regelkreis aus Oct4, Sox2 und Nanog durch die Aktivierung von Klf4 reguliert<sup>[125]</sup>, inhibiert PI3K-Akt den differenzierungsfördernden MAPK-Erk-Signalweg<sup>[126],[127]</sup>. Darüber hinaus erhöht Akt nicht nur die Nanog-Expression<sup>[125]</sup>, sondern inhibiert auch GSK3 $\beta$  und führt damit zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges, wodurch die Differenzierung der Zellen verhindert wird<sup>[128]–[130]</sup>. Zudem wird die Oct4-Expression über den YES-YAP-Signalweg induziert<sup>[131]</sup>.

Die Tatsache, dass LIF unter serumfreien Kultivierungsbedingungen die Selbsterneuerung und Pluripotenz muriner embryonaler Stammzellen alleine nicht erhalten kann, belegt die Komplexität der Regulation des pluripotenten Status dieser Zellen und die Abhängigkeit von einzelnen Faktoren. Zu diesen zählen auch die *bone morphogenetic proteins* (BMP), die als Serumbestandteile über den Smad-Signalweg die Expression der *Id*-Gene induzieren und damit die Differenzierung inhibieren<sup>[132]</sup>. Qi *et al.* konnten in diesem Zusammenhang belegen, dass BMP4 in Anwesenheit von LIF die mESC-Pluripotenz unter serumfreien Kultivierungsbedingungen erhalten kann<sup>[133]</sup>. Zudem inhibiert der Smad-Komplex den MAPK-Erk-Signalweg, wodurch der undifferenzierte Status der Zellen aufrechterhalten wird<sup>[134]</sup>. Weitere Serumbestandteile wie Wnt-Proteine inhibieren wie oben bereits erwähnt zudem die GSK3 $\beta$ -Aktivität durch  $\beta$ -Catenin-Akkumulation und Expression der Pluripotenzgene<sup>[135],[136]</sup>. Diese Wechselwirkung mit anderen Signalwegen führte mittlerweile zu der Entwicklung chemisch-definierter Kultivierungsbedingungen (2i-, LIF/2i-Bedingungen), bei denen durch die niedermolekularen Inhibitoren PD0325901 (MAPK-Erk-Inhibitor) und CHIR99021 (GSK3 $\beta$ -Inhibitor) die Pluripotenz der murinen embryonalen Stammzellen gewährleistet werden soll<sup>[137]</sup>.



**Abb. 6:** Regulation der für die Pluripotenz muriner embryonaler Stammzellen bedeutsamen Signalwege (Chen *et al.* 2017)<sup>[114]</sup>. LIF aktiviert *downstream* die Pluripotenz-erhaltenden Jak/Stat-, PI3K/Akt- und Yes/YAP-Signalwege sowie den differenzierungsfördernden MAPK/Erk-Signalweg. Die Differenzierung kann über den BMP/Smad-Signalweg sowohl durch Inhibition von Erk als auch durch Translokation des Smad-Komplexes in den Nucleus und der nachfolgenden Induktion von *Id*-Faktoren verhindert werden. Akt inhibiert ebenfalls Erk und aktiviert zudem über die Inhibition von GSK3 $\beta$  den Wnt-Signalweg, was zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und der Expression von Pluripotenz-Genen führt.

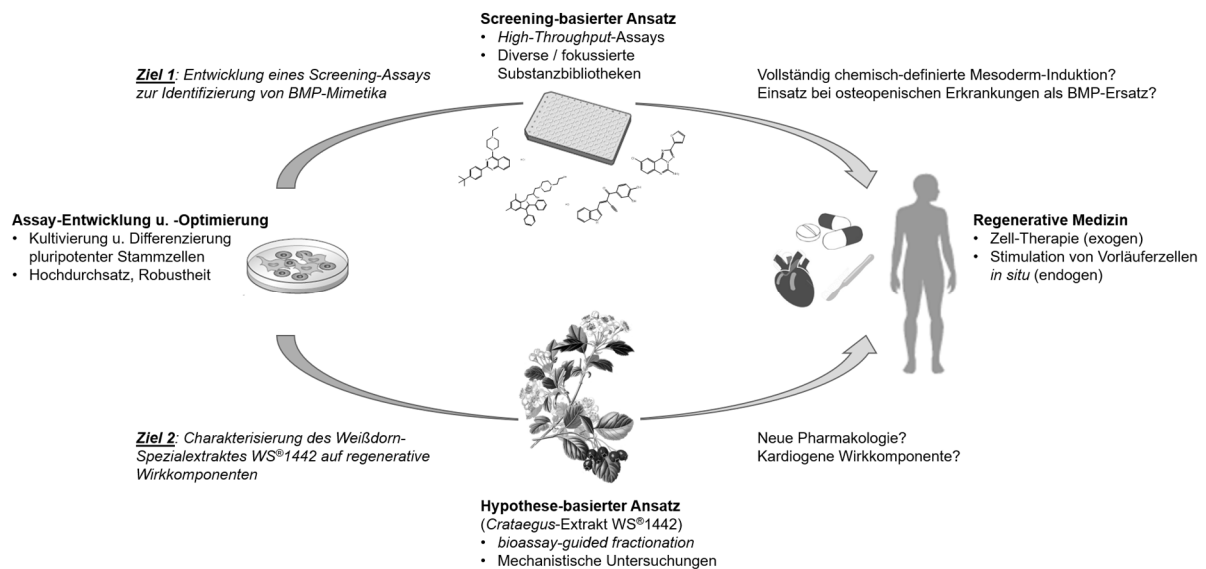
## 2. Zielsetzung und Motivation

Revolutionäre Entdeckungen der vergangenen Jahre auf dem Gebiet der Stammzellbiologie deuten einen Paradigmenwechsel bei der Therapie degenerativer und ischämischer Erkrankungen an<sup>[138]–[141]</sup>. Arzneistoff-ähnliche niedermolekulare Substanzen können in diesem Zusammenhang nicht nur in einem therapeutischen Kontext zur Wiederherstellung funktionellen Gewebes *in vivo* Anwendung finden, sondern darüber hinaus auch in biotechnologischen Prozessen für *in vitro*-Toxizitäts- und Krankheits-Modelle mit hoher Aussagekraft<sup>[17],[142]</sup>. Gezielte Screening-Verfahren mit ausgewählten Substanzbibliotheken bieten dabei die Möglichkeit neuartige Wirkstoffe zu identifizieren und bilden die Grundlage für die Bearbeitung der in dieser Arbeit gestellten Fragen.

So sollte im Rahmen dieser Arbeit ein robuster und hochdurchsatzfähiger phänotypischer Screening-Assay mit pluripotenten Stammzellen entwickelt werden, mit dem niedermolekulare Aktivatoren des *bone morphogenetic protein* (BMP)-Signalweges identifiziert werden können. Da es sich beim BMP-Signalweg um einen bedeutenden Regulator entwicklungsbiologischer Vorgänge handelt, sind verschiedene BMPs für den Einsatz bei stammzellbasierten Technologien von Bedeutung und können beispielsweise gezielt zur Beeinflussung des Schicksals von Stamm- und Vorläuferzellen eingesetzt werden. BMPs finden dabei zum einen bei der „gerichteten Differenzierung“ embryonaler und/oder induzierter pluripotenter Stammzellen in mesodermale Zell- und Gewebetypen Anwendung, wobei insbesondere der Einsatz von BMP4 für die gezielte Mesoderm-Induktion und Generierung kardialer Vorläufer- und Herzmuskelzellen aus humanen Stammzellen beschrieben ist<sup>[43],[143],[144]</sup>. Zum anderen werden BMPs (v.a. BMP4) aber auch für die sogenannte „Transdifferenzierung“ von Fibroblasten zu Herzmuskelzellen eingesetzt<sup>[3],[138],[139]</sup>. Für die beschriebenen Technologien konnte bereits eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren durch niedermolekulare Substanzen erfolgreich ersetzt werden, wohingegen für BMPs noch keine niedermolekulare Alternative berichtet wurde, sodass hier ein großer Bedarf besteht. Dieses gilt darüber hinaus auch für die Therapie osteopenischer Erkrankungen wie Osteoporose, Knochenfrakturen oder Osteoarthritis, da die klassische, konservative Pharmakotherapie mit Östrogenen, Calcitonin oder Bisphosphonaten zwar die Knochenmineraldichte erhöht, aber keine echte Regeneration erzeugt. Die von der FDA bei Röhrenknochenfrakturen zugelassenen humanen rekombinanten BMPs (Dibotermine- $\alpha$  (rhBMP2), Eptotermine- $\alpha$  (rhBMP7)) müssen zudem *in vivo* in so hohen Konzentrationen eingesetzt werden, dass diese Therapie sehr teuer ist und durch verschiedene unerwünschte Nebenwirkungen durch die erforderlichen hohen Dosierungen gekennzeichnet ist. Dementsprechend wurde angestrebt mit Hilfe eines Screening-basierten Ansatzes BMP-mimetisch wirksame Substanzen zu identifizieren, die zukünftig für stammzelltechnologische sowie pharmakotherapeutische Zwecke eingesetzt werden können. Dabei sollte die Anwendung eines Assays mit murinen ES-Zellen bezüglich Durchsatz und *in vivo*-Relevanz einen Kompromiss darstellen zwischen einer Durchführung im Tier-Modell und der Verwendung eines artifiziellen, immortalisierten Zellsystems.

Kardiale Vorläuferzellen stellen eine vielversprechende Zellpopulation für die kardiale regenerative Therapie dar mit dem Ziel die Funktion des Herzens nach dessen Schädigung durch Erneuerung verloren gegangener Kardiomyozyten wiederherzustellen<sup>[145]</sup>. In diesem Zusammenhang ergeben sich sowohl exogene Therapieansätze wie die Zell-Therapie als auch endogene über die Aktivierung dieser Zellen *in situ*<sup>[146]</sup>. Die Identifizierung regenerativer Therapeutika kann dabei, wie im vorangegangenen Beispiel der BMP-Mimetika beschrieben, über einen Screening-basierten Ansatz erfolgen. Zudem ist aber auch ein Hypothese-getriebener Ansatz möglich, bei dem die Pharmakologie eines etablierten Arznei- oder Naturstoffs auf eine mögliche regenerative Wirkkomponente hin untersucht wird.

Weißdorn, lat. *Crataegus*, stellt eine traditionell angewendete Arzneipflanze dar, dessen Extrakt WS<sup>®</sup>1442 phytochemisch, pharmakologisch und klinisch intensiv untersucht wurde<sup>[147]</sup>. Weil der Einsatz von Weißdorn als Phytotherapeutikum zur symptomatischen Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen evidenzbasiert ist und darüber hinaus kardioprotektive Effekte in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Infarkt-Modellen beschrieben sind<sup>[148]</sup>, sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob für Weißdorn möglicherweise auch eine regenerative Wirkkomponente beschrieben werden kann. Im Zuge dessen sollte die Wirkung des Weißdorn-Spezialextraktes WS<sup>®</sup>1442 auf kardiale Vorläuferzellen untersucht werden, wobei der in dieser Arbeit verwendete Kardiogenese-Assay mit murinen ES-Zellen die Möglichkeit bot den Mechanismus einer kardiogenen Wirkung auf diese Zellpopulation systematisch *in vitro* zu untersuchen.



**Abb. 7:** Identifizierung neuer Therapeutika für die Regenerative Medizin mittels Screening- (Ziel 1) und Hypothese-basierter (Ziel 2) Ansätze.



### 3. Etablierung eines universellen kardialen HT-Assays mit murinen ES-Zellen

#### 3.1. Einleitung

Der hier verwendete Assay mit murinen embryonalen Stammzellen (mESC) zur Untersuchung von Modulatoren der Kardiogenese basiert auf den Arbeiten von Takahashi *et al.* aus dem Jahre 2003<sup>[32]</sup>. Die Autoren transfizierten hierbei zunächst die Zellen mit dem Promoter-Reporter-Konstrukt  $\alpha$ MHC-eGFP, wodurch die substanzinduzierte Kardiogenese anhand der Expression des Reporters phänotypisch erfasst werden konnte, und führten anschließend mit diesen einen Screen mit 880 niedermolekularen Substanzen (*FDA2000 drug library*) im 96-Well-Format durch, in dem Ascorbinsäure als kardiogene Substanz identifiziert werden konnte. Mit dem technischen Fortschritt einhergehend konnte in den darauffolgenden Jahren in der Arbeitsgruppe von Mark Mercola (Sanford-Burnham Medical Research Institut, La Jolla, USA) darüber hinaus im Rahmen der Dissertation von Paul J. Bushway dieser Assay von einem subjektiven phänotypischen Assay zu einem quantitativen *High-Throughput-Assay* weiterentwickelt werden<sup>[149]</sup>. Hierbei konnte das Format von 96- auf 384-Well zu Gunsten eines höheren Durchsatzes und einer besseren Kosteneffizienz erhöht sowie die Quantifizierung der kardiogenen Aktivität durch die Entwicklung eines *High-Throughput-Imaging-Algorithmus* optimiert werden. Anschließende Screens, die mit diesem optimierten Assay innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, führten schließlich zu der Identifizierung von Dihydropyridinen<sup>[72]</sup> und Glucocorticoiden<sup>[150]</sup>, die eine kardiogene Aktivität aufwiesen. Der von Paul J. Bushway optimierte Assay stellt die Grundlage für die vorliegende Arbeit dar und wurde in der Folge für die eigene Anwendung optimiert. Die Evolution des mESC-basierten Kardiogenese-Assays mit den jeweils verwendeten Assay-Parametern wurde in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tab. 1:** Evolution des mESC-basierten Kardiogenese-Assays.

	Takahashi <i>et al.</i> (2003) <sup>[32]</sup>	Bushway <i>et al.</i> (2012/2015) <sup>[72], [149], [150]</sup>	Halver <i>et al.</i> (2017)
Zelllinie	CGR8 $\alpha$ MHC-eGFP	CGR8 $\alpha$ MHC-eGFP	CGR8 $\alpha$ MHC-eGFP
Assay-Format	96-Well	384-Well	384-Well
Assay-Design	<i>Monolayer</i>	<i>Monolayer</i>	<i>Monolayer</i>
Assay-Dauer	12 Tage	9 bis 10 Tage	11 Tage
Zelldichte Tag 0	200 Zellen/mm <sup>2</sup>	~229 Zellen/mm <sup>2</sup>	50 Zellen/mm <sup>2</sup>
Identifizierte Substanz	Ascorbinsäure	DHP, Glucocorticoide	WS <sup>®</sup> 1442
FBS-Qualität	ES-Zell-qualifiziert	ES-Zell-qualifiziert	Premium Qualität
FBS-Konzentration	10 %	5 %	10 %
Phänotyp. Readout	manuell	automatisch	automatisch

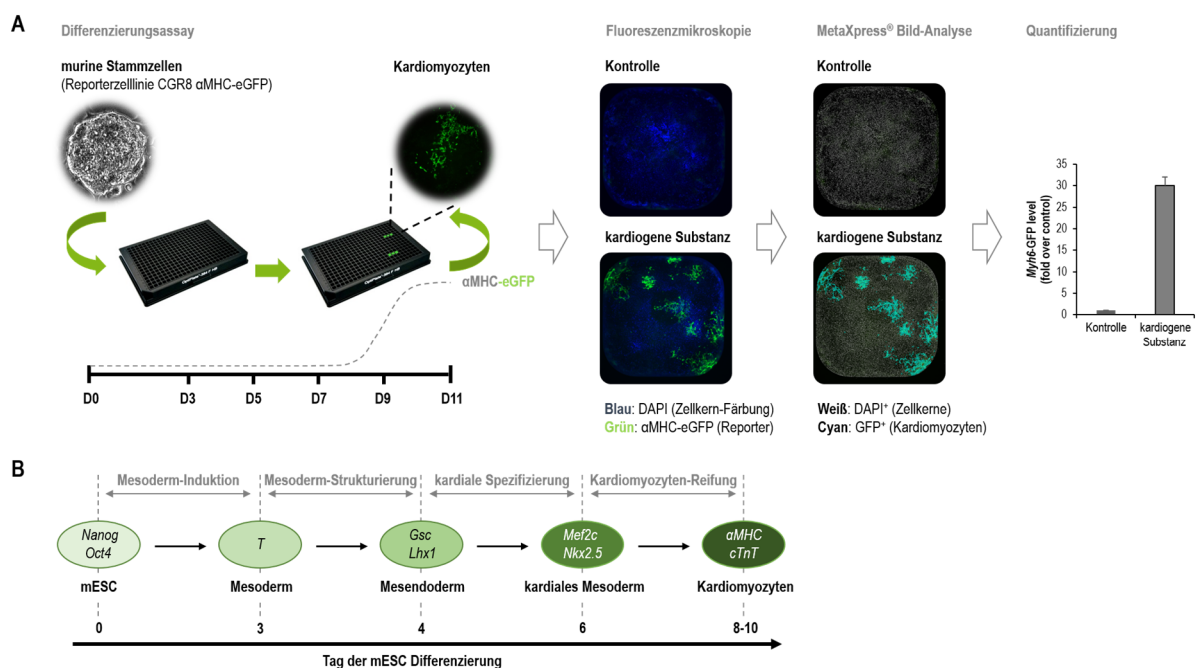
### 3.2. Assay-Transfer und Bild-basierte Quantifizierung der Kardiomyogenese

Für die Anwendung des *HT*-Assays zur Identifizierung neuartiger Substanzen, Mechanismen und Signalwege, die die Kardiogenese der murinen ES-Zellen fördern, war vor allem die Entwicklung einer robusten Bild-Analyse von großer Bedeutung. Wie in vorangegangenen Arbeiten<sup>[32],[149]</sup> bereits festgestellt werden konnte, stellte hierbei das Wachstumsverhalten der Zellen eine große Herausforderung für die Quantifizierung der Kardiogenese dar, wobei eine Autofluoreszenz auf Grund des dreidimensionalen Zellwachstums ebenso verifiziert werden konnte wie Verdunstungs- und Randeffekte, die mit einer erhöhten Kardiogenese einhergingen. In der Folge wurde deshalb mit Hilfe der MetaXpress<sup>®</sup> Software und dem *Multiwavelength Cell Scoring*-Algorithmus eine Bild-Analyse etabliert, die Parameter wie Fluoreszenzsignalstärke und Größe der fluoreszierenden Fläche definierte, um falsch-positive Signale durch Streueffekte und Hintergrundfluoreszenz auszuschließen und damit die substanzinduzierte Kardiogenese bestmöglich zu erfassen.

Darüber hinaus wurden sowohl von Paul J. Bushway als auch in der vorliegenden Arbeit Anstrengungen unternommen nicht nur die Robustheit, sondern auch die Variabilität des Assays zu optimieren, wobei insbesondere die anfänglich eingesetzte Zellkonzentration sowie das verwendete FBS in Qualität und Konzentration definiert werden sollten. Da u.a. angestrebt wurde in diesem Assay neuartige kardiogene Substanzen zu identifizieren, sollte die spontane Kardiogenese der Zellen so gering wie möglich sein, damit bereits schwache kardiogene Aktivitäten erfasst werden konnten. Die Zellkonzentration galt in diesem Zusammenhang als besonders kritisch, da in eigenen Experimenten festgestellt werden konnte, dass eine zu geringe Zellzahl ( $\leq 250$  Zellen/Well, entspricht 25 Zellen/mm<sup>2</sup>) zu Beginn der Differenzierung sich negativ auf das Wachstumsverhalten der Zellen auswirkte, was womöglich daran liegen könnte, dass durch verringerte Zell-Zell-Kontakte die Zellen in ihrer Proliferations- und Differenzierungskapazität eingeschränkt werden. Hingegen hatte eine hohe Zellkonzentration ( $\geq 1500$  Zellen/Well) zur Folge, dass die Kardiogenese der Zellen stimuliert wurde und damit der dynamische Bereich des Assays abnahm. Auch wenn hierbei nicht die Kompaktheit dreidimensionaler Zell-Konglomerate, sogenannter *embryoid bodies* (EBs) erhalten wurde, wie sie in manchen Differenzierungsprotokollen unter Suspensionskultur- oder *hanging drop*-Bedingungen<sup>[151]-[153]</sup> bewusst eingesetzt wird, um die Mesoderm-Bildung zu fördern, könnte jedoch die gesteigerte Kardiogenese in der erhöhten Zelldichte und der damit verbundenen Akkumulation sezernierter Wachstumsfaktoren vergleichbar der EB-Formation begründet liegen wie es bereits von Takahashi *et al.* postuliert wurde<sup>[32]</sup>.

Die Auswahl des passenden FBS stellte darüber hinaus einen weiteren wichtigen Optimierungsschritt dar, wobei aus Gründen der Kosteneffizienz auf teure ES-Zell-qualifizierte Produkte verzichtet und stattdessen ein allgemein gebräuchliches FBS-Produkt verwendet werden sollte. Da FBS jedoch ein Naturprodukt darstellt, das starken Schwankungen in der Zusammensetzung an Zytokinen und Wachstumsfaktoren unterliegt, die das Differenzierungsverhalten der Zellen stark

beeinflussen, wurden zunächst mehrere Produkte und Chargen verschiedener Hersteller getestet, um ein geeignetes Produkt zu erhalten, das zum einen die Viabilität der Zellen gewährleistete und zum anderen die Kardiogenese nicht über ein Maß hinaus förderte, dass der dynamische Bereich des Assays negativ beeinträchtigt wurde. In diesem Zusammenhang war zudem die Konzentration des verwendeten Serums von Bedeutung. Während hierbei in den Arbeiten von Paul J. Bushway die FBS-Konzentration auf 5 % herabgesetzt wurde, war in eigenen Experimenten festzustellen, dass über eine elftägige Differenzierungsdauer die Viabilität der Zellen mit 10 % FBS am besten gewährleistet werden konnte. Ein serumfreies Protokoll konnte in der vorliegenden Arbeit nicht ausgearbeitet werden, da eine FBS-Entwöhnung bei der hier verwendeten Zelllinie nicht möglich war und FBS-Konzentrationen unterhalb einer kritischen Grenze die Viabilität der Zellen stark einschränkten.

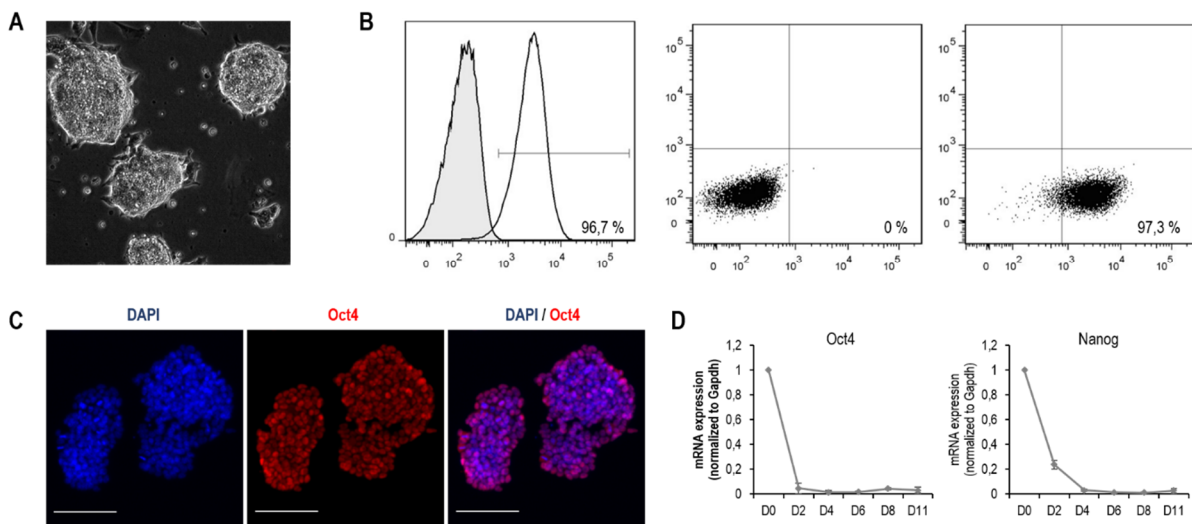


**Abb. 8:** Zusammenfassende Übersicht zur Etablierung eines *HT*-Assays zur Untersuchung von Modulatoren der Kardiogenese von murinen ES-Zellen. Die murinen ES-Zellen werden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit Substanzen, deren kardiogene Wirkung untersucht werden soll, behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen (**A**). Die kardiale Differenzierung der murinen ES-Zellen ist dabei in einzelne Phasen unterteilt, wobei die verschiedenen Zellpopulationen jeweils durch die Expression bestimmter Markergene gekennzeichnet sind. Willems *et al.* postulierten für den von Paul J. Bushway entwickelten mESC-Assay den oben gezeigten zeitlichen Verlauf der kardialen Differenzierung der murinen ES-Zellen (modifiziert von Willems *et al.* 2009<sup>[154]</sup>) (**B**).

So wurden an Tag 0 des Assays 500 Zellen pro Well auf einer 384-Well-Kultivierungsplatte in serumhaltigem Medium ausgesät und über elf Tage kultiviert. Nachdem an Tag 3 pro Well 25 µL Kultivierungsmedium hinzugegeben wurden, betrug ab dem Zeitpunkt das Assay-Volumen 75 µL pro Well. Anschließend wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt bis an Tag 11 die Zellen Formaldehyd-fixiert wurden und nach Zellkernfärbung mit DAPI fluoreszenzmikroskopisch vermessen werden konnten (Abbildung 8, A).

### 3.3. Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen

Bei der Kultivierung der murinen ES-Zellen war besonders auf den Erhalt des pluripotenten Status der Zellen zu achten, damit zu Beginn eines jeden Kardiogenese-Assays keine Zellen vorlagen, die bereits in eines der drei Keimblätter (Mesoderm, Endoderm, Ektoderm) differenziert waren. Der pluripotente Status der Zellen konnte dabei durch eine ausreichend hohe Konzentration des eingesetzten LIFs sowie durch eine kontrollierte Zelldichte und maximale Konfluenz von 70 bis 80 % gewährleistet werden. Insbesondere bei dem Wechsel des verwendeten LIFs von dem anfänglich kommerziell erworbenen Produkt von Merck Millipore auf das von der Dortmund Protein Facility (DPF) bezogene Protein wurde ein Aktivitätsunterschied festgestellt, sodass die LIF-Konzentration im Kultivierungsmedium zum Erhalt der Pluripotenz der Zellen von 10 ng/mL auf 15 ng/mL erhöht wurde. Zur Überprüfung der Pluripotenz wurde dabei primär die visuelle Kontrolle des Phänotyps unter dem Mikroskop verwendet (Abbildung 9, A). Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zellen nur kleine Kolonien bildeten, die einen durchscheinenden und leicht dornenartigen Phänotyp aufwiesen, sowie nicht zu dicht aneinandergewachsen waren.



**Abb. 9:** Kultivierung von mESCs und Kontrolle ihrer Pluripotenz. Die murinen ES-Zellen werden zwei bis drei Tage in einem 6-Well-Plattenformat in LIF-haltigem Medium kultiviert und ihre Konfluenz und ihr Phänotyp mikroskopisch kontrolliert (A). Die pluripotenten Zellen wurden mit dem Antikörper *anti-Oct4* angefärbt und mittels Durchflusszytometrie (B) und *Imaging* untersucht und quantifiziert (Maßstabsbalken = 100 µm) (C). Der pluripotente Status der Zellen während der Differenzierung wurde auch auf mRNA-Ebene untersucht und die Expression der Pluripotenz-Markergene *Oct4* und *Nanog* auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert (D). Für das Expressionsprofil während des Assays wurden in Zweitagesabständen Zellproben genommen und auf Anwesenheit der Marker für pluripotente Zellen (*Oct4*<sup>+</sup>, *Nanog*<sup>+</sup>) untersucht (D).

Zusätzlich zu der routinemäßigen visuellen Kontrolle der Zellen unter dem Mikroskop wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mittels Antikörperfärbung unter Verwendung des Oct4-Antikörpers auf ihre Pluripotenz hin überprüft, wobei die Zellen entweder fluoreszenzmikroskopisch untersucht und der Anteil der Oct4<sup>+</sup>-Zellen an der durch DAPI-Färbung angezeigten Gesamtzellzahl mit Hilfe des *Imagings* (Abbildung 9, C) oder dieser Wert durch eine durchflusszytometrische Bestimmung ermittelt wurde (Abbildung 9, B). Darüber hinaus konnte der Wechsel von einem pluripotenten zu

einem differenzierten Zelltyp im Verlauf des elftägigen Assays auf mRNA-Ebene mittels qPCR untersucht werden (Abbildung 9, D).

### 3.4. Charakterisierung bekannter kardiogener Substanzen

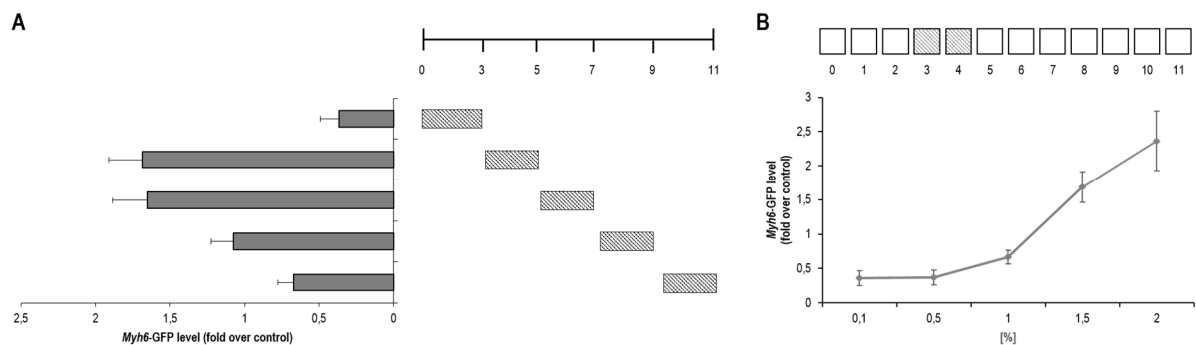
#### 3.4.1. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von DMSO

Die zu testenden Substanzen wurden in dem Assay zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Zellen gegeben. Dabei wurden die Substanzen zunächst in DMSO auf die gewünschte Konzentration eingestellt und mit dem Kultivierungsmedium auf eine finale DMSO-Konzentration von 0,5 % verdünnt. Die DMSO-Konzentration stellte dabei vergleichbar der Zellkonzentration einen Parameter dar, der Einfluss auf die Kardiogenese der Zellen nahm.

DMSO fördert die kardiale Differenzierung sowohl von ES-Zellen<sup>[155]</sup> als auch von murinen P19 embryonalen Krebszellen unter Expression der spezifischen kardialen Transkriptionsfaktoren Gata4 und Nkx2.5<sup>[156]</sup>. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist dabei unbekannt, jedoch postulieren Skerjanc *et al.*, dass durch intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung eine Signalkaskade aktiviert werden könnte, die die Expression dieser Gene reguliert<sup>[157]</sup>. Vor allem in frühen Protokollen, in denen die heutigen selektiven Modulatoren noch nicht zur Verfügung standen und eine gerichtete und chemisch-definierte Differenzierung nur beschränkt möglich war, wurde DMSO deshalb als fester Bestandteil des Differenzierungsmediums in Konzentrationen von bis zu 1 % eingesetzt<sup>[158],[159]</sup>. In dem vorliegenden Differenzierungsassay wurde darauf verzichtet und DMSO lediglich als Solvens für die getestete Substanz in einer finalen Konzentration von 0,5 % eingesetzt.

Um den Einfluss der DMSO-induzierten Kardiogenese bei der Testung verschiedener Substanzen in den jeweiligen Zeitfenstern des Assays jedoch besser bewerten zu können, wurde DMSO zunächst zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung auf die Zellen gegeben, wobei festgestellt werden konnte, dass die kardiogene Aktivität von DMSO in den einzelnen Zeitfenstern unterschiedlich stark ausgeprägt war. Diese Aktivität war zwischen Tag 3 und Tag 7 am höchsten, was zur Folge hatte, dass der dynamische Bereich zur Untersuchung von Substanzen in diesem zeitlichen Abschnitt des Assays negativ beeinflusst wurde (Abbildung 10, A). Anschließend wurde die DMSO-induzierte Kardiogenese über einen größeren Konzentrationsbereich untersucht, wobei die kardiogene Aktivität insbesondere zwischen Tag 3 und Tag 5 eine gute Dosisabhängigkeit aufwies (Abbildung 10, B). Da die kardiogene Aktivität hierbei bei einer DMSO-Konzentration von 0,5 % gering ausfiel, wurde diese nachfolgend als diejenige Konzentration verwendet, in der die getesteten Substanzen final auf die Zellen gegeben wurden. Auch wenn dadurch der Einfluss der kardiogenen Aktivität minimiert werden sollte, blieb die DMSO-induzierte Kardiogenese immer Bestandteil der gemessenen Gesamt-Kardiogenese einer Substanz, sofern DMSO als

Solvens eingesetzt wurde, sodass die kardiogene Aktivität nachfolgend diskutierter Substanzen als Vielfaches der Kontrolle (*fold-over-control*) entsprechend dem jeweiligen aktiven Zeitfenster mehr oder weniger beeinflusst war.



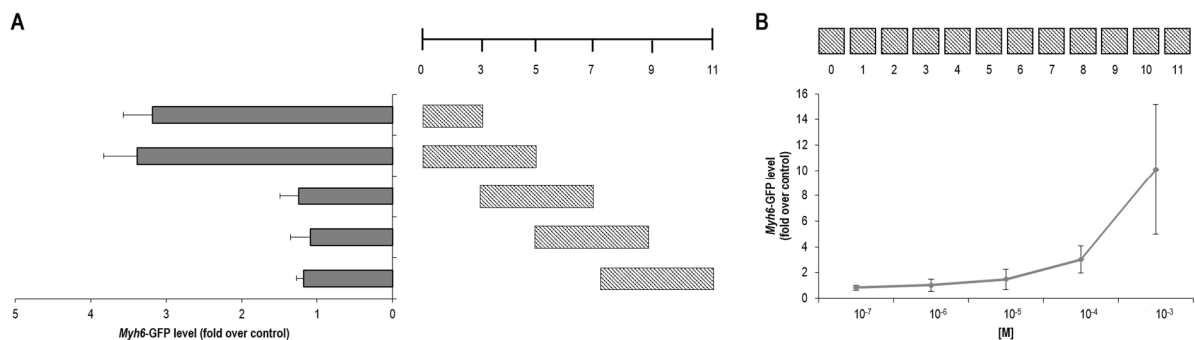
**Abb. 10:** Bestimmung des kardiogenen Profils von Dimethylsulfoxid (DMSO) in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen mit jeweils 1,5 % DMSO behandelt (**A**). Darüber hinaus erfolgte eine Behandlung der Zellen von Tag 3 bis Tag 5 in den oben angegebenen DMSO-Konzentrationen (**B**). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

### 3.4.2. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Wasserstoffperoxid

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind für die Signalweiterleitung von Zellen von großer Bedeutung. Sauer *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang, dass die von NADPH Oxidase-ähnlichen Enzymen generierten ROS auch die kardiale Entwicklung ES-Zell-abgeleiteter *embryoid bodies* (EBs) regulieren<sup>[160]</sup>. Hierbei konnte durch Zugabe von Oxidationsmitteln wie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Menadion die Kardiogenese gesteigert werden, wohingegen Radikalfänger wie *N*-Acetylcystein (NAC) diese inhibierten. Da die kardiale Differenzierung zumindest in EBs von dem intrazellulären Redoxstatus abhängt und durch Radikalbildner gefördert werden kann, sollte dieser Einfluss auch in einem *Monolayer*-Assay untersucht werden. Dazu wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in verschiedenen Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Kultivierungsmedium auf die Zellen gegeben. Dabei waren vor allem in der frühen Phase der Differenzierung bei hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen ( $>150 \mu\text{M}$ ) toxische Effekte zu beobachten, die jedoch nicht mehr in Erscheinung traten, sobald die Zellen konfluent gewachsen waren. Eine kardiogene Aktivität zeigte sich aber weder in frühen noch in späten Phasen der Differenzierung (Daten nicht gezeigt). Da auch in dem von Sauer *et al.* EB-basierten Differenzierungsprotokoll die Kardiogenese nur in einem moderaten Maße (2,7-fach) gesteigert werden konnte, scheint die Beeinflussung des Redoxstatus für die kardiale Differenzierung lediglich von untergeordneter Bedeutung zu sein. Viel entscheidender ist jedoch, dass dieser Einfluss vor allem bei der EB-Ausbildung zum Tragen kommt. Folglich lässt sich dieser Effekt in einem *Monolayer* schlechter nachweisen, könnte jedoch womöglich bei einer zeitgleichen chemisch-stimulierten Mesoderm-Induktion in Erscheinung treten.

### 3.4.3. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Ascorbinsäure

Während Wasserstoffperoxid oder andere Radikalbildner wie Menadion die Kardiogenese fördern<sup>[160]</sup>, wurde gezeigt, dass Antioxidantien die Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten inhibieren. Eine Ausnahme hierbei bildet Ascorbinsäure (**1**), welche in verschiedenen Studien die kardiale Differenzierung von ES-Zellen förderte<sup>[32],[161],[162]</sup> und mittlerweile elementarer Bestandteil verschiedener Differenzierungsprotokolle sowohl für humane ES- als auch iPS-Zellen ist, wobei die eingesetzten Konzentrationen von ca. 0,2 bis 1 mM variieren<sup>[68],[70],[163]</sup>. Takahashi *et al.* identifizierten **1** 2003 erstmalig in einem 880 Substanzen umfassenden Screen mit der hier verwendeten murinen  $\alpha$ MHC-eGFP ES-Zelllinie als kardiogene Substanz, die bei Zugabe über den gesamten Zeitraum der 12-tägigen Differenzierung die Kardiogenese um das Fünffache steigern konnte<sup>[32]</sup>. Jedoch schien hierfür nicht die antioxidative Eigenschaft von **1** ursächlich zu sein, da andere Antioxidantien, wie N-Acetylcystein (NAC), Tiron und Vitamin E den für **1** festgestellten Effekt nicht nachahmen konnten. Vielmehr stellten Sato *et al.* den Erklärungsansatz für den von **1** festgestellten Effekt in den Kontext der Kollagenbiosynthese<sup>[161]</sup>, da **1** diese erwiesenermaßen beeinflusst<sup>[164]</sup> und der Einfluss der extrazellulären Matrix (ECM) auf die kardiale Differenzierung von ES-Zellen als bewiesen gilt<sup>[165]</sup>. Die Autoren entdeckten, dass die stabilere Form von **1**, das L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (A2-P), die Kardiogenese noch weiter steigern konnte, jedoch nur, wenn dieses in der frühen Phase der Differenzierung zugegeben wurde. Dieses steht im Einklang mit den Ergebnissen von Tsuneto *et al.*, die zeigten, dass **1** die Osteoklastogenese in ES-Zellen fördert, wenn **1** während der ersten vier Tage der Differenzierung zugegeben wurde<sup>[166]</sup>. Da sowohl Kardiomyozyten als auch Osteoklasten aus mesodermalen Zellen gebildet werden, kann daraus geschlossen werden, dass **1** die Mesoderm-Induktion stimuliert. Der zugrunde liegende Wirkmechanismus konnte hierbei von Cao *et al.* aufgeklärt werden. So fördert die durch **1** induzierte Kollagensynthese die Differenzierung von iPS-Zellen zu Kardiomyozyten über den MEK-ERK1/2-Signalweg, wobei die Proliferation von kardialen Vorläuferzellen stimuliert wird<sup>[167]</sup>.



**Abb. 11:** Bestimmung des kardiogenen Profils von Ascorbinsäure in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen mit jeweils 1 mM Ascorbinsäure behandelt (**A**). Darüber hinaus erfolgte eine Behandlung der Zellen über die gesamte Assay-Dauer in den oben angegebenen Konzentrationen (**B**). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

In Anlehnung an die oben genannten Referenzen sollte **1** auch in dem hiesigen Differenzierungsassay in verschiedenen Konzentrationen sowohl in definierten Zeitfenstern als auch über den gesamten Differenzierungszeitraum zugegeben werden. Eine Konzentration von 10 mM erwies sich dabei als toxisch, sodass die höchste hier eingesetzte Konzentration 1 mM war. Bis zu dieser Konzentration zeigte sich ein dosisabhängiger kardiogener Effekt, der sowohl bei Exposition über die gesamte Differenzierung als auch in der frühen Phase der Differenzierung (D0-D3 und D0-D5) festzustellen war, sodass ein Einfluss auf die Mesoderm-Induktion und -Strukturierung postuliert werden kann (Abbildung 11, A/B). Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Sato *et al.* überein und lässt vermuten, dass **1** die Mesoderm-Induktion fördert<sup>[161]</sup>.

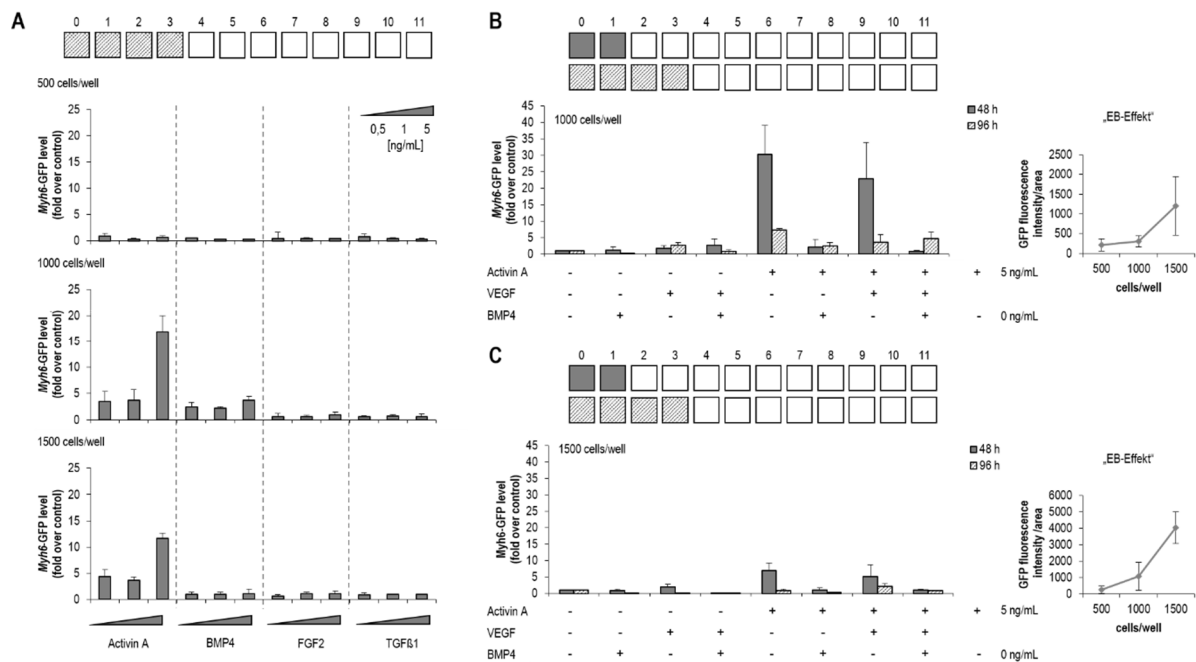
#### **3.4.4. Untersuchung des Einflusses der Wachstumsfaktoren Activin A, BMP4, FGF2, TGFβ1 und VEGF auf die Mesoderm-Induktion**

Eine effiziente Mesoderm-Induktion wird in vielen gerichteten Differenzierungsprotokollen vor allem durch ein reguliertes Zusammenspiel zwischen FGF, BMP, Wnt und Nodal/Activin A erreicht<sup>[168]</sup>. Während hierbei für die Aktivierung des Wnt-Signalweges niedermolekulare Substanzen wie der GSK3β-Inhibitor CHIR99021 zur Verfügung stehen, finden für die Aktivierung der anderen Signalwege rekombinante Proteine eine breite Anwendung. In einer vergleichenden Studie untersuchten Kawai *et al.* den separaten Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Induktion der Kardiogenese in der frühen Phase der Entwicklung, wobei sich FGF2 und BMP2 als besonders kardiogen während der ersten drei Tage der EB-Formation zeigten<sup>[169]</sup>, während Activin A die Kardiogenese nur moderat zu steigern vermochte. Behfar *et al.* maßen hingegen TGFβ1 und BMP2 in ihrem ES-Zell-Modell eine größere Bedeutung für die Kardiogenese bei als FGF2<sup>[170]</sup>.

In Anlehnung an die oben genannten Referenzen wurden verschiedene Wachstumsfaktoren (Activin A, BMP4, FGF2, TGFβ1) in der frühen Phase der Entwicklung der murinen ES-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet die Mesoderm-Bildung zu induzieren. Dabei sollte auch der Einfluss der Zelldichte vergleichbar der in manchen Protokollen verwendeten EB-Formation untersucht werden, wobei verschiedene Zellkonzentrationen (500, 1000 und 1500 Zellen pro Well) als *Monolayer* verwendet wurden. Festzustellen war hierbei, dass die Kardiogenese allein durch die Zellzahl signifikant gesteigert werden konnte („EB-Effekt“). Zeitgleich konnte lediglich Activin A während der viertägigen Exposition (D0-D4) die Kardiogenese dosisabhängig steigern (Abbildung 12, A), wobei diese kardiogene Aktivität nur bei Zellkonzentrationen von 1000 und 1500 Zellen pro Well festzustellen war. BMP4, FGF2 und TGFβ1 zeigten hingegen unter allen experimentellen Bedingungen nur eine schwache bis gar keine kardiogene Aktivität. Dieses könnte u.a. in dem Umstand begründet liegen, dass das hier gewählte Assay-Design des (dichten) *Monolayers* die EB-Formation nur unzureichend nachbildet und die räumlich-zeitliche Aktivität der Wachstumsfaktoren unter diesen Bedingungen eine andere ist. Bemerkenswert war zudem, dass unter den gewohnten Bedingungen mit einer anfänglichen



Zellkonzentration von 500 Zellen pro Well die Kardiogenese durch keinen der Wachstumsfaktoren gesteigert werden konnte, was womöglich auf eine höhere Empfindlichkeit der Zellen bei geringer Zelldichte sowie auf eine geringere Signalweg-Sensitivität unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist.



**Abb. 12:** Bestimmung des kardiogenen Profils der Wachstumsfaktoren Activin A, BMP4, FGF2, TGFβ1 und VEGF in der mESC-Differenzierung in Abhängigkeit der Zellkonzentration. Die murinen ES-Zellen wurden an Tag 0 in den oben angegebenen Konzentrationen ausgesät und über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert. Dabei wurden die Zellen in den oben angegebenen Zeiträumen mit den Wachstumsfaktoren in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt, wobei die Wachstumsfaktoren entweder einzeln (**A**) oder in Kombination (**B, C**) auf die Zellen gegeben wurden. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignals) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Die Expositionsdauer sollte daher anschließend für die beiden Wachstumsfaktoren Activin A und BMP4 optimiert werden, wobei sich an Arbeiten von Hartman *et al.* und Kattman *et al.* orientiert wurde. Beide Arbeitsgruppen entdeckten, dass die relativen Anteile an Activin A und BMP4 in Kombination mit VEGF für die kardiale Differenzierung der Mesoderm-Induktion und der finalen Bildung des kardialen Mesoderms entscheidend sind<sup>[70],[171]</sup>. Kattman *et al.* titrierten dabei in einem EB-basierten Differenzierungsprotokoll mit murinen und humanen ES-Zellen nach einer zweitägigen Initialphase verschiedene Konzentrationen an Activin A (0 bis 4 ng/mL) und BMP4 (0,1 bis 12,5 ng/mL) bei konstanter VEGF-Konzentration (5 ng/mL) gegeneinander, wobei die optimale Kombination, die die Kardiogenese am effektivsten förderte, für beide ES-Zell-Typen bei 3 bzw. 6 ng/mL Activin A und 10 ng/mL BMP4 lag<sup>[70]</sup>.

Die in diesem Assay getesteten Konzentrationen für Activin A und BMP4 betragen 0, 0,5, 1, 2, 5 und 10 ng/mL bei einer Konzentration für VEGF von 5 ng/mL. Zeitgleich

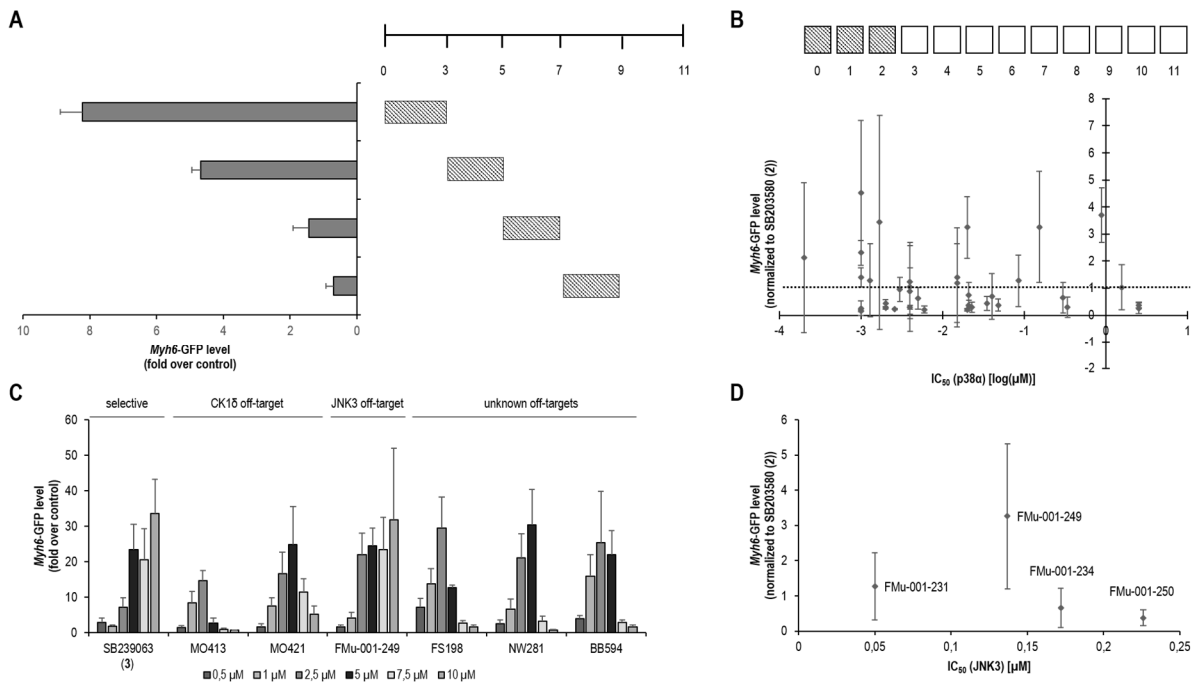
sollte eine erhöhte Zellkonzentration (1000 und 1500 Zellen pro Well) die EB-Formation aus dem Protokollen von Hartman *et al.* und Kattman *et al.* nachbilden. Wie in dem zuvor gezeigten Beispiel war auch in diesen Experimenten eine hohe Zellkonzentration (1500 Zellen pro Well) ohne weitere Stimulation ausreichend, um eine solide Kardiogenese zu generieren (Abbildung 12, C). Die Kardiogenese konnte in der Folge durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren nicht weiter gesteigert werden, weshalb die *fold-over-control*-Werte dementsprechend niedrig waren. Für die experimentellen Bedingungen mit 1000 Zellen pro Well zeigte sich, dass zu einem frühen Zeitpunkt eine kurze Exposition (D0-D2) einen größeren Einfluss auf die kardiale Differenzierung hat als eine längere (D0-D4) (Abbildung 12, B). Es kann also geschlussfolgert werden, dass in diesem Fall die Mesoderm-Bildung von Tag 0 bis Tag 2 stattfindet und eine weitere kardiale Entwicklung mehr durch eine Inhibition als durch eine Stimulation der Signalwege gefördert wird. In diesem Zusammenhang darf auf die BMP-Inhibitoren verwiesen werden, die zwischen Tag 3 und Tag 5 der Differenzierung ihre stärkste kardiogene Aktivität gezeigt haben (Kapitel 3.4.6.).

BMP4 wies in keiner der getesteten Konzentrationen eine kardiogene Aktivität auf und schien vielmehr sogar die durch Activin A induzierte Kardiogenese zu inhibieren. Abbildung 12, B/C zeigt dabei die einzelnen und kombinatorischen Effekte für Activin A, BMP4 und VEGF bei jeweils 5 ng/mL. Activin A scheint in dem vorliegenden Assay hingegen am effektivsten die Mesoderm-Bildung zu induzieren, wobei der Effekt zumindest mit VEGF und BMP4 nicht weiter gesteigert werden konnte. Ein additiver Effekt unter Verwendung weiterer Wachstumsfaktoren wie FGF2 und/oder TGFβ1 wäre aber denkbar.

### 3.4.5. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren der p38 MAP-Kinase

In einem Screen mit humanen ES-Zellen wurde der p38α MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 (**2**) erstmalig als kardiogene Substanz identifiziert, die gemäß genexpressionistischer Untersuchungen die frühe Mesoderm-Bildung fördert<sup>[172]</sup>. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine biphasische biologische Aktivität von **2**, die bei geringen Konzentrationen die Differenzierung der humanen ES-Zellen zu Kardiomyozyten stimulierte, diese bei höheren Konzentrationen ( $\geq 15 \mu\text{M}$ ) jedoch einschränkte. Nachfolgende Arbeiten von Laco *et al.* mit weiteren 2-, 4-, 5-trisubstituierten Azolen (TA, genauer: Imidazole) bestätigten diesen Effekt und konnten darüber hinaus anhand der Analoga-Serie belegen, dass die Kardiogenese nicht mit der Inhibition der p38α MAP-Kinase korreliert<sup>[173]</sup>, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass der kardiogene Mechanismus von **2** und seiner Analoga nicht in der Inhibition der p38α MAP-Kinase begründet liegt. Vielmehr scheint eine vollständige p38α MAP-Kinase-Inhibition durch hohe Konzentrationen von **2** oder potentere Inhibitoren wie TA-01 die kardiale Entwicklung zu unterdrücken, insbesondere wenn sie in der prä-mesodermalen Phase erfolgt<sup>[173]</sup>. Dieses stünde in Einklang mit anderen Studien, die zeigen, dass diese Kinase-Aktivität für die Kardiogenese<sup>[174]</sup> und die Ausbildung des Mesoderms von Bedeutung ist<sup>[175]</sup>. Um den kardiogenen Wirkmechanismus zu

identifizieren, führten Laco *et al.* mit ausgewählten 2, -4, -5-trisubstituierten Azolen einen Screen mit 97 Kinasen durch und identifizierten dabei die Casein Kinase 1 (CK1) als mögliches *off-target*. Da diese im Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg involviert ist und deren Inhibierung in der post-mesodermalen Phase der Differenzierung die Kardiogenese stimuliert<sup>[62]</sup>, postulierten die Autoren, dass die kardiogene Aktivität von **2** und seiner Analoga auf die Inhibition von CK1 $\delta/\epsilon$  und damit des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges zurückzuführen ist.



**Abb. 13:** Bestimmung des kardiogenen Profils von p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitoren in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen mit jeweils 10  $\mu$ M SB203580 (**2**) behandelt (**A**). Unterschiedlich selektive p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitoren einer Substanzbibliothek wurden zwischen Tag 0 und Tag 3 auf die Zellen gegeben und deren höchste dosisabhängige kardiogene Aktivität (2,5 bzw. 10  $\mu$ M) auf die von SB203580 (**2**) (=1) normalisiert sowie gehen ihre jeweiligen p38 $\alpha$  MAPK-Aktivitäten (log IC<sub>50</sub>) aufgetragen (**B**). SB239063 (**3**) und ausgewählte kardiogene p38 MAP-Kinase-Inhibitoren mit unterschiedlichem *off-target*-Profil wurden anschließend in den oben angegebenen Konzentrationen erneut getestet (**C**). Eine Korrelation der Kardiogenese- und JNK3-Aktivität erfolgte für die Substanzen, die ein Selektivitätsprofil gegenüber dem *off-target* JNK3 aufwiesen (**D**). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SD von mindestens drei Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Die Bedeutung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges für die kardiale Differenzierung embryonaler Stammzellen ist hinreichend bekannt, wobei in der prä-mesodermalen Phase die Aktivierung des Signalweges die Kardiogenese fördert<sup>[176]</sup>, wohingegen dieser Effekt in der post-mesodermalen Phase durch seine Inhibierung erhalten wird<sup>[62]</sup>. Auch wenn für **2** sowohl Wnt- als auch TGF $\beta$ -inhibierende Eigenschaften beschrieben sind<sup>[177],[178]</sup>, sollte in Anlehnung an die oben genannten Referenzen vor allem untersucht werden, ob **2** gemäß den Arbeiten von Graichen *et al.* nicht nur die Mesoderm-Bildung humaner, sondern auch der hier verwendeten murinen ES-Zellen fördert und damit ihre kardiale Differenzierung stimuliert. Da **2** wie bereits erwähnt auch mit anderen Signalwegen interagiert, wurde der p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitor deshalb

zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige kardiogene Aktivität von **2**, die in der anfänglichen Phase der Differenzierung besonders ausgeprägt war und mit fortlaufender Differenzierung sukzessive abnahm (Abbildung 13, A). Während dabei zwischen Tag 5 und Tag 7 keine signifikante kardiogene Aktivität feststellbar war, was womöglich darauf schließen lässt, dass **2** zumindest bei der hier verwendeten murinen Zelllinie keinen Wnt-inhibierenden Effekt ausübt, könnte die moderate kardiogene Aktivität von **2** zwischen Tag 3 und Tag 5 zumindest z.T. auf seine TGF $\beta$ -inhibierende Wirkung zurückzuführen sein. Die kardiogene Aktivität in den ersten drei Tagen der Differenzierung belegt jedoch die von Graichen *et al.* postulierte Induktion der Mesoderm-Bildung<sup>[172]</sup>.

Mit einer Substanzbibliothek von unterschiedlich selektiven p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitoren sowie selektiven Inhibitoren der wichtigsten, typischen *off-targets*, die von Prof. Dr. Stefan Laufer (Tübingen) zusammen- und bereitgestellt wurde (Anhang 11.1.), sollte anschließend in einem Screen der Wirkmechanismus für die Mesoderm-Bildung genauer untersucht werden. Hierbei wurden die Substanzen mit Hilfe der Robotik an Tag 0 in drei verschiedenen Konzentrationen (0,33, 2,5 und 10  $\mu$ M) auf die Zellen gegeben und diese bis Tag 3 inkubiert. Die Auswertung des Screens, bei der die jeweils dosisabhängige höchste kardiogene Aktivität auf die von **2** normalisiert und gegen die p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Aktivität aufgetragen wurde, bestätigte das Ergebnis vorangegangener Studien von Laco *et al.*, wobei die meisten hochpotenten p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitoren mit einem IC<sub>50</sub>-Wert (p38 $\alpha$ ) im unteren nanomolaren Bereich eher eine geringere Kardiogenese als **2** aufwiesen (Abbildung 13, B). Nachfolgende Evaluierungsexperimente mit ausgewählten Substanzen, deren kardiogene Aktivität über einen größeren Konzentrationsbereich untersucht werden sollte, bestätigten zudem das Phänomen, dass in höheren nicht-toxischen Konzentrationen die Kardiogenese inhibiert wird (Abbildung 13, C). Dahingegen konnte bei SB239063 (**3**), einem potenten und selektiven p38 $\alpha$ -Inhibitor, die Kardiogenese bis 10  $\mu$ M dosisabhängig gesteigert werden, was den Anschein erweckt, dass eine hohe Selektivität und geringere Anzahl an *off-targets* die Kardiogenese von p38 $\alpha$  MAP-Kinase-Inhibitoren begünstigt. Die Substanzen, die die CK1 $\delta$  als *off-target* aufweisen, zeigten eine im Vergleich geringere kardiogene Aktivität, was mit der Literatur und eigenen Ergebnissen konform ist, da in der prä-mesodermalen Phase der Differenzierung die Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges für die Kardiogenese von Bedeutung ist, wohingegen dessen Inhibierung erst nach der Mesoderm-Bildung kardiogen wirkt<sup>[173]</sup>. Das *off-target* JNK3 hingegen schien möglicherweise einen positiven Einfluss auf die Kardiogenese zu haben, weshalb darüber hinaus weitere duale p38 $\alpha$ /JNK3-Inhibitoren getestet wurden (Abbildung 13, D). Eine klare Korrelation zwischen dem *off-target* JNK3 und der kardiogenen Aktivität bestätigte sich dabei jedoch nicht. Der kardiogene Wirkmechanismus von **2** und seiner Analoga zur Förderung der Mesoderm-Bildung scheint demzufolge p38 $\alpha$  MAPK-abhängig zu sein, wobei das Selektivitätsprofil der getesteten Substanzen auf weitere *off-targets* hinweist, die zusätzlich die Kardiogenese stimulieren (Abbildung 13, C). Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Zellviabilität beeinflussende Faktoren der verschiedenen Substanzen einen entscheidenden Beitrag zum beobachteten Profil

leisten. Interessant wäre darüber hinaus zu untersuchen, ob die p38 MAP-Kinase-Inhibitoren mit dem *off-target* CK1 $\delta$  in dem Assay-Zeitfenster von Tag 5 bis Tag 7, in dem potente und selektive Wnt-Inhibitoren die Kardiogenese am stärksten förderten, ihre Wnt-inhibierende Wirkung bestätigen und zudem eine höhere kardiogene Aktivität aufweisen als beispielsweise **3**.

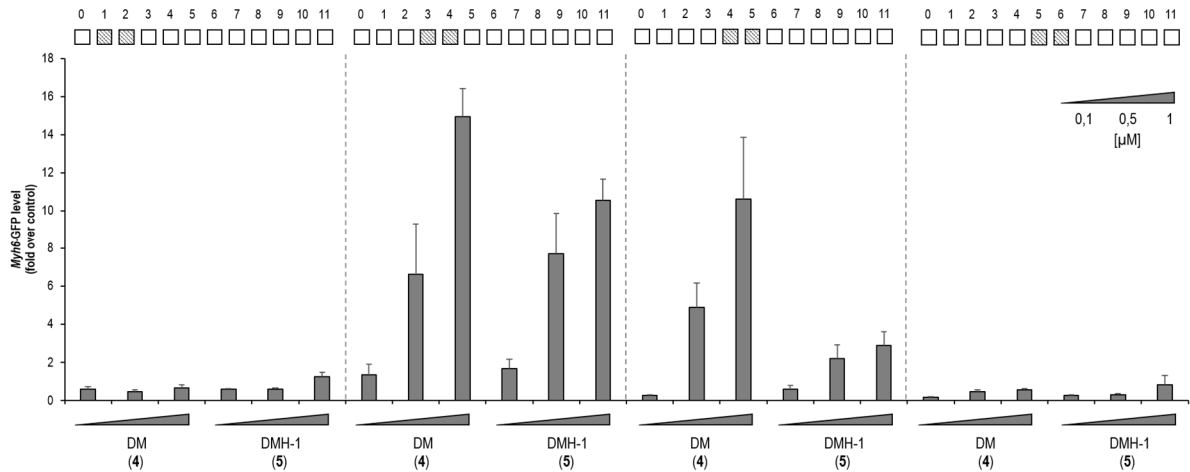
### 3.4.6. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des BMP-Signalweges

Auch dem BMP-Signalweg kommt eine wesentliche Bedeutung in der Mesoderm-Induktion und Bildung kardialer Zellpopulationen zu<sup>[179],[180]</sup>. Studien zur kardialen Morphogenese an Hühner- und Mäuse-Embryonen haben dabei gezeigt, dass in der frühen Entwicklungsphase die alleinige Anwesenheit von BMP-Liganden unzureichend ist, um die kardiale Differenzierung anzuregen<sup>[181],[182]</sup> und das Mesoderm durch Antagonisten des BMP-Signalweges reguliert wird<sup>[63],[183],[184]</sup>. Aber auch *in vitro*-Experimente mit murinen ES-Zellen belegen, dass durch Inhibierung des Signalweges, beispielsweise durch den endogenen BMP-Inhibitor Noggin, die Differenzierung zu Kardiomyozyten gefördert werden kann<sup>[65]</sup>. Dabei kann die Inhibierung der BMP-Signalübertragung wie in dem Beispiel entweder durch antagonisierende Effekte auf die BMP-Rezeptoren extrazellulär erfolgen oder durch Inhibierung der intrazellulären BMP-Rezeptor Kinase-Aktivität<sup>[185]</sup>. So wurden in den vergangenen Jahren viele Anstrengungen unternommen, niedermolekulare Substanzen zu identifizieren, die wirksam und selektiv den BMP-Signalweg hemmen und für die gerichtete Differenzierung von Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten eingesetzt werden können<sup>[34],[36],[65]</sup>. Darüber hinaus diskutierten Cuny *et al.* auch einen möglichen therapeutischen Einsatz bei einem gestörten BMP-Signalweg wie beispielsweise bei der *Fibrodysplasia ossificans progressiva*, einer krankhaften und fortschreitenden Verknöcherung des Binde- und Stützgewebes<sup>[35],[186]</sup>.

Dorsomorphin (**4**) wurde von Hao *et al.* als selektiver BMP-Inhibitor beschrieben, der die Kardiogenese von ES-Zellen fördert<sup>[34]</sup>. **4** inhibiert die Smad1/5/8-Phosphorylierung durch die BMP Typ I-Rezeptoren ALK1, ALK3 und ALK 6<sup>[35]</sup>, weist jedoch auch signifikante *off-target*-Effekte gegenüber der AMP-Kinase, dem *platelet-derived growth factor* Rezeptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ), und dem dem *vascular endothelial growth factor type II* Rezeptor (VEGFR2/KDR) auf<sup>[67],[187]</sup>. Cuny *et al.* optimierten zwar das Selektivitätsprofil von **4**, jedoch wies die optimierte Substanz LDN-193189 bzw. DM-3189 auch weiterhin eine *off-target*-Aktivität gegenüber TGF $\beta$  (ALK5) auf.

Eine 2. Generation an niedermolekularen BMP-Inhibitoren wurde nach weiteren Selektivitätsoptimierungen mit dem Dorsomorphin Homolog-1 (DMH-1) (**5**) erhalten. **5** stellt im Vergleich zu **4** und LDN-193189 einen noch selektiveren Inhibitor des BMP Typ I-Rezeptors dar und besitzt keine inhibitorische Aktivität gegenüber der p38 MAP-Kinase-Phosphorylierung, der Activin A-induzierten Smad2-Phosphorylierung und der VEGF-induzierten Flk1-Phosphorylierung<sup>[67]</sup>. Ao *et al.* zeigten zudem, dass **5** ebenfalls

die kardiale Differenzierung von murinen ES-Zellen fördert, wobei mit **5** behandelte Zellen bereits früher (vor-)mesodermale Marker wie Brachyury T und Mesp1 exprimierten als mit **4** behandelte Zellen, was in dem Selektivitätsprofil begründet zu sein scheint<sup>[36]</sup>. Da weder **4** noch **5** zwischen ALK1, ALK2, ALK3 und ALK6 unterschieden, wurde in SAR-Studien schließlich der hochselektive ALK2-Inhibitor ML347 entdeckt, welcher eine >300-fache Selektivität von ALK2 gegenüber ALK3 zeigte<sup>[37]</sup>.



**Abb. 14:** Bestimmung des kardialen Profils der BMP-Inhibitoren Dorsomorphin (DM, **4**) und Dorsomorphin Homolog-1 (DMH-1, **5**) in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen mit den oben angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Die beiden oben vorgestellten BMP-Inhibitoren wurden im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Konzentrationen in verschiedenen Zeitfenstern des Differenzierungsassays auf die Zellen gegeben, wobei für Konzentrationen oberhalb von 2  $\mu$ M toxische Effekte festzustellen waren. Die kardiale Aktivität von **4** und **5** war dabei zwischen Tag 3 und Tag 5 am höchsten, wobei für **4** auch von Tag 4 bis Tag 6 eine signifikante Kardiogenese zu verzeichnen war (Abbildung 14). Dieses lässt sich mit dem geringeren Selektivitätsprofil von **4** begründen, sodass, wie nachfolgend für die TGF $\beta$ -Inhibitoren gezeigt wurde, in diesem Zeitfenster die TGF $\beta$ -inhibierende Wirkung von **4** zum Tragen kommt. Während durch das hochselektive Wirkprofil von **5** also der Einfluss des BMP-Signalweges im Zeitfenster Tag 3 bis Tag 5 bestätigt wird, liegt die kardiogene Wirkung von **4** zwischen Tag 3 und Tag 6 sowohl in einer Hemmung des BMP- als auch des TGF $\beta$ -Signalweges begründet. Ein solcher synergistischer Effekt im Sinne der effizienten kardialen Differenzierung wurde zwar bereits von der Mercola-Gruppe gezeigt<sup>[188]</sup>, in dieser Arbeit jedoch erstmalig die zeitlich konzertierte Funktion dieser beiden Signalwege. Darüber hinaus war sowohl für **4** als auch für **5** in der späteren Phase der Differenzierung (D5-D7) keine kardiogene Aktivität und damit kein Einfluss einer Wnt-Komponente feststellbar. Während für die Mesoderm-Bildung eine Aktivierung vor allem der beiden Signalwege Wnt und BMP von Bedeutung ist, ist für die post-mesodermale Stimulation kardialer Vorläuferzellen deren Inhibierung

wichtig<sup>[39],[41],[43]</sup>. Die unterschiedliche zeitliche Abhängigkeit dieser beiden Signalwege zumindest in der späteren Phase der Differenzierung konnte in dem vorliegenden Assay-System erstmalig gut dargestellt werden, was vor allem die Möglichkeit für detailliertere mechanistische Untersuchungen in einem entwicklungsbiologischen Kontext bereithielt. Es bleibt jedoch zu betonen, dass die physiologische Komplexität nicht abgebildet werden kann und sich die Differenzierung im Kontext einer Gewebe- und Embryonalentwicklung anders darstellen kann.

### 3.4.7. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des TGF $\beta$ -Signalweges

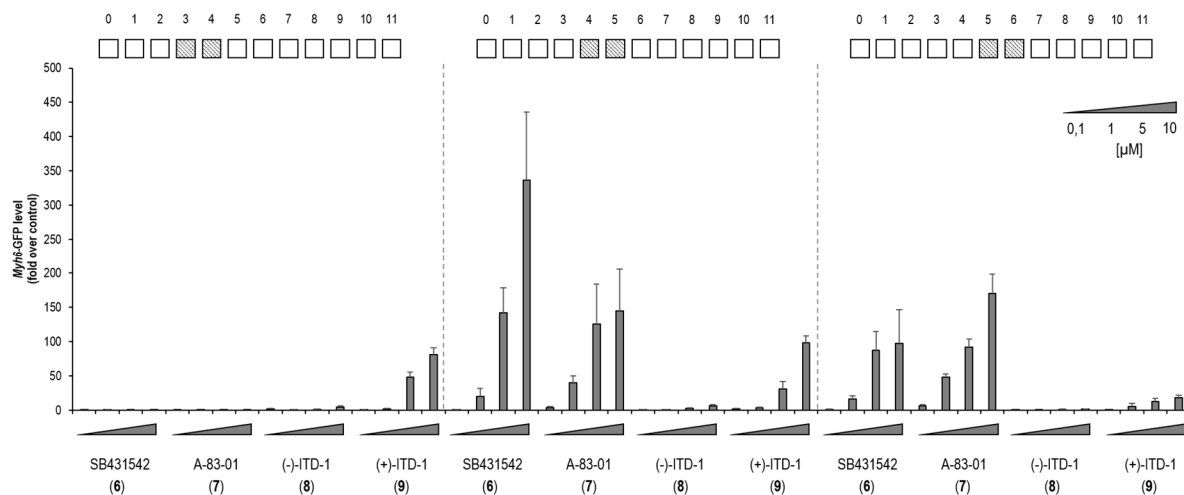
Substanzen, die selektiv den TGF $\beta$ -Signalweg inhibieren, gelten als vielversprechend für die therapeutische Anwendung bei Erkrankungen wie fibrotischen Störungen, Krebs, Atherosklerose oder starker Narbenbildung<sup>[189]</sup>. Ferner finden sich Beispiele für eine positive Einflussnahme auf die Proliferation und Differenzierung von ES-Zellen<sup>[190]</sup>, weshalb eine Auswahl von TGF $\beta$ -Inhibitoren auch bezüglich ihrer kardiogenen Eigenschaften auf die hier verwendeten murinen ES-Zellen untersucht werden sollte.

Eine dieser ausgewählten Substanzen war SB431542 (**6**), ein potenter und selektiver Inhibitor der TGF $\beta$ -Superfamilie Typ I Activin Rezeptor-*like* Kinase (ALK)-Rezeptoren ALK4, ALK5 und ALK7<sup>[189]</sup>. **6** ist ein ATP-kompetitiver Kinase-Inhibitor, der die *in vitro*-Phosphorylierung von immobilisiertem Smad3 hemmt<sup>[191]</sup>. Weiterhin inhibiert **6** die TGF $\beta$ - und Activin-induzierte Phosphorylierung von Smad2, die durch ALK5 und ALK4 vermittelt wird, jedoch nicht die BMP-induzierte Phosphorylierung von Smad1, in der ALK2, ALK3 und ALK6 involviert sind. Inman *et al.* stellten zudem keinen signifikanten Einfluss von **6** auf die verschiedenen MAPK-Signalwege fest, sodass eine vollständige Inhibition für die endogenen ALK5-Rezeptoren bereits mit 2  $\mu$ M erzielt wurde, ein Effekt auf die endogene p38 MAP-Kinase-Aktivität jedoch auch bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M ausblieb<sup>[189]</sup>.

Tojo *et al.* beschrieben A-83-01 (**7**) als einen im Vergleich zu **6** noch potenteren ALK5-Inhibitor, der ebenfalls die Phosphorylierung von Smad2/3 verhindert und einen geringen bis gar keinen Effekt auf BMP Typ I-Rezeptoren, die p38 MAP-Kinase oder die extrazellulär-regulierte Kinase hat. Zudem inhibiert **7** die Epithelial-mesenchymale Transition<sup>[71]</sup>.

Eine neuartige Inhibierung des TGF $\beta$ -Signalweges entdeckte die Arbeitsgruppe um Mark Mercola<sup>[72]</sup>. In dem fast identischen, hier beschriebenen Assay mit murinen ES-Zellen identifizierten sie neue 1,4-Dihydropyridine als *inducer of type II TGF $\beta$  receptor (TGFB $\beta$ R2) degradation-1* (ITD-1). Diese fördern die Entfernung des Rezeptors von der Zelloberfläche über die Stimulation des proteasomalen Abbaus von TGFB $\beta$ R2 und damit die selektive Inhibierung intrazellulärer Signale. Zudem stellten die Autoren

einen biphasischen Effekt für diese Substanzklasse fest. So inhibiert ITD-1 in der frühen Phase (D1-D3) der Differenzierung von murinen ES-Zellen die Mesoderm-Bildung, fördert aber die Kardiogenese in der darauffolgenden Differenzierungsphase (D3-D5). Für die kardiogene Aktivität des Racemats ITD-1 ist dabei nicht das (-)-Enantiomer (**8**), sondern allein das (+)-Enantiomer (**9**) verantwortlich, das Längle *et al.* mittels X-Ray Kristalluntersuchung als (*R*)-konfiguriert identifizieren konnten<sup>[192]</sup>.



**Abb. 15:** Bestimmung des kardiogenen Profils der TGFβ-Inhibitoren SB431542 (**6**), A-83-01 (**7**), (-)-ITD-1 (**8**) und (+)-ITD-1 (**9**) in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen bei einem FBS-Gehalt von 2 % mit den oben angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Die Untersuchung der oben genannten Substanzen in verschiedenen Zeitfenstern des in dieser Arbeit beschriebenen Differenzierungsassays mit murinen ES-Zellen zeigte eine besondere Bedeutung der TGFβ-Inhibition für die kardiale Differenzierung zwischen Tag 4 und Tag 7 (Abbildung 15). Auffällig war, dass das Wirkprofil von **8** zu dem von **6** und **7** leicht abwich. So war für **8** im Gegensatz zu **6** und **7** auch von Tag 3 bis Tag 5 eine kardiogene Aktivität festzustellen, während **6** und **7** zwischen Tag 5 und Tag 7 kardiogen waren, wohingegen **8** inaktiv blieb. Die kardiogene Aktivität von **6** und **7** in dieser späteren Phase der Differenzierung könnte darin begründet liegen, dass ihr Wirkprofil noch weitere Kinasen mit einschließt und womöglich mit dem Wnt/β-Catenin-Signalweg interagiert. Darüber hinaus kann gemutmaßt werden, dass vielleicht auch eine proliferative Wirkkomponente der beiden Substanzen eine Rolle spielt.

### 3.4.8. Bestimmung der kardiogenen Aktivität von Inhibitoren des Wnt/β-Catenin-Signalweges

Die Inhibition des Wnt-Signalweges hat erwiesenermaßen positiven Einfluss auf Infarktgewebe<sup>[50]–[52]</sup> und fördert die kardiale Differenzierung von ES- und iPS-



Zellen<sup>[17],[48]</sup>. Des Weiteren kommt dem Wnt-Signalweg eine tragende Rolle bei kritischen biologischen Prozessen bei der kardialen Entwicklung zu, sowie bei der Proliferation und Differenzierung verschiedener Stamm- und Vorläuferzell-Populationen<sup>[44],[45]</sup>.

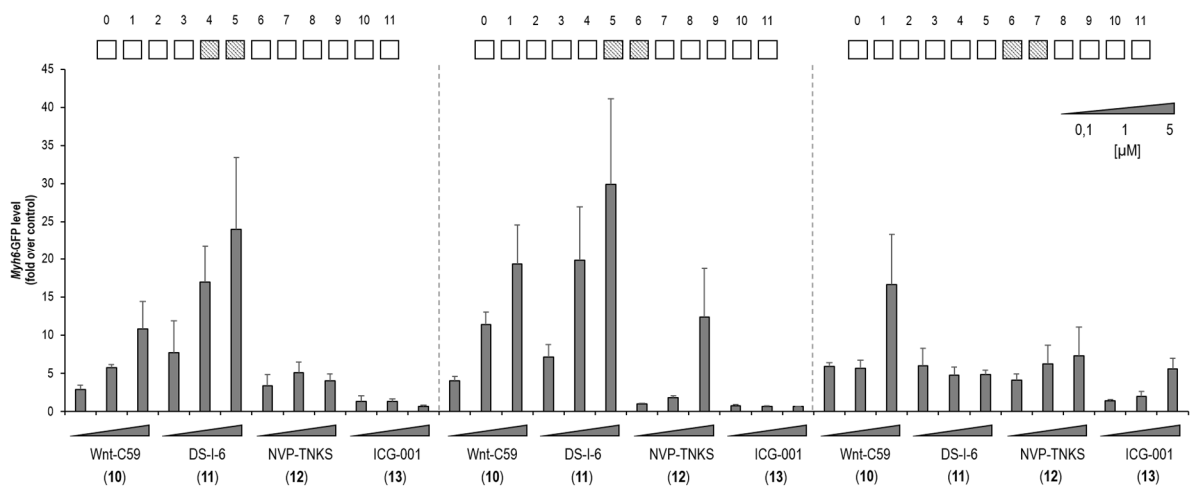
Die Signal-Inhibierung mit Hilfe niedermolekularer Substanzen zur gerichteten Differenzierung zu Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten kann dabei auf verschiedenen Ebenen des Wnt-Signalweges erfolgen. Chen *et al.* identifizierten in einem Screening-basierten Ansatz zwei Substanzklassen, von denen die eine die Aktivität von *Porcupine*, einer membrangebundenen Acyltransferase, die essentiell für die Produktion von Wnt-Proteinen ist, inhibiert, und die andere den Abbau vom Axin-Proteinen unterbindet, die die Aktivität des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges unterdrücken. Folglich wurden die Substanzen entweder dem IWP-Typ (*inhibitors of Wnt production*) oder dem IWR-Typ (*inhibitors of Wnt response*) zugeordnet<sup>[53]</sup>. Lanier *et al.* unternahmen in diesem Zusammenhang 2012 ausgehend von IWR-1 erstmals umfangreiche SAR-Studien, um Inhibitoren des IWR-Typs für die Anwendung der gerichteten kardiogenen Differenzierung humaner ES-Zellen zu optimieren<sup>[62]</sup>. Die Überlegenheit dieser optimierten Inhibitoren gegenüber solchen anderen Typs und Wirkprofils in Bezug auf ihren Einsatz in gerichteten Differenzierungsprotokollen bestätigten zudem nachfolgende vergleichende Untersuchungen von Burrige *et al.*, was vor allem in der geringeren Toxizität und weniger *off-targets* begründet lag<sup>[43]</sup>.

Bei den hier verwendeten Wnt-Inhibitoren stellt Wnt-C59 (**10**)<sup>[193]</sup> einen Inhibitor des IWP-Typs dar, während DS-I-6 (**11**) dem IWR-Typ zuzuordnen ist<sup>[40]</sup>. Wie **11** inhibiert auch NVP-TNKS656 (**12**)<sup>[194]</sup>, ein in SAR-Studien optimiertes Derivat von XAV939<sup>[195]</sup>, den Wnt-Signalweg auf Tankyrase-Ebene mit der Folge, dass die Tankyrase-vermittelte Stabilisierung von Axin, einer Komponente des  $\beta$ -Catenin-Abbauflexes, verhindert wird, wodurch die Aktivität des  $\beta$ -Catenin-Abbauflexes erhöht wird.  $\beta$ -Catenin vermittelt nachfolgend die Wnt-abhängige Transkriptionsaktivität verschiedener *Wnt-target*-Gene. ICG-001 (**13**) kann in diesem Zusammenhang die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit dem *CREB binding protein* (CBP) blockieren und so die Transkription verhindern<sup>[56]</sup>.

Die oben genannten Wnt-Inhibitoren wurden in dem vorliegenden Differenzierungsassay in Konzentrationen bis zu 5  $\mu$ M getestet und dabei die Zeit- und Serumabhängigkeit untersucht. Dazu wurden diese Substanzen entweder bei einem Serumanteil von 2 oder 10 % mit dem Medium zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Zellen gegeben. Hierbei zeigte sich, dass die Kardiogenese bei einem Serumanteil von 2 % und einer Wnt-Inhibition von Tag 5 bis Tag 7 am stärksten ausgeprägt war, wobei die Inhibierung auf Axin/ $\beta$ -Catenin-Komplex-Ebene besonders effizient war (Abbildung 16). Interessanterweise war **11** des optimierten IWR-Typs potenter als der optimierte Tankyrase-Inhibitor **12**, obwohl der Signalweg durch beide Substanzen auf vergleichbare Weise inhibiert wird. Das könnte jedoch in der geringeren Toxizität von **11** begründet liegen, sowie darin, dass im Vergleich zu **12** weniger *off-targets* involviert

sind. Die Verträglichkeit und Effizienz von **11** ist hierbei auch gegenüber **10** erhöht, was auch schon von Burrige *et al.* im Zusammenhang mit der Entwicklung eines chemisch-definierten Differenzierungsprotokolls von humanen pluripotenten Stammzellen als kritischer Punkt beschrieben wurde<sup>[43]</sup>. Im Vergleich dazu stellte sich **13** in diesem Assay als unwirksam heraus, was daher herrühren kann, dass dieser Wnt-Inhibitor für die gerichtete Differenzierung von murinen ES Zellen nicht potent genug ist und möglicherweise erst auf eine isolierte Population kardialer Vorläuferzellen Einfluss nehmen kann.

Interessant war in diesem Zusammenhang zudem, dass die kardiogene Aktivität der Wnt-Inhibitoren abhängig von der Höhe der Zellpassage war. So war zu beobachten, dass die Zellen bei hohen Zellpassagen ( $\geq 10$ ) durch Inhibierung des Wnt-Signalweges nicht in ihrer kardialen Differenzierung stimuliert werden konnten, wohingegen dieses bei Zellen mit geringer Zellpassage möglich war.



**Abb. 16:** Bestimmung des kardiogenen Profils der Wnt-Inhibitoren Wnt-C59 (**10**), DS-I-6 (**11**), NVP-TNKS656 (**12**) und ICG-001 (**13**) in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen bei einem FBS-Gehalt von 2 % mit den oben angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment mit geringer Zellpassage.

### 3.5. Zusammenfassung

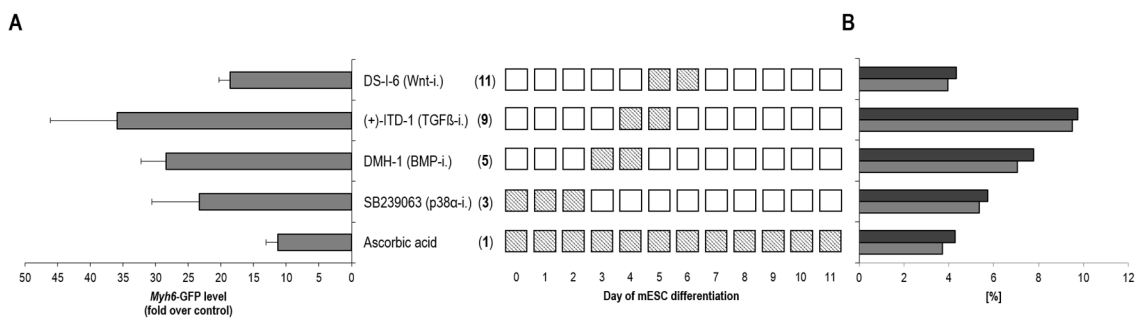
Aufbauend auf den Arbeiten von Paul J. Bushway<sup>[149]</sup> konnte der hier verwendete Kardiogenese-Assay mit murinen ES-Zellen erfolgreich transferiert und im eigenen Labor etabliert werden. Im Zuge dessen wurde zudem die Bild-basierte Quantifizierung der Kardiogenese (*Imaging*) für die eigene Anwendung optimiert und im Vergleich zu den Arbeiten der Mercola-Gruppe simplifiziert und zeiteffizienter gestaltet. Darüber hinaus war es möglich die Kosteneffizienz des Assays zu steigern, indem teure ES-Zell-qualifizierte Produkte adäquat ersetzt werden konnten, sowie die Robustheit und Variabilität des Assays zu optimieren.

Um in diesem Assay effektive, chemisch-definierte kardiogene Bedingungen zu eruieren und die Rolle verschiedener Signalwege und Mechanismen während der Differenzierung mit entsprechenden Modulatoren adressieren zu können, wurde ein chemisch-biologischer Ansatz gewählt, wobei die kardiale Differenzierung der murinen ES-Zellen zunächst mit bekannten kardiogenen Substanzen charakterisiert wurde. Während dabei mit den Wachstumsfaktoren Activin A, BMP4, FGF2, TGFβ1 sowie VEGF die Mesoderm-Bildung und damit die Kardiogenese nicht bzw. mit Activin A erst bei höheren Zellkonzentrationen gefördert werden konnte, war dieses unter Verwendung der Inhibitoren der p38α MAP-Kinase wie SB203580 (**2**) und SB239063 (**3**) möglich und bestätigte damit die Ergebnisse von Graichen *et al.*, die diesen Effekt bereits für humane ES-Zellen gezeigt haben<sup>[172]</sup>. Insbesondere der selektive Inhibitor SB239063 (**3**) wies dabei eine hohe kardiogene Aktivität auf und lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine hohe Selektivität die Kardiogenese begünstigt. Darüber hinaus kam ein Screen mit einer Substanzbibliothek verschiedener p38α MAP-Kinase-Inhibitoren mit unterschiedlichem *off-target*-Profil zu dem Ergebnis, dass das von Laco *et al.*<sup>[173]</sup> identifizierte *off-target* CK1 in diesem Fall nicht die Mesoderm-Bildung fördert, da in der prä-mesodermalen Phase der Differenzierung die mit einer Inhibition der CK1 einhergehenden Inhibierung des Wnt-Signalweges die Kardiogenese verhindert. Zudem schien auch ein anderes *off-target*, die JNK3, keinen Einfluss auf die Kardiogenese zu haben, da dessen Inhibition ebenfalls nicht mit der kardiogenen Aktivität korrelierte. Die in vielen Protokollen als Supplement des Differenzierungsmediums enthaltene Ascorbinsäure (**1**) stimulierte ebenfalls bei Exposition in frühen Phasen der Differenzierung die Mesoderm-Bildung und Kardiogenese. Der zugrunde liegende kardiogene Wirkmechanismus der Modulation der Kollagenbiosynthese nach Sato *et al.*<sup>[161]</sup> war aber im Vergleich weniger effektiv, sodass weniger Kardiomyozyten (ca. 4 %) am Ende der Differenzierung erhalten wurden als durch die p38α-Inhibitoren (5 bis 6 %) (Abbildung 17, B).

Nach erfolgter Mesoderm-Bildung kam der Inhibition des BMP-Signalweges zunächst die größte Bedeutung zu die kardiale Differenzierung der Zellen zu fördern. So zeigten die Inhibitoren Dorsomorphin (**4**) und Dorsomorphin Homolog-1 (**5**) ihre höchste kardiogene Aktivität zwischen Tag 3 und Tag 5, wobei für **4** auch bei einer Exposition von Tag 4 bis Tag 6 eine signifikante Aktivität feststellbar war. Dieses liegt in dem Wirkprofil von **4** begründet, sodass nicht nur selektiv wie bei **5** der BMP-Signalweg

inhibiert wird, sondern auch der TGF $\beta$ -Signalweg. Dessen Bedeutung in der Phase von Tag 4 bis Tag 6 konnte anhand der Inhibitoren SB431542 (6), A-83-01 (7) und (+)-ITD-1 (9) eindeutig verifiziert und somit die zeitlich konzertierte Funktion dieser beiden Signalwege für die kardiale Differenzierung gezeigt werden. Die Inhibierung des TGF $\beta$ -Signalweges scheint dabei für die kardiale Differenzierung der in diesem Assay verwendeten murinen ES-Zellen von besonders großer Bedeutung zu sein, da durch diesen Mechanismus die höchste Ausbeute an Kardiomyozyten erhalten werden konnte (10 %). Durch die BMP-Inhibition konnten hingegen Ausbeuten von 7 % Kardiomyozyten erhalten werden. Die kardiogene Aktivität der Wnt-Inhibitoren war zwischen Tag 5 und Tag 7 am höchsten, wobei die Inhibierung auf der Axin/ $\beta$ -Catenin-Komplex-Ebene die Kardiogenese am effizientesten stimulierte (5 % Kardiomyozyten). Hierbei zeigte der Inhibitor des IWR-Typs, DS-I-6 (11), eine höhere kardiogene Potenz als der optimierte Tankyrase-Inhibitor NVP-TNKS656 (12), obwohl beide den Signalweg auf vergleichbare Weise hemmen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass 11 eine geringere Toxizität und weniger *off-targets* aufweist.

Folglich konnte mit dem chemisch-biologischen Ansatz zur Charakterisierung der kardialen Differenzierung der murinen ES-Zellen erfolgreich die Grundlage geschaffen werden, um nachfolgend neuartige kardiogene Substanzen bzw. Naturstoffprodukte systematisch untersuchen zu können. Darüber hinaus konnte im Zuge dessen erstmalig für diesen Kardiogenese-Assay eine zeitlich konzertierte BMP-Aktivität herausgearbeitet werden, was es ermöglicht diesen Signalweg mechanistisch weiter zu untersuchen und über einen Screening-basierten Ansatz Aktivatoren dieses Signalweges zu identifizieren.



**Abb. 17:** Zusammenfassende Darstellung der kardiogenen Wirkung verschiedener niedermolekularer Substanzen in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben jeweils angegebenen Zeiträumen entweder bei einem FBS-Gehalt von 2 % (TGF $\beta$ - und Wnt-Inhibitoren) oder 10 % (p38 $\alpha$  MAPK- und BMP-Inhibitoren sowie Ascorbinsäure) in der jeweils potentesten Konzentration dieser Substanz behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von 32 Replikaten aus einem repräsentativen Experiment (A) Unter denselben Bedingungen wurden zudem mit Hilfe der Durchflusszytometrie die jeweiligen absoluten Anteile an GFP $^{+}$ - und MHC $^{+}$ -Zellen bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment, bei dem jeweils 32 Wells derselben Bedingung für die Messung vereinigt wurden (B).

## 4. Entwicklung eines neuen phänotypischen Assays für die Identifizierung niedermolekularer BMP-Mimetika

### 4.1. Einleitung

*Bone morphogenetic proteins* (BMPs) gehören zu der Klasse der TGF $\beta$ -Superfamilie und wurden ursprünglich nach ihrer Fähigkeit benannt *in vivo* die Ausbildung der Knochen zu fördern<sup>[196],[197]</sup>. In Abhängigkeit der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenz werden BMPs dabei typischerweise in vier Gruppe unterteilt: BMP2/4, BMP5/6/7/8a/8b, BMP9/10 und BMP12/13/14<sup>[198],[199]</sup>. Ihr Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Stimulierung der Osteogenese, sondern findet sich auch bei der Entwicklung und Homöostase einer Vielzahl menschlicher Organsysteme wieder<sup>[200],[201]</sup>, deren Störung mit mehreren Krankheitsbildern assoziiert ist<sup>[202]–[204]</sup>.

Die Möglichkeit über den BMP-Signalweg gezielt die Differenzierung verschiedener Stammzell-Populationen zu beeinflussen wird sich aber auch *in vitro* zu Nutze gemacht. In humanen ES-Zellen beispielsweise wirken sich BMPs gemeinsam mit FGF2 positiv auf die Differenzierung von mesendodermalen Zellen zu kardialen Vorläuferzellen aus und auch murine ES-Zellen differenzieren über BMP-, FGF- und Wnt-Signalkaskaden in hämatopoetisches Mesoderm<sup>[201],[205]</sup>. Zeitgleich sind BMPs aber auch für die Pluripotenzerhaltung muriner ES-Zellen verantwortlich<sup>[206]</sup>. BMPs, die auch zu den Serum-Bestandteilen gehören, aktivieren dabei Transkriptionsfaktoren der Smad-Familie und inhibieren die Differenzierung durch Induktion von *Id*-Faktoren.

BMPs beginnen hierbei die Signalkaskade durch eine Liganden-abhängige Aktivierung von einem Komplex heteromerer Transmembran Ser-Thr Kinase-Rezeptoren Typ I und Typ II. Der aktivierte Typ I-Rezeptor phosphoryliert Smad1 und Smad5, was zu ihrer Abtrennung vom Rezeptor-Komplex führt. Die phosphorylierten Smad1 und Smad5 formen anschließend ein Heterooligomerkomplex mit Smad4 und translozieren in den Nukleus um die Transkription der Target-Gene zu aktivieren<sup>[207],[208]</sup>. Dabei ist der BMP/Smad-Signalweg auch negativ reguliert durch strukturell und funktional unterschiedliche Smad-Proteine der Unterfamilie inhibitorischer Smad, nämlich Smad6 und Smad7.

Aus dieser Signalkaskade leiten sich nun verschiedene Strategien ab den BMP-Signalweg entweder zu aktivieren oder zu inhibieren (Abbildung 18)<sup>[201]</sup>. Die Aktivierung kann dabei zum einen direkt durch endogene bzw. veränderte BMP-Liganden oder durch Expression solcher Liganden durch Gentransfertechniken erfolgen. Zum anderen ist es möglich die endogenen extrazellulären BMP-Antagonisten, wie Noggin oder Chordin, mittels neutralisierender Antikörper oder niedermolekularer Substanzen zu inhibieren, was ebenfalls das BMP-Signal verstärken würde. Des Weiteren bieten die endogenen BMP-Signalweg-Inhibitoren

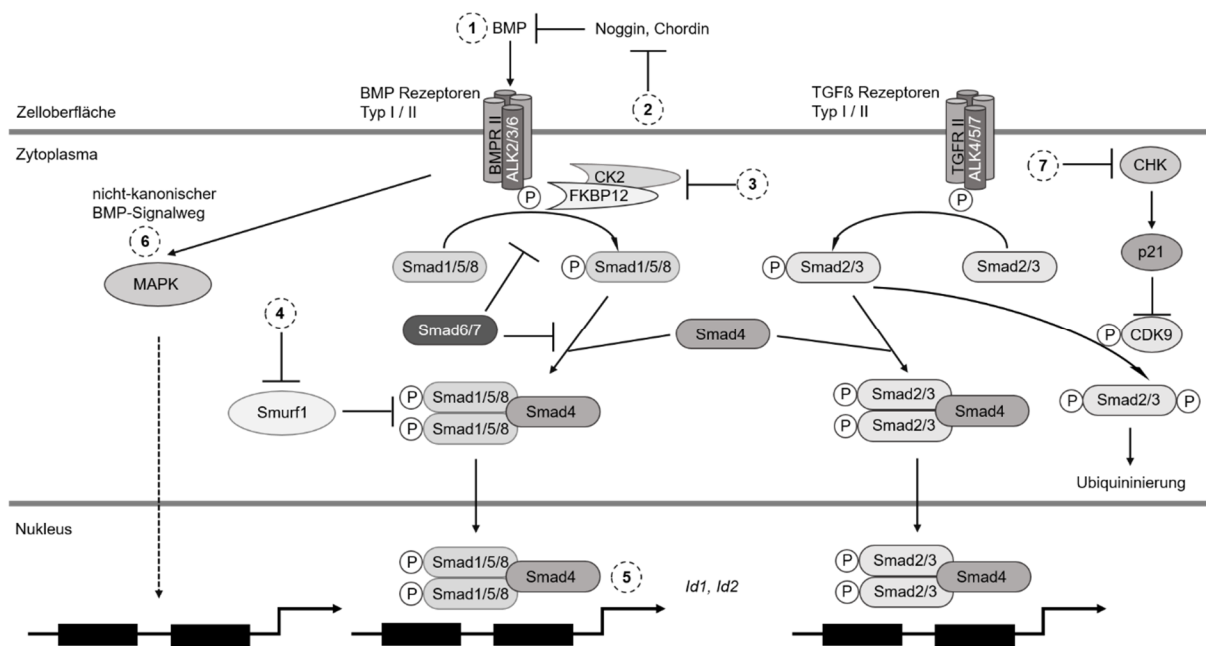
FKBP12 und Casein Kinase 2 die Möglichkeit durch deren Inhibition die BMP-Signalweiterleitung zu erhöhen. Zu diesem Ergebnis führt zudem auch die Inhibition der SMURF1-vermittelten Ubiquitylierung der Smad Effektor-Proteine. Ferner belegen Studien die Möglichkeit mittels anti-miRs die BMP-Signalweg-Aktivität zu verbessern.

In umgekehrter Weise kann die Inhibition des BMP-Signalweges auf extrazellulärer Ebene durch die endogenen Antagonisten Noggin und Chordin erfolgen und dieser Effekt durch rekombinante Proteine oder Expressionssteigerung erhöht werden. Im Zytoplasma bietet die Blockade der BMP-Rezeptor vermittelten Aktivierung der Smad-Effektoren durch Kinase-Inhibitoren zudem ebenso die Möglichkeit der Signalunterbindung wie die Erhöhung der SMURF1-Proteinlevel. Des Weiteren kann auf Transkriptionsebene die Transkription/Translation unterbunden werden, was ebenfalls die Inhibition des BMP-Signalweges zur Folge hat.

Während zum gegenwärtigen Zeitpunkt mehrere niedermolekulare Substanzen identifiziert und optimiert wurden, die den BMP-Signalweg inhibieren, sind bisher keine bekannt, die diesen aktivieren. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* finden deshalb nach wie vor ausschließlich rekombinante BMPs Anwendung, um die Differenzierung verschiedener Stammzellpopulation zu beeinflussen. Jüngste Studien zeigen jedoch Beispiele etablierter Arzneistoffe, die zumindest gemeinsam mit den BMPs synergistisch wirken und so ihre Wirkung verstärken. Mishima *et al.* fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass Lansoprazol, ein Protonenpumpenhemmer, die *Runx2*-Expression erhöht, indem es die Phosphorylierung von p38 MAPK und TAK1 steigert, und so die BMP-vermittelte Osteoblastogenese verstärkt<sup>[209]</sup>. Weitere Beispiele etablierter Arzneistoffe, die die Expression von BMPs und/oder anderer Signalweg-Komponenten und damit die Aktivität steigern, stellen die Statine Lovastatin und Simvastatin<sup>[210],[211]</sup>, der Rho-Kinase-Inhibitor Fasudil<sup>[212],[213]</sup> oder die Phosphodiesterase-Inhibitoren Pentoxifylline, Rolipram und Sildenafil dar<sup>[214]–[216]</sup>. Feng *et al.* zeigten zudem, dass der CHK1-Inhibitor PD407824 synergistisch mit BMP4 die Differenzierung von humanen ES-Zellen ins Mesoderm fördert<sup>[217]</sup>.

In einem Screen konnten Vrijens *et al.* erstmalig niedermolekulare Substanzen identifizieren, die nicht nur synergistisch mit BMPs, sondern auch autark den BMP-Signalweg aktivierten. Die beiden Flavonoide Hydroxychalcon und Isoliquiritigenin induzierten dabei nicht nur die Smad1/5-Phosphorylierung und steigerten dosisabhängig die *Id1/Id2*-Expression, sondern bestätigten ihre BMP-mimetische Wirkung auch durch Ventralisieren von Zebrafisch-Embryonen<sup>[64]</sup>. Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte zudem jüngst „*Ventromorphine*“ als eine neue Klasse niedermolekularer Aktivator des kanonischen BMP-Signalweges<sup>[218]</sup>. Die aufgrund ihres Chemotyps eher unspezifische Wirkung dieser Verbindungen bleibt jedoch der rekombinanten Proteine weit unterlegen, weshalb weitere Anstrengungen unternommen werden müssen BMP-Mimetika oder -Sensibilisatoren zu identifizieren,

die in der Zukunft für die Stammzellendifferenzierung *in vitro* und *in vivo* verwendet werden können.



**Abb. 18:** Möglichkeiten der Aktivierung des BMP-Signalweges. Der BMP-Signalweg kann auf Rezeptorebene über exogene natürliche oder modifizierte BMPs aktiviert werden (1). Zudem kann durch Inhibition der endogenen extrazellulären BMP-Antagonisten wie Noggin und Chordin mittels niedermolekularer Substanzen oder Antikörper die Aktivität des Signalweges gesteigert werden (2). Auf zytosolischer Seite kann die Rezeptor-vermittelte Signalweiterleitung über die Inhibition der endogenen Signalweg-Inhibitoren FKBP12 und CK2 beispielsweise durch Freisetzung von FK506 und CK2.3 gesteigert werden (3). Dieser Effekt kann zudem durch Inhibition der Smurf1-vermittelten Ubiquitinierung des Smad-Effektorproteine erhalten werden (4). Auf Transkriptionsebene kann darüber hinaus die Expression direkt erhöht werden (5). Des Weiteren ist die Aktivierung des nicht-kanonischen Signalweges über p38 MAPK/Erk-Signalkaskaden möglich (6). Durch Inhibition der Checkpoint Kinase 1 (CHK1) und der daraus folgenden p21-Inhibition und CDK9-Aktivierung wird Smad2/3 an der Linker-Region phosphoryliert und ubiquiniert, wodurch mehr Smad4 für Smad1/5/8 zur Verfügung steht (7).

Die bereits oben erwähnte *drug repositioning*-Strategie findet dabei sowohl im akademischen als auch im industriellen Umfeld mittlerweile breite Anwendung. Dieses hat vor allem aus pharmakotherapeutischer Sicht den Vorteil, dass bereits zugelassene Arzneistoffe aufgrund ihres bekannten Wirkprofils in Bezug auf Wirkdosis, unerwünschte Nebenwirkungen und Kontraindikationen schneller in der Klinik eingesetzt werden können. Sowohl Entwicklungskosten als auch das Risiko bei Entwicklungsprozessen wie pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Studien sowie klinischen Studien zu scheitern, lassen sich damit reduzieren<sup>[92]</sup>.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind aber nur zwei rekombinante Proteine, rhBMP7 (Eptotermine- $\alpha$ ) und rhBMP2 (Dibotermine- $\alpha$ ), unter den Handelsnamen InductOS®, InFuse® und OP-1-Implant® bei vorderer Lendenwirbelfusion und Röhrenknochenfraktur von der FDA zugelassen, wobei mehrere Studien einen Nutzen auch bei weiteren orthopädischen und dentalen Anwendungen belegen. Ein Nachteil dieser rekombinanten Proteine ist dabei nicht nur ihre aufwendige und teure Herstellung, sondern auch die hohen Therapiekosten, da große Proteinmengen für eine therapeutische Wirkung eingesetzt werden müssen. Dieses führt jedoch auch

häufig zu lokalen und systemischen Problemen. Eine Herausforderung für die Zukunft stellen in diesem Zusammenhang also auch optimierte Freilassungssysteme dar, die die biologische Aktivität der Proteine steuern und das Risiko systemischer Diffusion vermeiden<sup>[219]</sup>.

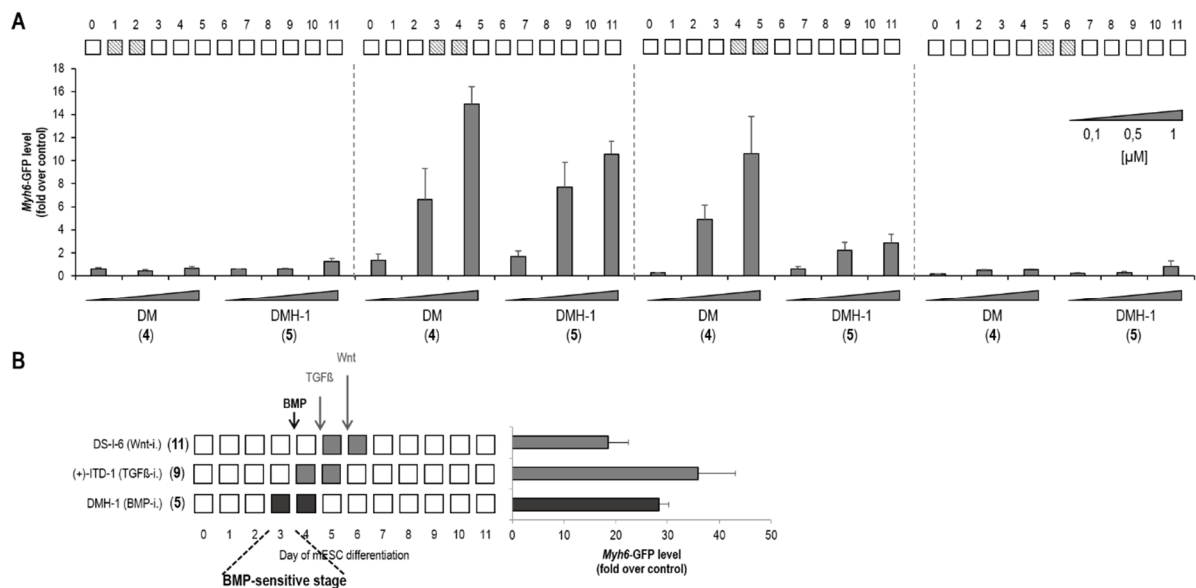
Es ist folglich also nicht nur im Sinne einer kostengünstigen, chemisch-definierten und damit reproduzierbaren Stammzellkultivierung *in vitro* von besonderem Interesse Substanzen zu identifizieren, die BMP-mimetisch und/oder -synergistisch wirken, sondern vor allem im Sinne einer effizienten, wirksamen und unbedenklichen Pharmakotherapie *in vivo*. Dabei ist es aber von grundlegender Bedeutung genaue Kenntnis von den in der Osteogenese involvierten Signalwegen zu haben, sowie von der Rolle alternativer Signalwege wie beispielsweise dem MAPK-Signalweg und dem *crossstalk* von Bestandteilen unterschiedlicher Signalwege. Bei all dem bietet die Stammzellforschung einen wichtigen und entscheidenden Beitrag.

Für die gerichtete Differenzierung von pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten ist in der prä-mesodermalen Phase der Differenzierung die Aktivierung und in der post-mesodermalen Phase die Inhibierung des BMP-Signalweges von entscheidender Bedeutung<sup>[17]</sup>. Damit kommt diesem Signalweg eine biphasische Rolle in der kardialen Entwicklung zu wie sie bereits für den Wnt-Signalweg beschrieben ist<sup>[38],[220]</sup>. Während in diesem Zusammenhang die Mesoderm-Bildung durch Aktivierung des Wnt-Signalweges mittels niedermolekularer Substanzen wie dem GSK3 $\beta$ -Inhibitor CHIR99021 effizient gesteigert werden kann, stehen für die Aktivierung des BMP-Signalweges momentan lediglich die rekombinanten Proteine BMP2 und BMP4 zur Verfügung. Rekombinante Proteine weisen jedoch gegenüber niedermolekularen Substanzen den Nachteil auf, dass sie biologischen und damit qualitativen Schwankungen unterliegen sowie teurer sind<sup>[17]</sup>. Dementsprechend wäre es von großem Interesse zusätzlich zu den etablierten BMP-Inhibitoren wie **4** und **5** auch niedermolekulare BMP-Aktivatoren zu identifizieren, die für eine chemisch-definierte und kosteneffiziente Differenzierung zu Stammzell-abgeleiteten Kardiomyozyten angewendet werden können. Damit ergäben sich zudem nicht nur zellbasierte *in vitro*-Anwendungen, sondern auch interessante therapeutische Anwendungen *in vivo*<sup>[217]</sup>.

Da der hier verwendete Differenzierungsassay mit murinen ES-Zellen durch sein 384-Well-Format sowie seiner automatischen Bild-Analyse bereits zu einem robusten *High-Throughput-Screening-Assay* optimiert werden konnte, sollte in Folge dessen untersucht werden, ob mit seiner Hilfe BMP-mimetisch wirksame Substanzen identifiziert werden konnten. Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits beschrieben wurde, dienten dabei zunächst verschiedene Wachstumsfaktoren und selektive Inhibitoren dazu die kardiale Differenzierung der Zellen in diesem Assay zu charakterisieren und die zeitliche Abhängigkeit der Kardiogenese von den einzelnen Signalwegen, insbesondere des BMP-Signalweges, zu erfassen.



Auch wenn die Literatur auf die Bedeutung des BMP-Signalweges für die Mesoderm-Induktion im Rahmen einer kardialen Differenzierung verweist, steht dieser hierbei nicht losgelöst von anderen wichtigen entwicklungsbiologischen Signalwegen. Durch diese Komplexität ist es schwierig, den BMP-Signalweg separat zu betrachten, zumal sein Einfluss auf die Mesoderm-Induktion zumindest in dem hier verwendeten mESC-Differenzierungsassay weniger stark ausgeprägt zu sein scheint. In dem vorliegenden Fall konnte die Mesoderm-Bildung hingegen insbesondere durch den Wachstumsfaktor Activin A sowie Inhibitoren der p38 $\alpha$  MAP-Kinase wie **2** und **3** gefördert werden, weshalb ein Screen zur Identifizierung von Aktivatoren des BMP-Signalweges in der frühen prä-mesodermalen Phase dieses Assays von Tag 0 bis Tag 2 weniger erfolgsversprechend schien, da weder eine Selektivität noch eine Sensitivität für diesen Signalweg vorlag.



**Abb. 19:** Bestimmung der Phase höchster BMP-Sensitivität in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den oben angegebenen Zeiträumen mit den oben angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren Dorsomorphin (DM, **4**) und Dorsomorphin Homolog-1 (DMH-1, **5**) behandelt (**A**). Vergleichend dazu wurden die Zellen mit Inhibitoren des TGF $\beta$ - ((+)-ITD-1 (**9**)) und des Wnt- Signalweges (DS-I-6 (**11**)) behandelt (**B**). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

In der post-mesodermalen Phase der Differenzierung ist die Inhibition des BMP-Signalweges für die kardiale Entwicklung der murinen ES-Zellen von großer Bedeutung und konnte in dem hier verwendeten Assay mittels der BMP-Inhibitoren **4** und **5** zeitlich gut erfasst werden (Abbildung 19, A). Im Vergleich mit weiteren unterschiedlich selektiven Signalweg-Inhibitoren zeigte sich zudem, dass die hier für die Kardiogenese bedeutsamsten Signalwege BMP, TGF $\beta$  und Wnt zeitlich gut voneinander abzutrennen waren, wobei einzelne zeitliche Überschneidungen nie ganz ausgeschlossen werden können (Abbildung 19, B). Ein gutes Beispiel hierfür bildeten die beiden getesteten BMP-Inhibitoren **4** und **5**. Das selektivere Wirkprofil der optimierten Verbindung **5** erlaubte es in diesem Zusammenhang die tragende Rolle

der BMP-Inhibition zwischen Tag 3 und Tag 5 kenntlich zu machen, während die zusätzliche inhibitorische Wirkung von **4** auf den TGF $\beta$ -Signalweg auch zu einer kardiogenen Aktivität zwischen Tag 4 und Tag 6 führte, einem Zeitfenster, in dem die getesteten TGF $\beta$ -Inhibitoren die höchste Kardiogenese erzielten. Damit konnte für diesen Differenzierungsassay mit murinen ES-Zellen erstmalig die Bedeutung der einzelnen Signalwege für die Kardiogenese in Abhängigkeit von dem zeitlichen Verlauf der Differenzierung herausgearbeitet werden und darüber hinaus eine Selektivität einer BMP-sensitiven Phase zwischen Tag 3 und Tag 5 der Differenzierung, die eine separate Untersuchung dieses Signalweges ermöglichte.

Um anschließend diesen Kardiogenese-Assay mit murinen ES-Zellen für einen Screening-basierten Ansatz zur Identifizierung BMP-mimetisch wirksamer Substanzen zu verwenden, musste dieser so gestaltet werden, dass eine BMP-selektive Inhibition durch ein putatives Mimetikum des BMP-Signalwegs funktional antagonisiert wird. Die quantitative Auswertung dieses Effekts kann dann in der etablierten Bild-basierten Erfassung der Kardiogenese an Tag 11 erfolgen, wobei nun die Hemmung der Kardiogenese verfolgt wird.

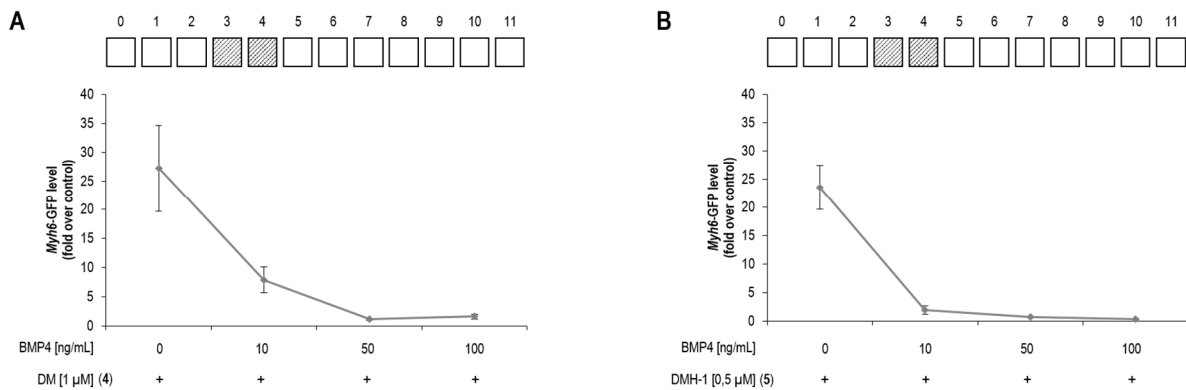
## 4.2. Optimierung des mESC-basierten *HT*-Assays

### 4.2.1. Optimierung mechanistischer Aspekte

Um das Prinzip der Antagonisierung eines durch BMP-Inhibition induzierten kardiogenen Effektes zu verifizieren, sollte durch die bekannten BMP-Inhibitoren **4** und **5** die Kardiogenese induziert und diese durch zeitgleiche Zugabe des rekombinanten Proteins BMP4 inhibiert werden. Dabei zeigte sich, dass die kardiogene Aktivität, die durch Inhibierung des BMP-Signalweges durch **4** und **5** erhalten wurde, mit BMP4 dosisabhängig antagonisiert werden konnte (Abbildung 20, A/B). Dass hierbei die **4**-induzierte Kardiogenese bei 50 ng/mL und die **5**-induzierte Kardiogenese bereits bei 10 ng/mL BMP4 vollständig inhibiert werden konnte, ist wiederum auf den kardiogenen Einfluss der TGF $\beta$ -Inhibition von **4** zurückzuführen. Da **5** gegenüber **4** ein selektiveres Wirkprofil aufweist, wurde in der Folge ausschließlich **5** verwendet, um die Kardiogenese durch BMP-Inhibition zu generieren. Dabei erwies sich eine Konzentration von 0,5  $\mu$ M als geeignet, um zuverlässig eine starke kardiogene Aktivität und damit einen hohen dynamischen Bereich zu erzeugen. Zudem gewährleistete eine submikromolare Inhibitor-Konzentration eine Minimierung weiterer zellulärer *off-targets*.

Im Zuge der Optimierung des bestehenden mESC-basierten *HT*-Assays für die Identifizierung BMP-mimetischer Verbindungen wurde auch die Auswahl des im Kultivierungsmedium verwendeten FBS berücksichtigt. Wie bereits in Kap. 3.2. beschrieben wurde, ist FBS für die Kultivierung der Zellen essentiell, hält jedoch den Nachteil parat, dass seine Bestandteile wie Wachstumsfaktoren und Zytokine entscheidenden Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen nehmen und je nach

adressierter Fragestellung die entsprechenden Assays stören können. Herrera *et al.* fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass der im FBS enthaltene Anteil von BMP4 bei 3 bis 5 ng/mL und der von BMP6 sogar bei 2,75 bis 8 ng/mL liegt<sup>[221]</sup>, weshalb Anstrengungen unternommen wurden, mittels Testung verschiedener FBS-Chargen verschiedener Anbieter ein Produkt zu identifizieren, in dem die Konzentration an BMP vergleichsweise gering war und die Störanfälligkeit für eine BMP-vermittelte Kardiogenese sowie dessen Antagonisierung weniger ausgeprägt war.

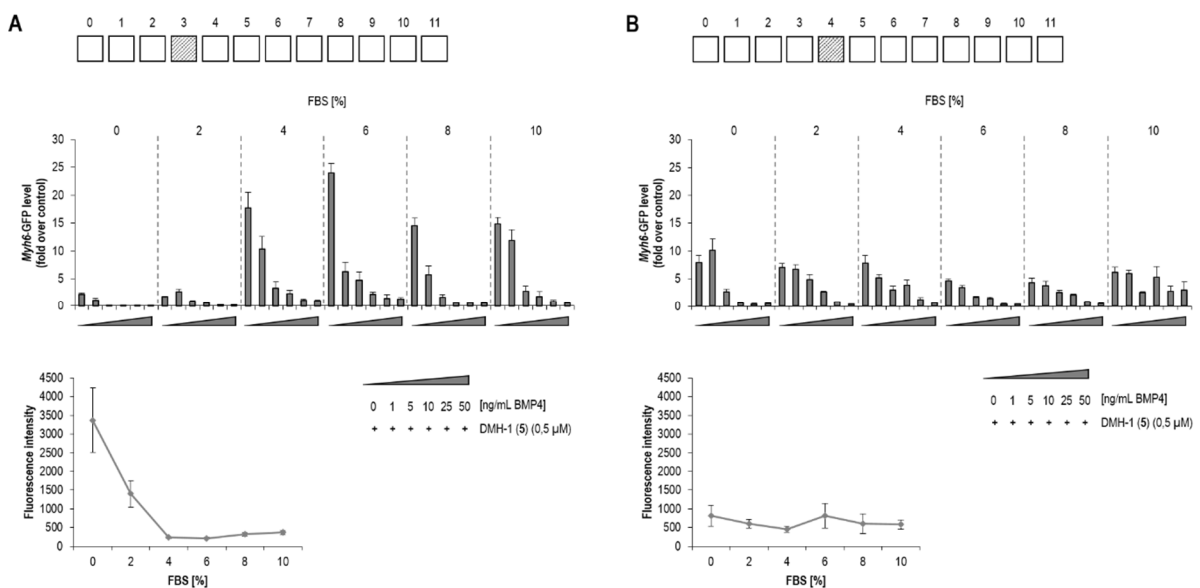


**Abb. 20:** Bestimmung der dosisabhängigen Antagonisierung der durch BMP4-induzierten Kardiogenese mit Hilfe des rekombinanten Proteins BMP4. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in dem oben angegebenen Zeitraum mit den BMP-Inhibitoren Dorsomorphin (4) (A) und DMH-1 (5) (B) in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt. Zeitgleich wurden die oben angegebenen Konzentrationen BMP4 hinzugegeben. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Aus demselben Grund sollte nach Identifizierung einer passenden FBS-Charge auch untersucht werden, ob die FBS-Konzentration, die während der Substanzbehandlung verwendet wurde, auf ein Maß reduziert werden konnte, die zum einen hoch genug war, um die Viabilität der Zellen nicht zu beeinträchtigen, zum anderen aber niedrig genug war, um bioaktive Konzentrationen an BMP zu vermeiden und möglichst wenig mit dem untersuchten BMP-Signalweg in Wechselwirkung zu treten. Zudem sollte durch eine geringe FBS-Konzentration die Beeinflussung der biologischen Aktivität der niedermolekularen Substanzen durch die Serumproteine minimiert werden. Zeitgleich war von Interesse, ob das Zeitfenster zur Untersuchung des BMP-Signalweges von 48 h auf 24 h reduziert werden konnte. So wurden in verschiedenen Zeiträumen (D3-D4, D4-D5) unterschiedliche Konzentrationen an FBS (0, 2, 4, 6, 8 und 10 %) verwendet, um die Auswirkung auf die durch 5-induzierte Kardiogenese bei zeitgleicher dosisabhängiger Antagonisierung durch BMP4 zu untersuchen (Abbildung 21, A/B).

Dabei konnte in allen Fällen der dosisabhängige antagonisierende Effekt durch BMP4 erhalten werden, wobei die durch 5-induzierte kardiogene Aktivität zwischen Tag 3 und Tag 4 signifikant höher war als zwischen Tag 4 und Tag 5. Während in letzterem

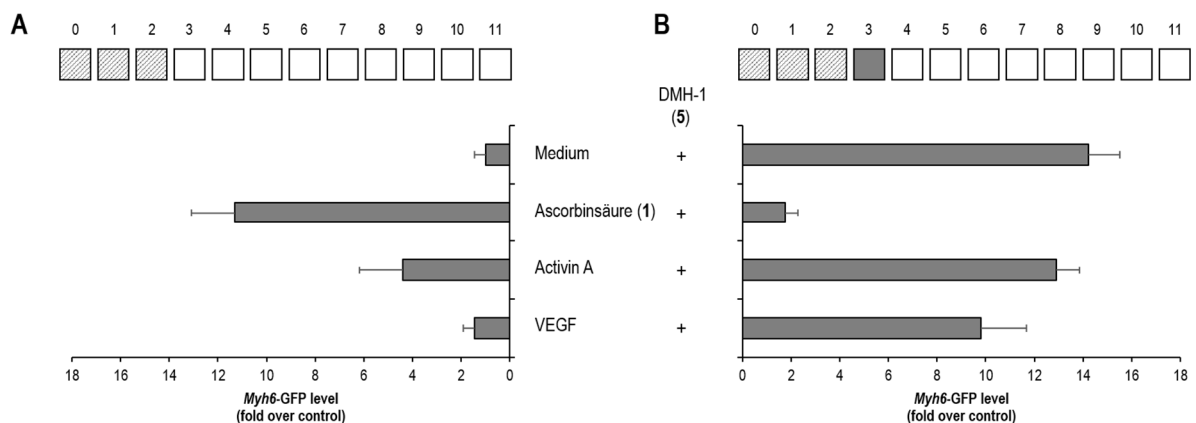
Zeitfenster zudem kaum ein Einfluss der unterschiedlichen FBS-Konzentrationen auf die Kardiogenese zu beobachten war (Abbildung 21, B), war bei der Substanzbehandlung zwischen Tag 3 und Tag 4 die Aktivität bei 4 % und 6 % FBS am stärksten ausgeprägt (Abbildung 21, A). Interessant war in diesem Zusammenhang auch der Einfluss der FBS-Konzentration auf die DMSO-Kontrolle, welche bei geringen FBS-Konzentrationen (0 bis 2 %) stärker kardiogen war als bei höheren FBS-Konzentrationen (4 bis 10 %). Dieses hatte zur Folge, dass die *fold-over-control*-Werte im Falle von 0 bzw. 2 % eingesetztem FBS dementsprechend geringer ausfielen. Zudem wirkte sich eine serumfreie Behandlung (0 % FBS) negativ auf die Zellviabilität aus, sodass folglich auch die Kardiogenese eingeschränkt war. Dieses ließ sich im Vergleich der durch die DAPI-Färbung erfolgten Zellkernzählung, aus der die Viabilität bewertet werden konnte, und der anhand der Reporter-Aktivität abgelesenen Kardiogenese feststellen.



**Abb. 21:** Bestimmung der Serumabhängigkeit des antagonistischen Effektes von BMP4 auf die DMH-1(5)-induzierte Kardiogenese in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und entweder von Tag 3 bis Tag 4 (**A**) oder von Tag 4 bis Tag 5 (**B**) bei verschiedenen Serumkonzentrationen mit BMP4 in den oben angegebenen Konzentrationen bei zeitgleicher BMP-Inhibition durch DMH-1 (5) (0,5  $\mu$ M) behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Da die 5-induzierte Kardiogenese von Experiment zu Experiment teilweise stark schwankte (10 bis 35-fach über Kontrolle), wurde ein Versuch unternommen, den dynamischen Bereich durch gerichtete Differenzierung und Mesoderm-Induktion permanent zu erhöhen. Dieses sollte geschehen, um in einem zukünftigen Screen die Untersuchung BMP-mimetischer Substanzen durchführen zu können, wofür ein ausreichend großer dynamischer Bereich essentiell war. Für die Mesoderm-Induktion sollte hierbei auf einige der bereits vorgestellten Substanzen und Faktoren zurückgegriffen werden, die in der frühen Phase der Differenzierung die gezielte kardiogene Differenzierung der Zellen förderten.

So wurden die Zellen zu Beginn der Differenzierung (D0-D3) bis zu der Phase höchster BMP-Sensitivität (D3-D4) entweder mit den Wachstumsfaktoren VEGF oder Activin A oder der unspezifischen kardiogenen Substanz **1** (Ascorbinsäure) behandelt, um die Mesoderm-Bildung zu fördern. Vergleichend dazu wurden die Zellen wie bisher ohne Stimulation differenziert (Kontrolle). Anschließend folgte von Tag 3 bis Tag 4 in gewohnter Weise die BMP-Inhibition durch **5**. Hierbei war zu beobachten, dass die Mesoderm-Induktion durch Activin A und **1** zwar gefördert und die Kardiogenese gesteigert werden konnte, aber da durch die Substanzbehandlung auch die zum späteren Zeitpunkt kontrollbehandelten Zellen stimuliert wurden, wurde das Verhältnis Kontrolle-Probe zu Ungunsten der Probe verschoben, sodass der dynamische Bereich sogar sank (Abbildung 22, A/B). Dieses war vor allem bei der **1**-induzierten Kardiogenese der Fall. Dass hierbei kein synergistischer Effekt der kardiogen wirksamen Mechanismen der Mesoderm-Induktion und post-mesodermalen BMP-Inhibition erkennbar war, könnte womöglich darin begründet liegen, dass durch die initiale Behandlung mit **1** ein Subtyp mesodermaler Zellen erhalten wird, der sich von dem unterscheidet, der sich ohne vorherige Substanzbehandlung ergibt, und eine geringere Sensitivität für den BMP-Signalweg aufweist. Zudem wäre es möglich, dass eine stimulierte Mesoderm-Induktion die nachfolgende Differenzierung zeitlich in der Weise beeinflusst, dass eine BMP-Inhibition von Tag 3 bis Tag 4 nicht (mehr) der Phase höchster BMP-Sensitivität entspricht.



**Abb. 22:** Bestimmung des Einflusses einer Stimulation der Mesoderm-Bildung auf den dynamischen Bereich des Assays. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in den ersten drei Tagen nach der Aussaat entweder in der Mesoderm-Bildung unterstützt (Ascorbinsäure (**1**), VEGF, Activin A) oder nicht (Medium) (**A**). Zusätzlich wurden die Zellen mit DMH-1 (**5**) (0,5  $\mu$ M) behandelt, wobei während dieser Exposition die FBS-Konzentration 6 % betrug (**B**). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte (A=Medium, B=DMSO) aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Auch wenn die Mesoderm-Induktion also erfolgreich gefördert wurde und mehr Kardiomyozyten generiert werden konnten, galt dieses jeweils auch für die kontrollbehandelten Zellen, weshalb der dynamische Bereich nicht gesteigert werden konnte. Im Vergleich dazu war bei einem Verzicht auf eine zusätzliche Mesoderm-Induktion nach bisherigem Vorbild der dynamische Bereich am höchsten (Abbildung 22, B). Folglich war es sinnvoll auf eine zusätzliche Substanzbehandlung zur

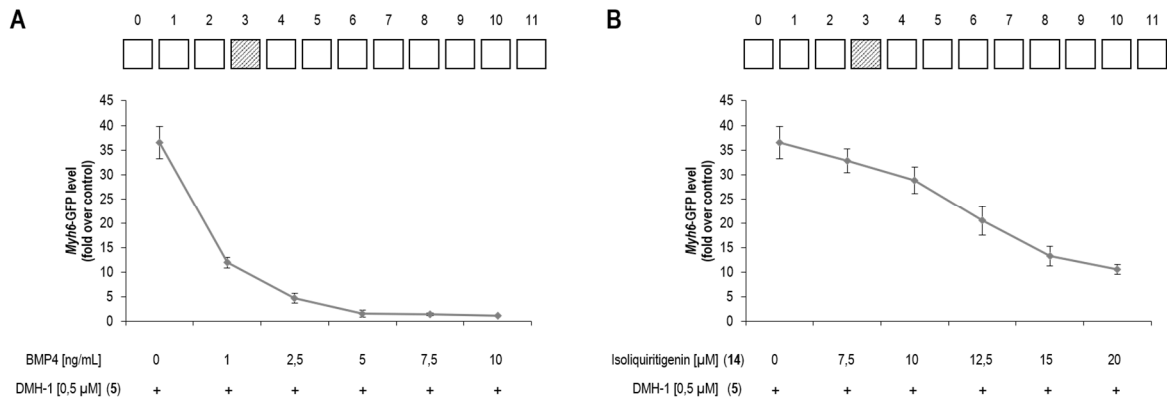
Steigerung der Mesoderm-Bildung von Tag 0 bis Tag 3 zu verzichten, da dadurch zum einen der dynamische Bereich nicht gesteigert werden konnte, und zum anderen der Assay kosteneffizient und einfach in der Durchführung blieb.

Zusammenfassend gingen aus den oben genannten Optimierungsexperimenten also die Assay-Parameter für die FBS-Konzentration (6 %), den Expositionszeitraum (D3-D4), sowie die BMP-Inhibition (**5**, 0,5  $\mu\text{M}$ ) ohne vorherige Mesoderm-Induktion hervor.

Nachdem die Assay-Bedingungen optimiert und die Möglichkeit der Antagonisierung der Kardiogenese bewiesen waren, sollte untersucht werden, ob der antagonisierende Effekt auch mittels niedermolekularer Substanzen anstelle des rekombinanten Proteins BMP4 erzielt werden konnte. Dabei sind bisher kaum Substanzen beschrieben, die BMP-mimetisch wirksam sind. Lediglich Vrijens *et al.* identifizierten in einem Screen mit einer BMP-sensitiven Zelllinie eine Stoffklasse, die den BMP-Signalweg aktivieren konnte. Nach verschiedenen Validierungsexperimenten u.a. im Zebrafisch-Modell wurden mit 4'-Hydroxychalcon und Isoliquiritigenin (**14**) in der Folge zwei Flavonoide identifiziert, die die Smad1/5-Phosphorylierung und damit die Aktivierung des BMP-Signalweges förderten<sup>[64]</sup>. Darüber hinaus identifizierten jüngste Arbeiten von Feng *et al.* den CHK1-Inhibitor PD407824 als *BMP-Sensitizer* für die Differenzierung humaner ES-Zellen, dessen Wirkmechanismus in einer Senkung der Smad2/3-Level und damit einer Erhöhung der Smad1-Level begründet liegt<sup>[217]</sup>.

In dem optimierten Assay wurde daraufhin untersucht, ob **14** vergleichbar dem rekombinanten Protein die durch **5**-induzierte Kardiogenese dosisabhängig antagonisieren konnte. Hierzu wurde **14** über 24 h (D3-D4) in verschiedenen Konzentrationen (0, 7,5, 10, 12,5, 15 und 20  $\mu\text{M}$ ) auf die Zellen gegeben, bei zeitgleicher Exposition von **5** (0,5  $\mu\text{M}$ ). Es zeigte sich ein dosisabhängiger antagonisierender Effekt von **14**, der die Kardiogenese um 70 % senken konnte, wobei sich die Inhibitionskinetik jedoch von der parallel getesteten Positivkontrolle (BMP4) unterschied (Abbildung 23, A/B). Eine vollständige Inhibierung der Kardiogenese durch **14** war im Gegensatz zur Positivkontrolle hierbei auch bei Konzentrationen bis 50  $\mu\text{M}$  nicht möglich. Vielmehr lag dabei die Abnahme der Reporteraktivität in der erhaltenen Toxizität begründet.

Dass **14** die Kardiogenese dabei nicht in dem Maße effizient antagonisieren konnte, lässt sich auf einen eher unspezifischen Mechanismus der BMP-Antagonisierung sowie einer zugrunde liegenden Polypharmakologie zurückführen, bei der mehrere *off-targets* wahrscheinlich sind. Es konnte jedoch damit gezeigt werden, dass es prinzipiell möglich ist mit niedermolekularen Substanzen diesen Effekt zu erzielen und folglich diesen Assay für einen Screening-basierten Ansatz zur Identifizierung von BMP-Mimetika zu verwenden.



**Abb. 23:** Bestimmung der dosisabhängigen Antagonisierung der durch BMP-Inhibition induzierten Kardiogenese mit Hilfe des rekombinanten Proteins BMP4 und des Flavonoids Isoliquiritigenin (**14**). Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und in dem oben angegebenen Zeitraum mit dem BMP-Inhibitor DMH-1 (**5**) (0,5 μM) behandelt. Zeitgleich wurden entweder die oben angegebenen Konzentrationen BMP4 (**A**) oder Isoliquiritigenin (**14**) (**B**) hinzugegeben, wobei während dieser Exposition die FBS-Konzentration 6 % betrug. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

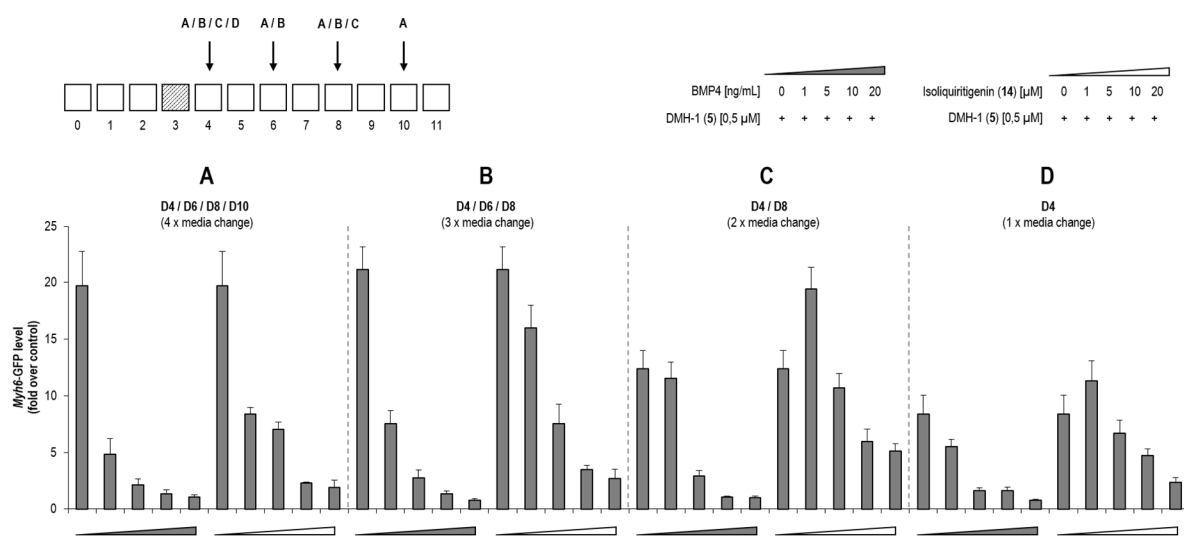
#### 4.2.2. Optimierung HT-relevanter technischer Aspekte

Da das Screenen mehrere tausend Substanzen umfassender Bibliotheken manuell nicht durchführbar ist, stellte eine weitere Herausforderung der Transfer des optimierten Assays auf die Laborrobotik dar. In diesem Zusammenhang galt es als erstrebenswert die Arbeitsschritte zu minimieren und auf ein arbeitnehmerfreundliches Maß an technischer wie zeitlicher Anforderung zu reduzieren. Dieses beinhaltete vor allem die Häufigkeit des Mediumwechsels, da hierbei zum einen die Gefahr der Kontamination unter nicht-aseptischen Bedingungen bestand und zum anderen bei einem elftägigen Differenzierungsassay arbeitnehmerfreundliche zeitliche Inanspruchnahme gewährleistet werden sollte.

So stellte bereits das Volumen, in dem die Zellen an Tag 0 mit Hilfe eines Dispensiergerätes (Multidrop<sup>TM</sup>) ausgesät wurden, einen kritischen Parameter dar, da dieses zum Zeitpunkt der Substanzapplikation via Ultraschall (Echo-System) an Tag 3 nur 25 μL pro Well betragen durfte, damit die Assayplatte über Kopf gedreht und substanzbehandelt werden konnte. Da es aus oben genannten Gründen wenig attraktiv schien das normalerweise verwendete Aussaatvolumen von 50 μL an Tag 3 vor diesem Arbeitsschritt zu aspirieren, sollte zunächst untersucht werden, ob eine Reduktion des Aussaatvolumens von 50 auf 25 μL pro Well das Wachstumsverhalten der Zellen und damit die Kardiogenese beeinträchtigte. Es konnte gezeigt werden, dass unter beiden Bedingungen vergleichbare Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Nachdem für den Tag 3 ein Aspirationsschritt eingespart werden konnte und an diesem Tag lediglich zu dem bestehenden Volumen von 25  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{L}$  pro Well additiv hinzugegeben werden mussten, sollte untersucht werden, ob sich für den weiteren Differenzierungszeitraum bis Tag 11 noch weitere Aspirationsschritte und Mediumwechsel einsparen ließen zum Vorteil einer einfacheren Durchführbarkeit des Assays bei gleichbleibendem Differenzierungsverhalten der Zellen. So wurde in einem Vergleichsexperiment an Tag 0 zunächst in allen Fällen dieselbe Zellkonzentration ausgesät, an Tag 3 die Zellen identisch behandelt und an Tag 4 nach 24-stündiger Inkubation das Medium gewechselt. Anschließend sollte das Medium entweder noch drei-, zwei-, ein- oder keinmal gewechselt werden (Abbildung 24, A-D).

Dabei zeigte sich, dass bei einem vollständigen Verzicht auf einen Mediumwechsel zwischen Tag 4 und Tag 11 zwar eine kardiogene Aktivität zu beobachten war, diese im Vergleich zu den anderen Bedingungen mit ein- bis mehrmaligem Mediumwechsel jedoch signifikant geringer ausfiel (Abbildung 24, D). Zeitgleich konnten bei mehrmaligem Mediumwechsel vergleichbare Werte für Zellviabilität und kardiogene Aktivität erhalten werden (Abbildung 24, A-C). Aus Gründen der praktischen Anwendbarkeit wurde entschieden für die geplanten Screens nach dem Mediumwechsel an Tag 4 nur einen weiteren an Tag 8 einzuplanen, da dadurch zum einen die Gefahr einer Kontamination minimiert und das durchführende technische Personal nicht zusätzlich zeitlich beansprucht wurde.

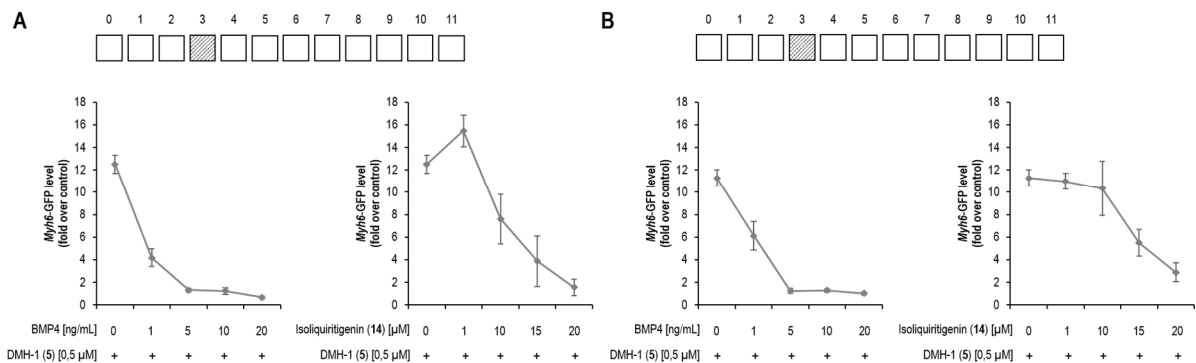


**Abb. 24:** Bestimmung des Einflusses der Häufigkeit des Mediumwechsels auf die kardiale Differenzierung der murinen ES-Zellen. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und von Tag 3 bis Tag 4 bei einem FBS-Gehalt von 6 % sowohl mit DMH-1 (5) (0,5  $\mu\text{M}$ ) als auch den oben angegebenen Konzentrationen an BMP4 oder Isoliquritigenin (14) behandelt. Das Medium wurde nach Tag 4 entweder noch dreimal (A), zweimal (B), einmal (C) oder keinmal (D) gewechselt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Nachdem der Assay für die Screening-Anwendung optimiert wurde, sollte der Beweis erbracht werden, dass die zuvor manuell durchgeführten Arbeitsschritte unter



Verwendung der Laborrobotik reproduzierbar waren und zu denselben Ergebnissen führten. Hierzu wurde sich im Vorfeld vor allem mit der technischen Feineinstellung der Geräte beschäftigt, wie beispielsweise der Dispensiergeschwindigkeit des Multidrop™-Gerätes und der räumlichen Ausrichtung (x-/y-/z-Achse) der Nadeln des Aspirationsroboters sowie deren Aspirationsgeschwindigkeit (Daten nicht gezeigt). Abbildung 25 zeigt dabei den Vergleich der manuellen und technischen Handhabung des Assays, wobei die Unterschiede gering sind, womit der Transfer des Assays auf die Laborrobotik als gelungen angesehen werden kann und das *proof-of-concept* als erfüllt (Abbildung 25, A/B).



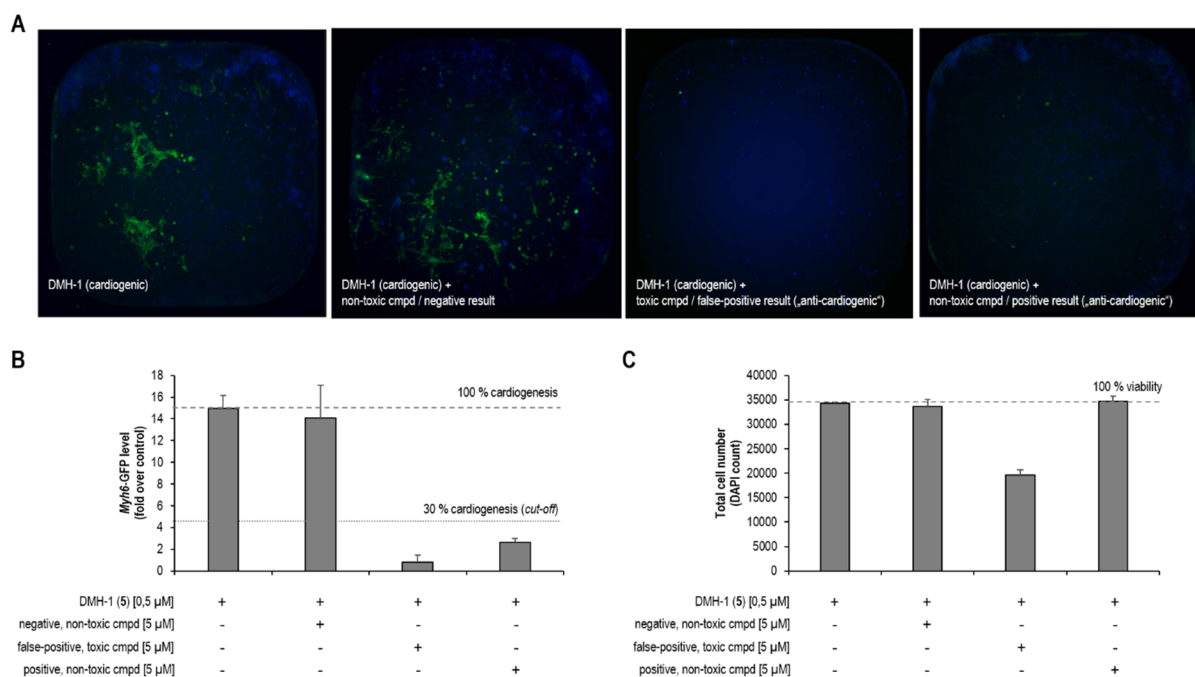
**Abb. 25:** Vergleich zwischen manueller Durchführung des Assays und der unter Zuhilfenahme der Laborrobotik. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und von Tag 3 bis Tag 4 bei einem FBS-Gehalt von 6 % sowohl mit DMH-1 (**5**) (0,5 µM) als auch den oben angegebenen Konzentrationen an BMP4 oder Isoliquiritigenin (**14**) behandelt. Nachdem das Medium an Tag 4 gewechselt worden war, erfolgte an Tag 8 noch ein weiterer Mediumwechsel. Die Durchführung des Assays wurde dabei sowohl manuell (**A**) als auch mit Hilfe der Robotik (**B**) durchgeführt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignals) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

### 4.3. Pilotscreen mit einer Bibliothek etablierter Arzneistoffe (LOPAC-Screen)

#### 4.3.1. Durchführung des Pilotscreens

Die erste Substanzbibliothek, die nachfolgend für einen Screen in diesem Assay ausgewählt wurde, bestand aus 1408 Substanzen, welche fast ausschließlich bekannte Arzneistoffe darstellten. Diese wurden an Tag 3 in einer Konzentration von 5 µM via Ultraschall (*Echo-Shooting*) auf die Zellen gegeben und anschließend das Medium mit 50 µL (4 % FBS) von 25 µL (10 % FBS) auf final 75 µL (6 % FBS) pro Well aufgefüllt. Das Medium, das nach der Substanzapplikation hinzugegeben wurde, beinhaltete dabei den BMP-Inhibitor **5** in einer Konzentration von 0,75 µM, sodass durch den Verdünnungsfaktor final 0,5 µM enthalten waren, die die Kardiogenese gewährleisten sollten. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt. Es folgte ein weiterer Mediumwechsel an Tag 8, bevor die Zellen an Tag 11 des Assays schließlich fixiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Die Identifizierung BMP-mimetisch wirksamer Substanzen sollte anschließend mit Hilfe der automatischen Bild-Analyse erfolgen, wobei in diesem Fall die Hemmung der durch **5**

induzierten Kardiogenese erfasst wurde. Hierbei sollten Substanzen, die die Kardiogenese um mindestens 70 % inhibierten (*cut-off*  $\leq 30$  %), als Hits für weitere Validierungsexperimente ausgewählt werden. Die Inhibierung der **5**-induzierten Kardiogenese und damit die Reduzierung der Reporteraktivität/-fluoreszenz konnte dabei jedoch nicht nur in einem BMP-mimetischen oder -synergistischen Wirkmechanismus der getesteten Substanzen begründet liegen, sondern u.a. auch in deren Toxizität (Abbildung 26, A). Auf Grund dessen wurde für eine Bewertung der verminderten Kardiogenese im Rahmen der automatischen Bild-Analyse nicht nur die Kardiogenese anhand der GFP-Fluoreszenz untersucht (Abbildung 26, B), sondern auch die Zellviabilität anhand der DAPI-gefärbten Zellkerne (Abbildung 26, C), um so falsch-positive Hits aus dem weiteren Validierungsprozedere auszuschließen.



**Abb. 26:** Bestimmung falsch-positiver Screening-Hits mit Hilfe der automatischen Bild-Analyse. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und von Tag 3 bis Tag 4 bei einem 6 %igen FBS-Gehalt mit verschiedenen Substanzen einer Substanzbibliothek (5  $\mu$ M) bei zeitgleicher BMP-Inhibition durch DMH-1 (**5**) (0,5  $\mu$ M) behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) (**A**) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen (**B**). Die Gesamtzellzahl wurde zudem anhand der DAPI-gefärbten Zellkerne ermittelt (**C**). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

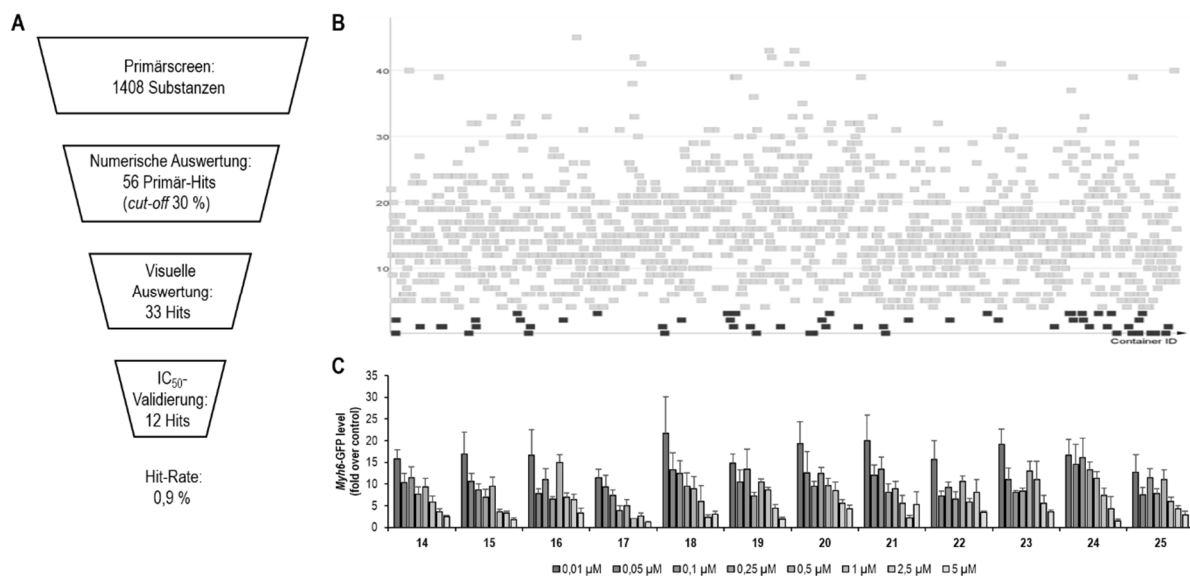
Die Auswertung des LOPAC-Screens offenbarte jedoch, dass die Kontrollen (DMSO und **5**) nicht wie gewohnt für die relative Quantifizierung der Kardiogenese verwendet werden konnten. Ursächlich hierfür war womöglich eine kontaminierte DMSO-Charge auf der Platte mit den Stocklösungen der Substanzbibliothek (*source plate*), die via Ultraschall auf die Assayplatten transferiert wurde. Davon ausgehend, dass von allen getesteten Substanzen nur ein geringer Anteil die **5**-induzierte Kardiogenese signifikant beeinflusste, sollte die Quantifizierung der kardiogenen Aktivität der jeweiligen Substanz nun relativ zu dem durchschnittlichen Wert von allen Substanzen erfolgen. Der für alle Substanzen erhaltene Mittelwert an kardiogener Aktivität wurde in diesem Fall also gleichbedeutend der **5**-induzierten Kardiogenese als 100%-Wert

gesetzt. Als Hits wurden in der Folge diejenigen Substanzen definiert und für weitere Validierungsexperimente ausgewählt, die diese gemittelte Kardiogenese um mindestens 70 % inhibierten (*cut-off*  $\leq 30$  %) (Abbildung 27, A/B). Nach visueller Kontrolle wurden dabei 33 Substanzen ausgewählt, deren antagonistische Wirkung mit Hilfe der  $IC_{50}$ -Bestimmung validiert werden sollte. Dabei ließen sich zwölf Substanzen identifizieren, die eine gute Dosis-Wirkungsbeziehung aufwiesen (Abbildung 27, C). Dass die Verwendung des Mittelwertes sich nicht verfälschend auf die Auswertung auswirkte, belegten die Ergebnisse der  $IC_{50}$ -Bestimmung der ausgewählten Hits. In diesem Setup zeigten die Kontrollen ihr gewohntes Bild und gaben Werte an, die mit denen aus der „improvisierten“ Auswertung in Einklang standen.

Die validierten Hits sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Bei Betrachtung der Wirkprofile fällt auf, dass die meisten Substanzen Inhibitoren des cholinergen, dopaminergen, serotonergen, glutamatergen oder des purinergen Systems sind. Hierbei stellen die Dopamin-Rezeptor Antagonisten den Großteil dar. Zu diesen zählen Domperidon (**15**), Thioridazin (**16**), A-77636 (**17**) und Loxapin (**18**).

Die Arbeitsgruppe von Hirofumi Makino aus Japan konnte bereits 2005 einen entscheidenden Einfluss von BMP auf die Katecholamin-Produktion bei der Dopamin-sezernierenden Ratten-Zelllinie PC12 feststellen, wobei neben BMP-2, -4, -6 und -7 auch Activin A dosisabhängig die Dopamin- und cAMP-Synthese unterdrückte<sup>[222]</sup>. Der Signalweg der Katecholamin-Biosynthese, in dem Tyrosin zu Dopamin umgewandelt wird, wird zu Beginn von der Tyrosin-Hydroxylase (TH) unter Bildung des 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) katalysiert. DOPA wird anschließend durch die DOPA-Decarboxylase (DDC) zu Dopamin umgewandelt. Die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (DBH) wandelt nachfolgend schließlich Dopamin zu Noradrenalin um. Kano *et al.* stellten hierbei für die BMP-Liganden einen inhibierenden Einfluss auf die mRNA-Expression der DDC fest. Jüngste Arbeiten von Kamatsubara *et al.* mit derselben Zelllinie belegen für BMP4 aber auch einen mindernden Einfluss auf die Tyrosin-Hydroxylase-mRNA-Expression, welcher durch Melatonin erhöht werden konnte<sup>[223]</sup>. Letzteres Hormon wurde bereits beschrieben, die Osteoblasten-Differenzierung zu fördern, indem die BMP2- und BMP4-Expression über den ERK- und Wnt-Signalweg hochreguliert wird<sup>[224]</sup>.

Ein Zusammenhang zwischen BMP und dem dopaminergen System ist also bekannt. Jedoch ist die Wirkung von Dopamin-Rezeptor-Antagonisten (**15**, **16**, **17**, **18**) und den BMP-Liganden pharmakologisch in diesem Fall entgegengesetzt. Zudem muss betont werden, dass die japanische Arbeitsgruppe die Wirkung von BMP auf das dopaminerge System untersucht hat und nicht die von dopaminergen Substanzen auf den BMP-Signalweg. Nichtsdestotrotz zeigen ihre jüngsten Arbeiten mit Melatonin ein interessantes Beispiel, für das Park *et al.* bereits einen Einfluss auf die BMP2- und BMP4-Expression feststellen konnte<sup>[224]</sup>.



**Abb. 27:** Durchführung eines Screens zur Identifizierung BMP-mimetisch wirksamer Substanzen. Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und von Tag 3 bis Tag 4 bei einem 6 %igen FBS-Gehalt mit verschiedenen Substanzen einer Substanzbibliothek (5 µM) bei zeitgleicher BMP-Inhibition durch DMH-1 (**5**) (0,5 µM) behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der durchschnittlichen kardiogenen Aktivität aufgetragen. Die Identifizierung BMP-mimetisch wirksamer Substanzen erfolgte schrittweise beginnend mit dem Primärscreen und anschließender Hit-Auswahl bis hin zur Validierung durch  $IC_{50}$ -Bestimmung (**A**). Im Primärscreen wurde dabei die durchschnittliche kardiogene Aktivität aller auf einer Assayplatte getesteten Substanzen als Maß für die durch DMH-1 (**5**)-induzierte Kardiogenese (100 %) verwendet und diejenigen Substanzen als BMP-mimetische Hits ausgewählt, die die Kardiogenese um 70 % inhibierten (*cut-off* 30 %) (**B**). Die visuell ausgewählten Hits wurden in den oben angegebenen Konzentrationen erneut getestet, wobei zwölf Substanzen die DMH-1 (**5**)-induzierte Kardiogenese dosisabhängig antagonisieren konnten (**C**). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

**Tab. 2:** Liste validierter Hits aus dem Screen der LOPAC-Bibliothek.

Name	Molekulargewicht	Aktivität
Domperidon, <b>15</b>	425,91	Dopamin Rezeptor-Antagonist
Thioridazin, <b>16</b>	407,04	Dopamin Rezeptor-Antagonist
A-77636, <b>17</b>	365,89	Dopamin Rezeptor-Antagonist, D1
Loxapin, <b>18</b>	445,90	Dopamin-Antagonist
Cyproheptadin, <b>19</b>	323,86	5HT2 Serotonin Rezeptor-Antagonist, 5HT-Antagonist
Pentamidin, <b>20</b>	592,68	NMDA Glutamat Rezeptor-Antagonist
MG 624, <b>21</b>	437,36	nikotinerger Acetylcholin Rezeptor-Antagonist
CGC-15943, <b>22</b>	285,69	nicht-selektiver A1 Adenosin Rezeptor-Antagonist
Tyrphostin AG 808, <b>23</b>	304,30	Protein Tyrosin Kinase-Inhibitor
PAC-1, <b>24</b>	392,49	Caspase 3-Aktivator, Apoptose-Induktor
ID 108137, <b>25</b>	410,98	-
ID 108148, <b>26</b>	520,11	-

Durch das Wirkprofil von **18** lässt sich auch ein Einfluss des serotonergen Systems auf eine BMP-mimetische Wirkung nicht ausschließen, wobei sich mit Cyproheptadin (**19**) auch ein weiterer 5HT2-Rezeptor-Antagonist findet, der dosisabhängig die **5**-induzierte Kardiogenese antagonisierte. Des Weiteren ist auch der Einfluss des glutamatergen

und cholinergen Systems nicht auszuschließen, da sowohl der NMDA-Rezeptor-Antagonist Pentamidin (**20**) als auch der nikotinerge Acetylcholin-Rezeptor-Antagonist MG 624 (**21**) ebenfalls auf einen BMP-mimetischen Effekt schließen ließ. En-Nosse *et al.* postulierten in diesem Zusammenhang einen Einfluss von BMP2 auf das cholinerge System Osteoblast-ähnlicher Zellen während des Knochenbaus. Dabei konnte zudem gezeigt werden, dass die Expression von nACh-Rezeptoren in Osteoblasten nach Gabe von BMP2 während des Heilungsprozesses von Knochenbrüchen bei Ratten erhöht war<sup>[225]</sup>. Wie im oben genannten Beispiel der Dopamin-Rezeptor-Antagonisten scheint die Wirkung des Inhibitors auch in diesem Fall der des BMP entgegenzustehen.

In der Liste der validierten Hits findet sich auch der nicht selektive Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist CGS-15943 (**22**). Adenosin steuert Zellfunktionen über die Wechselwirkung mit verschiedenen Rezeptoren (A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>), von denen jeder ein eigenes Wirkprofil hat<sup>[226]</sup>. Der Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor beispielsweise ist entscheidend für die Differenzierung und Funktion von Osteoklasten. Seine Blockade unterdrückt die RANKL-induzierte NF-κB-Aktivierung *in vitro*, steigert die Knochendichte, und verhindert Ovariectomie-induzierten Knochenschwund *in vivo*<sup>[227]</sup>. Die Stimulation des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors verhindert die M-CSF/RANKL-induzierte Differenzierung von Osteoklasten sowie ihre Funktion *in vitro*, teilweise durch verminderte IL-1β- und TNFα-Sekretion<sup>[228]</sup>. Die Bedeutung des Adenosin A<sub>2B</sub>-Rezeptors hingegen findet sich in der Differenzierung und Funktion der Osteoblasten<sup>[228]</sup>.

Die Cronstein-Arbeitsgruppe fand in diesem Zusammenhang heraus, dass die direkte sowie indirekte Stimulation des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors ebenso wie BMP2 die Knochenregeneration verbessert<sup>[229]</sup>. Dabei wurden Kollagen-Zellträger entweder in BMP2, CGS-21680 (A<sub>2A</sub>R-Agonist) oder Dipyridamol, welches endogene Adenosin-Level erhöht, indem die Absorption blockiert wird, getränkt und auf beschädigte Schädelknochen von Mäusen gegeben, was die Knochenregeneration im Vergleich zur Kontrolle begünstigte. Mit dem selektiven A<sub>2A</sub>R-Antagonisten ZM241385 ließ sich dieser regenerative Effekt von CGS-21680 und Dipyridamol wieder außer Kraft setzen. Katebi *et al.* berichteten, dass Adenosin über den Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptor eine wichtige Rolle auch für die Proliferation von Knochenmark-abgeleiteten Fibroblasten-ähnlichen mesenchymalen Stammzellen einnimmt<sup>[230]</sup>. Eine Blockade des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptors durch **22** in Sinne einer Verhinderung der Osteoklasten-Differenzierung wie oben beschrieben könnte also durchaus eine BMP-ähnliche Wirkung erklären. Um dieses jedoch zu verifizieren, sollte in einem Kontrollexperiment die **22**-induzierte Wirkung mit A<sub>2A</sub>R-Agonisten antagonisierbar sein.

Palcy *et al.* stellten 1999 erstmals die Aktivitäten der Protein Kinase C (PKC) und der Protein Tyrosinkinase (PTK) in den Kontext einer BMP2-stimulierten Zellantwort<sup>[231]</sup>. In osteoblastischen Zellen entdeckten sie dabei eine Abhängigkeit des TGFβ1- und BMP2-induzierten Anstiegs der α1(I)-Kollagen-Genexpression von der Aktivität der beiden Kinasen. In Gegenwart des PTK-Inhibitors Genistein konnte der Effekt der

gesteigerten Expression blockiert werden, was darauf schließen ließ, dass die PTK-Aktivität für die Signalkaskade von Bedeutung sein könnte. Jedoch ist auf Grund der Polypharmakologie von Genistein auch ein anderer zugrunde liegender Wirkmechanismus nicht ausgeschlossen. Ferner sind PKC und PTK beschrieben in der Proteinphosphorylierungskaskade zur Aktivierung der MAPK-Familie mitzuwirken<sup>[232]</sup>.

Während in diesem Fall ein Protein Tyrosinkinase-Inhibitor BMP-induzierte Signalweiterleitungen unterbindet, findet sich ein interessantes Beispiel eines Rezeptor Tyrosinkinase (RTK)-Inhibitors, der genau Gegenteiliges bewirkt. Bereits 2003 postulierten Nakayama *et al.*, dass Rezeptor Tyrosinkinasen die BMP-Smad-empfindliche Promoteraktivität und Differenzierung von murinen MC3T3-E1 Osteoblasten-ähnlichen Zellen inhibieren<sup>[233]</sup>. Jüngste Arbeiten von Lee *et al.* stellen aber erstmals einen RTK-Inhibitor vor, der die BMP2-induzierte Osteoblasten-Differenzierung *in vitro* verbessert. Dovitinib stimuliert dabei die Induktion von alkaline Phosphatase (ALP) und mRNA-Expression von BMP4/7 sowie osteogenen Markern wie Osteocalcin (OCN) durch Aktivierung der ERK1/2, p38 MAPK und Phosphorylierung von Smad1/5/8<sup>[234]</sup>. Der hiesige Protein Tyrosinkinase-Inhibitor Tyrphostin AG 808 (**23**) könnte folglich auch auf diesem Wege die **5**-induzierte Kardiogenese BMP-mimetisch antagonisieren, vor allem aber synergistisch auf bereits bestehende BMP-Stimulation wirken.

Dass mit PAC-1 (**24**) auch ein Caspase 3-Aktivator in der Liste der validierten Hits auftaucht, stimmte zunächst skeptisch und ließ vermuten, dass der Effekt der dosisabhängigen Inhibierung der kardiogenen Aktivität in der apoptotischen Wirkung von **23** begründet liegt. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade führt normalerweise zur DNA-Degradation und zum apoptotischen Zelltod<sup>[235]</sup>, jedoch zeigten die Arbeiten von Mogi *et al.* eine neuartige physiologische Funktion der Caspasen. Mogi *et al.* bewiesen, dass die Aktivierung von Caspasen für die osteoblastische Differenzierung von entscheidender Bedeutung ist und BMP4 in murinen osteoblastischen MC3T3-E1 Zellen die Caspasen 8, 2 und 3 aktiviert<sup>[236]</sup>. Zheng *et al.* bestätigten die Aktivierung der Caspase 3 durch BMP2 in hepatozellulären Krebszellen<sup>[237]</sup>, sowie Müller *et al.* durch BMP4 in WERI-Rb1 Zellen<sup>[238]</sup>. In anderen Zell-Systemen sind für BMP aber auch anti-apoptotische Effekte bekannt, sodass für die Knochenregeneration und -reparatur zwei Wirkweisen zum Tragen kommen: die Stimulation der Osteoblasten-Differenzierung und die Inhibierung deren apoptotischen Abbaus<sup>[239]</sup>.

Ferner beinhaltet die Liste der validierten Hits auch zwei Substanzen, ID 108137 (**25**) und ID 108148 (**26**), die keine etablierten Arzneistoffe darstellen und für die in der Literatur noch keine biologischen Wirkweisen beschrieben sind, sodass an dieser Stelle auch keine putativen Mechanismen oder zelluläre Zielstrukturen postuliert werden können.

#### 4.3.2. Validierung der Screening-Hits mittels Signalweg-Reporterassays

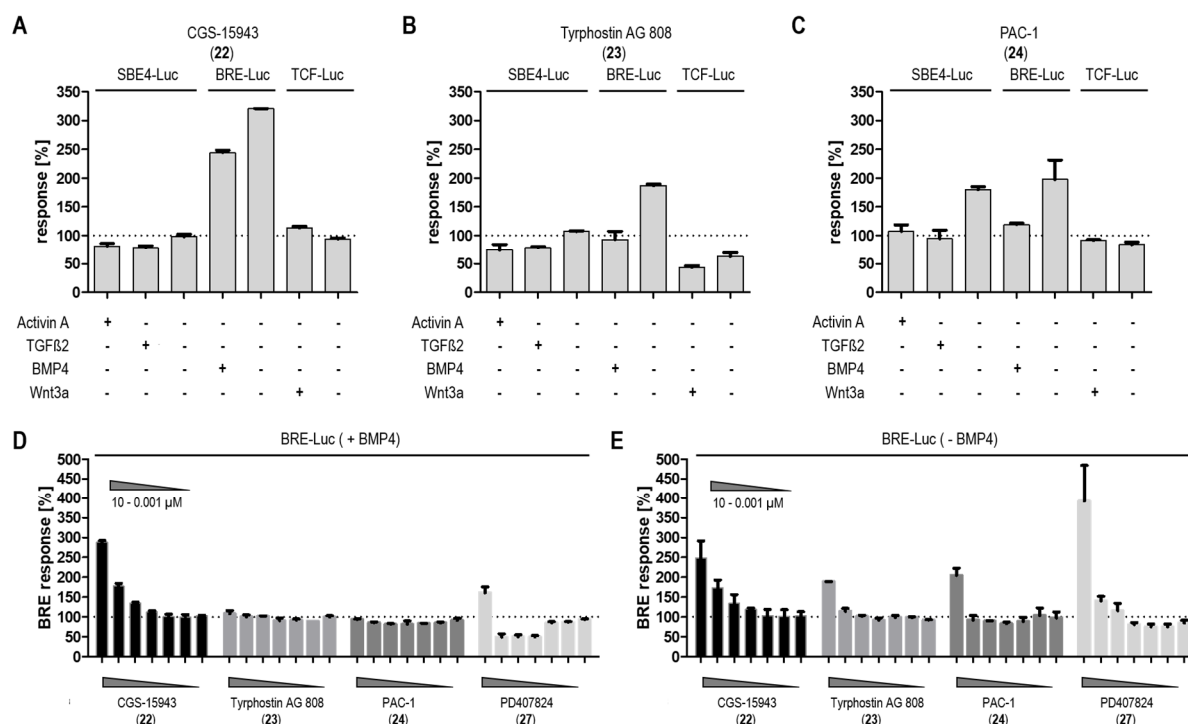
Die Hit-Validierung mittels IC<sub>50</sub>-Bestimmung zeigte also in allen Fällen eine gute Dosis-Wirkungsbeziehung, wobei sich für **22**, **23** und **24** in der Literatur zudem mögliche Erklärungsansätze für ein BMP-mimetisches Wirkprofil finden ließen. Für eine weitere Validierung dieser Ergebnisse sollten die zwölf oben vorgestellten Hits jedoch auch in den in der Arbeitsgruppe etablierten Reporterassays zur Untersuchung der Activin A-, TGFβ- und BMP-Aktivität unter Verwendung der Reporterplasmide pSBE4-Luc und pBRE-Luc getestet werden. Darüber hinaus sollte anhand des Wnt-Reporterassays die selektive Beeinflussung der Signaltransduktionswege der TGFβ-Superfamilie gegenüber dem Wnt-Signalweg untersucht werden. In allen Fällen wurde dabei auch die Aktivität ohne jeweiligen Ligand untersucht, um die stimulierende Wirkung separat und ohne synergistischen Einfluss zu ermitteln. Hierbei konnte ausschließlich für **22**, **23** und **24** der BMP-stimulierende Effekt verifiziert werden.

**22** zeigte dabei ein BMP-selektives Wirkprofil, bei dem sowohl mit als auch ohne Ligand die Aktivität signifikant und im hohen Maße stimuliert wurde (Abbildung 28, A). Die Inhibierung des Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptors durch **22** könnte folglich auch in diesem Testsystem zu einer Aktivierung des BMP-Signalweges führen, wobei die Aktivität auch unabhängig vom Adenosin-Rezeptor und in einem anderen Wirkprofil bzw. *off-target* begründet sein könnte. Bemerkenswert ist hierbei jedoch vor allem, dass die Wirkung nicht nur in Gegenwart des Liganden auf synergistischem bzw. additivem Weg erfolgt, sondern auch separat massiv in Erscheinung tritt. Zeitgleich war weder auf Activin A noch auf TGFβ ein Effekt festzustellen und auch die Beeinflussung des Wnt-Signalweges trat nicht signifikant in Erscheinung.

Auch für **23** war ein mimetischer Effekt bezüglich der BMP-Aktivität festzustellen, wohingegen ein synergistischer Effekt bei Anwesenheit des Liganden im Gegensatz zu **22** nicht sichtbar war (Abbildung 28, B). Dieses steht nicht im Einklang mit den oben vorgestellten Arbeiten von Lee *et al.*<sup>[234]</sup>, in denen der RTK-Inhibitor Dovotinib nur in Kombination mit dem Liganden die BMP-vermittelte Signalkaskade positiv beeinflussen konnte, jedoch wurde in diesem Zusammenhang bereits auf das unspezifische Wirkprofil dieses Flavonoids verwiesen, sodass womöglich ein anderer Wirkmechanismus für den gezeigten Effekt ursächlich ist. Zudem zeigte sich, dass **23** selektiv den BMP-Signalweg stimuliert, wohingegen der TGFβ-Signalweg nicht beeinflusst und der Wnt-Signalweg sogar inhibiert wurde.

Während für **22** und **23** ein BMP-selektiver Effekt festgestellt werden konnte, zeigte **24** neben einer ausgeprägten Stimulation des BMP-Signalweges auch eine Aktivierung des TGFβ-Signalweges, wobei ein Synergismus mit den jeweiligen Liganden nicht bzw. nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 28, C). Zeitgleich war für **24** keine Aktivität auf den Wnt-Signalweg zu verzeichnen. Dass **24** sowohl den BMP- als auch den TGFβ-Signalweg aktiviert, könnte darin begründet liegen, dass sowohl BMP als auch TGFβ Zytokine darstellen und in einer apoptotischen Zellantwort involviert sind.

Das Wirkprofil einer Caspase 3-Aktivierung ist für BMP, TGF $\beta$  und **24** folglich dasselbe. Dass in diesem Fall bei zeitgleicher Applikation kein (TGF $\beta$ 2) bzw. nur ein schwacher additiver Effekt (BMP4) zu verzeichnen ist, könnte darin begründet liegen, dass die Aktivierung der Signalwege über diesen Mechanismus jedoch limitiert ist.



**Abb. 28:** Bestimmung der Wirkung der Screening-Hits CGS-15943 (**22**) (**A**), Tyrphostin AG 808 (**23**) (**B**) und PAC-1 (**24**) (**C**) auf den Activin A-, TGF $\beta$ -, BMP- und Wnt-Signalweg in einem pSBE4-Luciferase-, pBRE4-Luciferase- und TCF-Luciferase-Reporterassay mit HEK293T-Zellen. Die Aktivitäten der in 5  $\mu$ M eingesetzten oben genannten Substanzen wurden mit und ohne Anwesenheit des jeweiligen Liganden getestet und auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) bezogen. In dem pBRE4-Luciferase-Reporterassay wurden die Screening-Hits zudem parallel zum CHK1-Inhibitor PD407824 (**27**) in Anwesenheit (**D**) und Abwesenheit (**E**) des Liganden über einen größeren Dosisbereich getestet. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens drei Replikaten aus einem repräsentativen Experiment (Daten von Fabian Weßeler).

Folglich konnte für **22**, **23** und **24** der BMP-stimulierende Effekt bestätigt werden, wobei sowohl eine BMP-mimetische als auch im Falle von **22** eine BMP-synergistische Wirkung zum Tragen kamen. Nachdem die Substanzen vergleichbar dem Primärscreen zunächst nur in einer Konzentration (5  $\mu$ M) in den jeweiligen Reporterassays in An- und Abwesenheit der jeweiligen Liganden getestet worden waren, sollte anschließend eine IC<sub>50</sub>-Validierung über einen größeren Dosisbereich in dem pBRE4-Luciferase-Reporterassay erfolgen. In diesem Zusammenhang sollte zudem der von Feng *et al.*<sup>[217]</sup> als *BMP-Sensitizer* identifizierte CHK1-Inhibitor PD407824 (**27**) vergleichend mitgetestet werden. Hierbei konnte für **23** und **24** der BMP-mimetische Effekt bestätigt werden, wobei dieser in diesem Fall jedoch erst bei einer höheren Konzentration (10  $\mu$ M) zu verzeichnen war (Abbildung 28, E). Zudem zeigte sich erneut kein BMP-Synergismus in Anwesenheit von BMP4 (Abbildung 28, D). Dahingegen war ein solcher synergistischer Effekt für **22** feststellbar, der darüber hinaus durch eine gute Dosisabhängigkeit gekennzeichnet war. Interessanterweise war dieses für **27** nicht der Fall, obwohl Feng *et al.* eine BMP-synergistische Wirkung postuliert hatten. Vielmehr zeigte **27** einen dosisabhängigen



BMP-mimetischen Effekt, der den von **22** sogar noch übertraf, wobei die höchste eingesetzte Konzentration möglicherweise bereits leicht toxisch auf die verwendeten Zellen wirkte.

#### 4.4. Zusammenfassung und Ausblick

Nach der anfänglichen Etablierung des mESC-basierten Kardiogenese-Assays konnte dieser erfolgreich abgewandelt und weiterentwickelt werden, um in einem Screening-basierten Ansatz BMP-Mimetika identifizieren zu können. Dieses wurde ermöglicht, da im Zuge eines chemisch-biologischen Ansatzes zur Charakterisierung der Differenzierung der murinen ES-Zellen erstmalig eine temporäre Phase selektiver BMP-Sensitivität nachgewiesen werden konnte. Daraufhin wurde der Assay in der Weise umgestaltet, dass eine BMP-selektive Inhibition mittels DMH-1 (**5**) durch Aktivierung des BMP-Signalweges funktional antagonisiert wurde, wobei dieses sowohl mit dem rekombinanten Protein BMP4 als auch mit der niedermolekularen Substanz Isoliquiritigenin (**14**) gezeigt und damit die prinzipielle Durchführbarkeit (*proof-of-concept*) dieses Vorhabens belegt werden konnte. Die nachfolgende Herausforderung des Transfers des manuell durchgeführten Assays auf die Laborrobotik konnte darüber hinaus ebenfalls erfolgreich bewältigt werden, sodass ein Screening-Verfahren zur Identifizierung von Aktivatoren des BMP-Signalweges im Hochdurchsatzformat möglich war.

Ausgehend von einem Primärscreen mit 1408 Substanzen konnten dabei zunächst zwölf Hits identifiziert werden (Hit-Rate = 0,9 %), die dosisabhängig die **5**-induzierte Kardiogenese antagonisierten. Von diesen zwölf Hits zeigten drei in darauffolgenden Validierungsexperimenten in HEK-zellbasierten Reporterassays eine BMP-aktivierende Wirkung, die sowohl durch einen BMP-Synergismus in Anwesenheit des Liganden (**22**) als auch einer BMP-Mimesis in dessen Abwesenheit gekennzeichnet war (**22**, **23** und **24**). Dass die anderen neun Substanzen in den Reporterassays keine Aktivierung des BMP-Signalweges zeigten, zeitgleich aber in dem murinen Stammzellassay die **5**-induzierte Kardiogenese dosisabhängig antagonisierten, kann in der unterschiedlichen Komplexität der jeweiligen Assays begründet liegen. Während in den HEK-zellbasierten Reporterassays selektiv nur ein bestimmter Signalweg anhand eines artifiziellen Reporterkonstrukts betrachtet wird, erfolgt die Betrachtung des Signalweges – in diesem Fall des BMP-Signalweges – im Kontext einer embryonalbiologischen Entwicklung, bei der die Modulation dieses Signalweges zu einem definierten Zeitpunkt entscheidenden Einfluss auf den finalen Phänotyp hat. Es ist also durchaus denkbar, dass beispielsweise die Modulation des dopaminergen Systems durch **16**, **17**, **18** und **19** im Kontext der Differenzierung von murinen pluripotenten Stammzellen zu Kardiomyozyten Auswirkungen auf den BMP-Signalweg hat und hierbei BMP-aktivierende Mechanismen involviert sind, die in dem artifiziellen Reporterassay nicht in Erscheinung treten (können).

Interessanterweise finden sich für **22**, **23** und **24** in der Literatur Beispiele, in denen der jeweilige primäre Wirkmechanismus im Zusammenhang mit dem Synergismus oder der Mimesis der BMP-Aktivität beschrieben ist. Auch wenn hierbei die Identifikation von Substanzen, die als *BMP-Sensitizer* eingesetzt werden können wie der von Feng *et al.*<sup>[217]</sup> beschriebene CHK1-Inhibitor PD407824 (**27**), durchaus interessante *in vitro*- und *in vivo*-Anwendungen verspricht, sind es vor allem jedoch die BMP-mimetisch wirksamen Substanzen, denen die größte pharmakologische Relevanz zukommt. Besonders vielversprechend zeichnete sich hierbei der Adenosin Rezeptor-Antagonist **22**. Dieser vermochte in den Reporterassays nicht nur selektiv die BMP-Aktivität in hohem Maße zu unterstützen, sondern zeigte diese ausgeprägte Aktivität sowohl in An- als auch in Abwesenheit des Liganden. Ob der zugrunde liegende Wirkmechanismus mit der Inhibition der Adenosin-Rezeptoren zusammenhängt, müssen nachfolgende Untersuchungen zeigen, die im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr angefertigt werden konnten. Hierbei bieten sich vergleichende Untersuchungen mit anderen selektiveren Adenosin A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> und A<sub>3</sub> Rezeptor-Antagonisten an, um diesen Mechanismus eingehender zu untersuchen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass ein für **22** gänzlich unbekanntes zelluläres *target* adressiert wird, das in einem direkten Kontext zum BMP-Signalweg steht. Zudem sollte die Beeinflussung des Signalweges auf mechanistischer Ebene genauer untersucht werden, wobei die Expression der *target*-Gene wie *Id1* und *Id2* sowie die Smad-Phosphorylierung zwingend bestimmt werden müssten. Analog sollte die Beeinflussung der Expression von BMP-Proteinen mittels ELISA-Assays überprüft werden. Derartige Untersuchungen könnten zunächst mit den murinen ES-Zellen durchgeführt werden. In Zukunft würden jedoch weitere Validierungsexperimente in anderen Modell-Systemen wie z.B. der BMP-sensitiven Osteoblasten-Zelllinie MC3T3-E1 sowie *in vivo*-Modelle im Zebrafisch tiefere Einblicke in BMP-relevante Mechanismen ermöglichen.

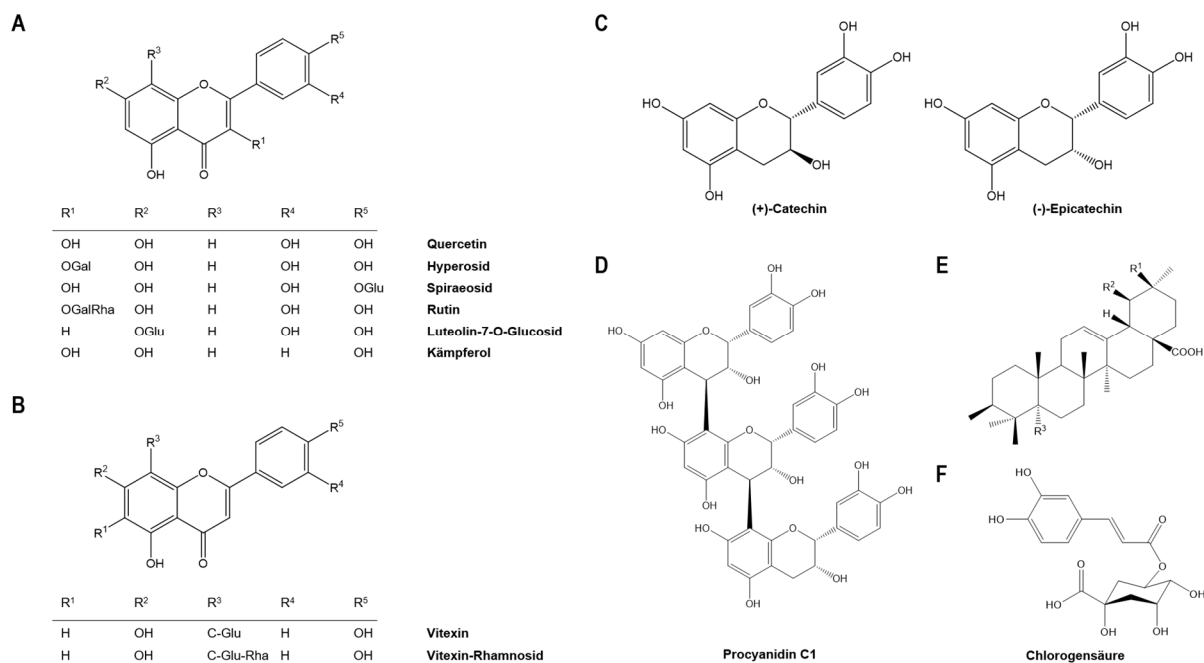
## 5. Charakterisierung von *Crataegus* ssp. als Modulator der kardialen Differenzierung von murinen ES-Zellen

### 5.1. Einleitung

Als Gegensatz zu den jüngsten oben genannten innovativen Ansätzen zur Therapie der Herzinsuffizienz mittels neuester wissenschaftlicher Entwicklungen findet sich mit der traditionellen Arzneipflanze Weißdorn ein phytotherapeutischer Ansatz, dessen Anwendung zur Stärkung des Herzens erstmals Ende des 19. Jahrhunderts wissenschaftlich beschrieben wurde und zudem in der Traditionellen Chinesischen Medizin seit Jahrhunderten praktiziert wird<sup>[147]</sup>.

Der Weißdorn, lat. *Crataegus*, gehört zur Familie der Rosengewächse, lat. *Rosacea*, und ist ein sommergrüner, stark verzweigt und dornig wachsender Strauch bis mittelgroßer Baum, der in den gemäßigten Zonen der Nordhalbkugel und vor allem in Nordamerika und Europa beheimatet ist<sup>[148]</sup>. In Deutschland sind dabei insbesondere die Arten *C. monogyna*, der eingriffelige Weißdorn, und *C. laevigata/oxycantha*, der zweigriffelige Weißdorn, vertreten. Diese sind auch als Stammpflanzen für die Zubereitung der im Europäischen Arzneibuch (Ph. Eur.) monographierten Droge „Weißdornblätter mit Blüten“ zugelassen, wobei dieser Rohstoff überwiegend durch Wildsammlung in den Balkan-Ländern gewonnen wird. Die beiden Extrakte aus „Weißdornblättern mit Blüten“ WS<sup>®</sup>1442 und LI 132 haben hierbei die größte Bedeutung, die vor allem daher rührt, dass sie in präklinischen und klinischen Studien eingehend untersucht und phytochemisch charakterisiert wurden. Beide stellen quantifizierte Trockenextrakte dar, wobei WS<sup>®</sup>1442 (Präparat Crataegutt<sup>®</sup>) der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG auf 18,75 % oligomere Procyanidine (OPC) und LI 132 (Präparat Faros<sup>®</sup>) der Firma MCM Klosterfrau Vertriebs-GmbH auf 2,2 % Flavonoide als wirksamkeitsmitbestimmende Inhaltsstoffe eingestellt wird. Demzufolge ist die Gesamtwirkung des Extraktes nicht auf eine einzelne Inhaltsstoffklasse zurückzuführen, sondern ergibt sich aus dem Teilbeitrag jeder einzelnen und ihre Gesamtheit ist für die volle Wirkung des Extraktes notwendig.

Aus dem Vielstoffgemisch „Weißdornblätter mit Blüten“ wird aber vor allem den Flavonoiden, für die das Ph. Eur. ein Mindestgehalt von 1,5 % (berechnet als Hyperosid) angibt, und den OPC, die zu 1 bis 3 % enthalten sein müssen, die höchste Bedeutung für die Wirkung zugeschrieben. Unter den Flavonoiden sind dabei insbesondere Flavone, Flavon- und Flavonol-O-Glykoside und Flavon-C-Glykosyle vertreten, wobei Vitexin, Hyperosid und Rutin ebenso beschrieben sind wie Kämpferol und Quercetin. Die OPC sind hingegen aus den Flavan-3-ol-Monomeren Catechin und Epicatechin aufgebaut und bilden typischerweise Polymerisierungsgrade zwischen 2 bis 8 aus. Darüber hinaus sind auch noch weitere Inhaltsstoffe wie Triterpensäuren (Ursol-, Oleanol- und Crataegolsäure) und Phenolcarboxysäuren (Chlorogen- und Kaffeesäure) sowie verschiedene Amine bekannt<sup>[147]</sup> (Abbildung 29, A-F).



**Abb. 29:** Strukturen der Haupt-Inhaltsstoffe der Droge „Weißdornblätter mit Blüten“. Flavone, Flavonole, O-Glycoside (**A**), Flavon-C-Glycoside (**B**), Flavane (**C**), Procyanidine (z.B. Procyanidin C1) (**D**), Triterpensäure-Derivate (**E**) und Hydroxycimtsäure-Derivate (z.B. Chlorogensäure) (**F**)

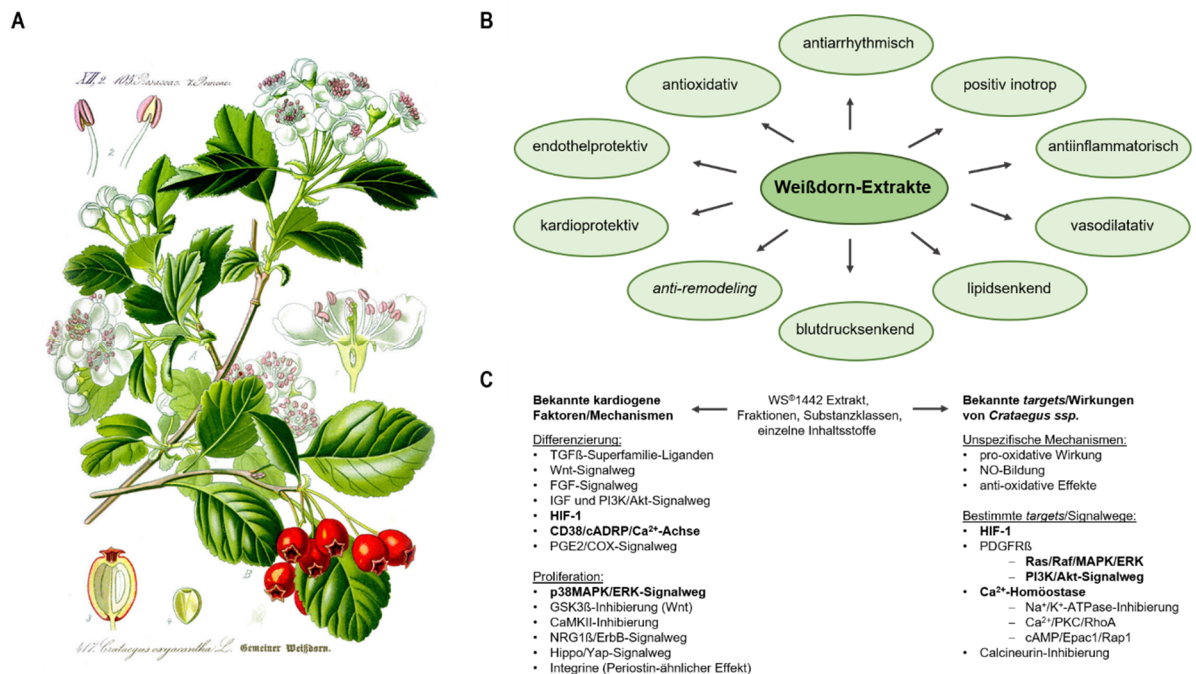
Viele klinische Studien haben die Wirksamkeit der Weißdorn-Extrakte WS<sup>®</sup>1442 und LI 132 bei der Behandlung von Herzinsuffizienz untersucht, wobei der Cochrane-Review im Jahre 2008 die Ergebnisse derjenigen von ihnen zusammenfasste, die ein doppelblindes, randomisiertes und placebokontrolliertes Studien-Design aufwiesen<sup>[240]</sup>. Dieser belegte einen signifikanten Nutzen von Weißdorn hinsichtlich der untersuchten Parameter wie der Reduzierung der Symptome Atemnot und Fatigue, die mittels Belastungstest (Ergometer) zwischen der Placebo- und Verumgruppe verglichen wurden. Der Nutzen bezüglich der Mortalitätssenkung hingegen konnte anhand dieser Studien nicht bewertet werden und wurde erstmals in der ebenfalls im Jahre 2008 veröffentlichten SPICE-Studie (*Survival and Prognosis: Investigation of Crataegus Extract WS 1442 in Chronic Heart Failure*) untersucht<sup>[241]</sup>. Diese Studie bezog 2681 Herzinsuffizienz-Patienten ein, die eine der aktuellen Leitlinie entsprechenden Pharmakotherapie erhielten sowie eine *Add-on*-Therapie von 900 mg WS<sup>®</sup>1442 bzw. Placebo täglich. Der Behandlungszeitraum erstreckte sich über 24 Monate, wobei als primärer Endpunkt der Studie die Zahl der Tage bis zum Auftreten eines kardialen Ereignisses, definiert als plötzlicher Herztod, Tod auf Grund des Fortschreitens der Herzinsuffizienz, tödlicher Herzinfarkt, nicht-tödlicher Herzinfarkt oder Hospitalisierung auf Grund des Fortschreitens der Herzinsuffizienz, gewählt wurde. Die Studie kam dabei zu dem ernüchternden Ergebnis, dass zwischen der Verum- und der Placebogruppe kein signifikanter Unterschied in der durchschnittlichen Zeit bis zum Auftreten eines solchen kardialen Ereignisses (Verum: 620 Tage, Placebo: 606 Tage) festzustellen war. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass eine Subgruppe von Patienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF)  $\geq 35\%$  durchaus von der *Add-on*-Behandlung mit dem Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 profitierte, da in dieser Gruppe geringgradiger herzinsuffizienter Patienten die Zahl der Fälle an plötzlichem Herztod signifikant verringert war<sup>[242]</sup>.

Das ernüchternde Ergebnis der SPICE-Studie schlägt sich auch in der jüngsten Bewertung der Wirksamkeit der Droge „Weißdornblätter mit Blüten“ durch das *Committee for Herbal Medicinal Products* (HMPC) der *European Medicines Agency* (EMA) nieder. Während in den obsoleten Monographien der Kommission E und der ESCOP (*European Scientific Cooperative on Phytotherapy*) für die Droge „Weißdornblätter mit Blüten“ noch die „nachlassende Leistungsfähigkeit des Herzens entsprechend Stadium II nach NYHA (*New York Heart Association*)“ als Indikation angegeben wird, findet sich in den HMPC-Monographien dieses Anwendungsgebiet nicht. Während der Droge hierbei für die Behandlung der Herzinsuffizienz auf Grund der bestehenden Studienlage der „*well-established use*“ abgesprochen wird, billigt das HMPC für „Weißdornblätter mit Blüten“ lediglich den traditionellen Gebrauch („*traditional use*“) für die Anwendungsgebiete „nervöse Herzbeschwerden, nervliche Belastung und Schlafunterstützung“ zu<sup>[242]</sup>.

Auch wenn die Mono- oder *Add-on*-Therapie mit Weißdorn-Extrakten scheinbar die Morbidität und Mortalität von Herzinsuffizienz-Patienten nicht signifikant verringert und hierfür eine leitliniengerechte Behandlung mit ACE-Hemmern, Betablockern, Aldosteron-Antagonisten und Diuretika unabdingbar ist, scheint jedoch wie oben bereits erwähnt deren Lebensqualität durchaus positiv durch die Behandlung beeinflusst zu werden. Die Pharmakologie von Weißdorn wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht und gibt in diesem Zusammenhang interessante Erklärungsansätze für die Verbesserung der Symptome dieser Krankheit. Beispielsweise belegen zahlreiche Studien die positiv inotrope Wirkung (Steigerung der Herzkraft) von Weißdorn-Extrakten<sup>[243]–[247]</sup>, wobei Arbeiten von Siegel *et al.* mit humanen Kardiomyozyten für die positiv inotrope Wirkung von WS<sup>®</sup>1442 einen cAMP-unabhängigen Wirkmechanismus ähnlich dem der Herzglykoside postulieren, bei dem die Natrium-Kalium-ATPase inhibiert wird und somit die Konzentration zytosolischen Calciums ansteigt<sup>[244]</sup>. In den Arbeiten von Poepping *et al.*, die mit isolierten Ratten-Kardiomyozyten ebenfalls einen positiv inotropen Effekt feststellten, war zudem eine Verlängerung der Refraktärzeit und der Dauer des Aktionspotenzials beobachtet worden, was auf eine antiarrhythmische Wirkung des Weißdorn-Extraktes schließen lässt<sup>[243]</sup>. Dieser Effekt könnte dabei in einer leichten Blockade der Kalium-Kanäle begründet liegen<sup>[245]</sup>. Darüber hinaus finden sich auch Hinweise auf eine kardioprotektive Wirkung von Weißdorn-Extrakten. In verschiedenen Ischämie-Reperusions-Modellen wiesen hierbei Ratten, die zuvor mit WS<sup>®</sup>1442 gefüttert worden waren, nach kurzzeitigem Verschluss der linken Koronararterie eine geringere Mortalität und Größe der Infarkt-Zone sowie weniger reperusionsinduzierte Arrhythmien und hypotone Krisen auf als die Vergleichsgruppe<sup>[248],[249]</sup>. Untersuchungen von Chatterjee *et al.* lassen dabei den Schluss zu, dass die kardioprotektive Wirkung von WS<sup>®</sup>1442 auf die OPC und ihre antioxidativen und entzündungshemmenden Eigenschaften zurückzuführen ist<sup>[250]</sup>. Mechanistisch könnte eine verringerte Apoptose zudem in einer Weißdorn-vermittelten Regulation der Akt/HIF-1-Signalwege begründet liegen<sup>[251]</sup>. Des Weiteren stellten Koch *et al.* in Experimenten mit hypertensiven Ratten fest, dass deren erhöhter Blutdruck durch die

Gabe von WS®1442 gesenkt sowie der adaptive Effekt der kardialen Hypertrophie (Remodeling) dosisabhängig inhibiert werden konnte<sup>[252]</sup>.

Ferner erhöhen Weißdorn-Extrakte die Durchblutung der Herzkranzgefäße durch die Freisetzung vasodilatierenden (gefäßerweiternden) Stickstoffmonoxids (NO) aus dem Gefäßendothel, wobei die redox-sensitive Src/PI3K/Akt-abhängige Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) sowie der verringerte Abbau von NO vor allem auf die OPC zurückzuführen zu sein scheinen<sup>[253]–[255]</sup>. Zudem scheint WS®1442 die Barrierefunktion von Endothelzellen über eine Inhibierung des barriere destabilisierenden Ca<sup>2+</sup>/PKC/RhoA-Signalweges bei zeitgleicher Aktivierung des barriestabilisierenden cAMP/Rap1/Rac1-Signalweges zu verbessern und so vor der Bildung von Ödemen zu schützen<sup>[256]</sup>. Darüber hinaus sind für Weißdorn-Extrakte auch cholesterinsenkende Eigenschaften beschrieben<sup>[257]–[260]</sup>.

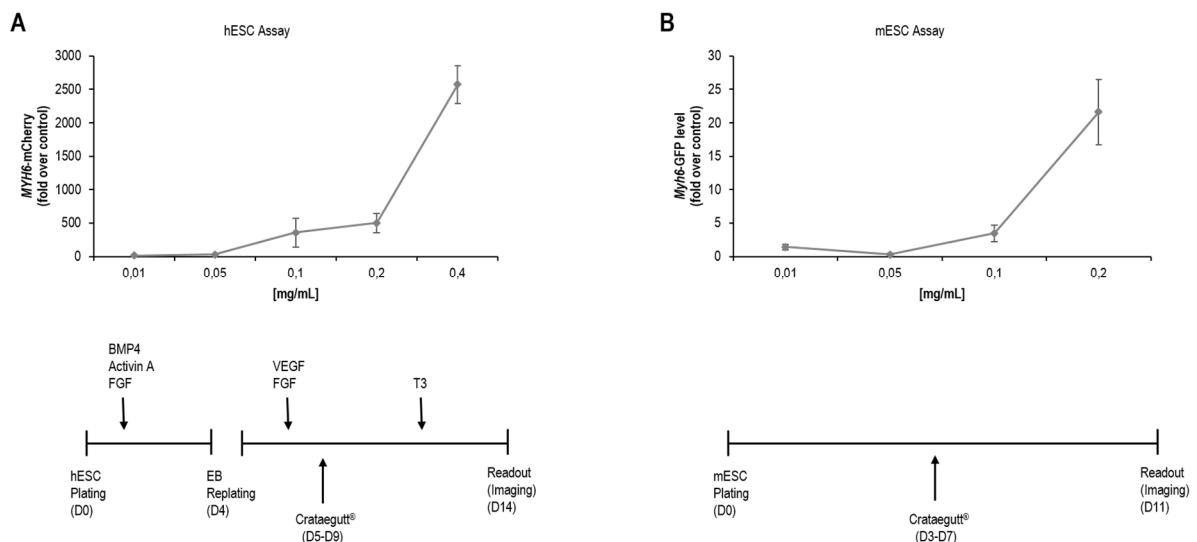


**Abb. 30:** Weißdorn und seine Pharmakologie. Der zweigriffelige Weißdorn, lat. *Crataegus laevigata/oxyacantha*,<sup>[261]</sup> (A) ist als Stammpflanze für die Herstellung der Droge „Weißdornblätter mit Blüten“ zugelassen, für die verschiedene pharmakologische Wirkungen (B) und zelluläre targets beschrieben sind (C).

Pharmakokinetische Studien gibt es nur vereinzelt, wobei Untersuchungen von Hecker-Niediek *et al.* an Mäusen die rasche Absorption der oral verabreichten <sup>14</sup>C-gelabelten OPC und Catechine innerhalb einer Stunde mit einer substanzabhängigen Rate von 16-40 % angeben<sup>[147]</sup>. Die Bioverfügbarkeit von Vitexin-Rhamnosid beträgt lediglich 3,6 %, was auf eine schlechte Absorption und einen hohen *first-pass*-Metabolismus schließen lässt<sup>[262]</sup>.

## 5.2. Identifizierung der kardiogenen Aktivität des Weißdorn-Spezialextraktes WS<sup>®</sup>1442 in humanen und murinen ES-Zellen

In Pilotexperimenten wurde zunächst auf das apothekenpflichtige Fertigarzneimittel Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen (seit 01.08.2016 Crataegutt<sup>®</sup> Herz-Kreislauf-Tropfen) der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG zurückgegriffen, um die Wirkung des standardisierten Weißdorn-Spezialextraktes WS<sup>®</sup>1442 auf pluripotente Stammzellen zu untersuchen. Die Untersuchungen in einem *High-Content*-Screening-Assay mit humanen ES-Zellen, bei dem nach einer viertägigen Mesoderm-Induktion mittels der Wachstumsfaktoren Activin A, FGF und BMP4 die EBs dissoziiert und in einem 384-Well-Format replattiert wurden, wurden dabei von Dr. Eric Willems (Sanford-Burnham Medical Research Institut, La Jolla, USA) durchgeführt<sup>[40]</sup>. Hierbei zeigte der Weißdorn-Extrakt, der von Tag 5 bis Tag 9 in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben worden war, eine dosisabhängige kardiogene Aktivität, die sich anhand der Expression des MYH6-mCherry-Reporters fluoreszenzmikroskopisch erfassen ließ (Abbildung 31, A).



**Abb. 31:** Untersuchung der kardiogenen Aktivität des Fertigarzneimittels Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen in humanen und murinen ES-Zellen. In dem 14-tägigen hESC-basierten Differenzierungsassay wurden die Zellen nach vorheriger Mesoderm-Induktion an Tag 4 als EBs dissoziiert sowie auf einem 384-Well-Assayplattenformat replattiert und von Tag 5 bis Tag 9 mit Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt (A). Die murinen ES-Zellen wurden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium (10 % FBS) kultiviert und von Tag 3 bis Tag 7 mit Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt (B). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte (Vehikel) aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse sollte der Weißdorn-Extrakt auch in dem hier verwendeten mESC-basierten Kardiogenese-Assay getestet werden. Hierbei wurde anfangs ebenfalls eine fünftägige Expositionsdauer des Extraktes auf den Zellen gewählt, wobei das Zeitfenster von Tag 3 bis Tag 7 verwendet wurde, da auch hier wie im Vergleich zu dem Assay mit den humanen ES-Zellen die Mesoderm-Bildung bereits

abgeschlossen war (Abbildung 31, B). Der kardiogene Effekt war dabei ebenfalls bis zu einer Konzentration von 0,2 mg/mL durch eine Dosis-Wirkungsbeziehung gekennzeichnet, wobei für höhere Konzentrationen des Extraktes toxische Effekte festzustellen waren. Dass bereits bei niedrigeren Konzentrationen der Weißdorn-Extrakt auf die murinen Stammzellen toxisch wirkte, kann hierbei in der geringeren Zellmasse begründet liegen, die an Tag 3 in dem mESC-basierten Assay im Vergleich zum Assay mit den humanen ES-Zellen vorliegt.

In nachfolgenden Experimenten sollte die Frage adressiert werden, ob der gezeigte kardiogene Effekt auf den Weißdorn-Extrakt selbst oder die im Fertigarzneimittel Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen enthaltenen pharmazeutischen Hilfsstoffe zurückzuführen ist. Dabei wurden parallel zu dem Fertigarzneimittel die Hilfsstoffe Sorbitol, Propylenglykol und Ethanol in dem mESC-basierten Differenzierungsassay in demselben Zeitraum auf die Zellen gegeben wie zuvor die Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen. Hierbei ließ sich belegen, dass für die kardiogene Aktivität ausschließlich der Weißdorn-Extrakt ursächlich war. (Daten nicht gezeigt).

Nachfolgende Experimente wurden ausschließlich mit dem reinen Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 durchgeführt, der freundlicherweise von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellt wurde. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob die relativ lange Expositionsdauer von fünf Tagen in den Pilotexperimenten für die kardiale Differenzierung der Zellen essentiell war oder ob die Behandlungsdauer auch auf wenige Tage begrenzt werden konnte. Dieses hätte zum einen den Vorteil, die Zellpopulation, auf die der Weißdorn-Extrakt wirkt, genauer benennen und zum anderen den zugrunde liegenden Wirkmechanismus in diesem Zusammenhang besser untersuchen zu können. Würde hingegen eine lange Expositionsdauer des Weißdorn-Extraktes benötigt, um die Kardiogenese der Zellen zu fördern, würde dieses auf einen eher unspezifischen Effekt schließen lassen. Entsprechend der Behandlungsdauer mit den literaturbekannten kardiogenen Substanzen (s. Kapitel 3.4.) wurde der Weißdorn-Extrakt daher in verschiedenen Konzentrationen für jeweils 48 h beginnend mit Tag 2 des Assays auf die Zellen gegeben. Dabei zeigte sich, dass der kardiogene Effekt bei einer Expositionsdauer von Tag 4 bis Tag 6 am höchsten war (Abbildung 32, A). Eine länger andauernde Behandlung bis zu Tag 7 vergleichbar den Pilotexperimenten mit dem Fertigarzneimittel Crataegutt<sup>®</sup>-Tropfen steigerte diesen Effekt hingegen nicht (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus war bei einer Extrakt-Exposition ab Tag 7 ein Effekt von unspezifischer Autofluoreszenz festzustellen, der abhängig von der Expositionsdauer sowie der Extrakt-Konzentration war und den phänotypischen *Readout* über Quantifizierung des GFP-Signales verfälschte und ein falsch-positives Ergebnis angab (Daten nicht gezeigt). In Folge dessen legte man sich auf das Zeitfenster Tag 4 bis Tag 6 als das für die WS<sup>®</sup>1442-induzierte Kardiogenese entscheidende Zeitfenster fest, da hier zum einen die höchste kardiogene Aktivität quantifiziert werden konnte und zum anderen kaum eine Beeinflussung des Reportersignals durch die im Weißdorn enthaltenen Inhaltsstoffe gegeben war, sodass das Ergebnis nicht falsch-positiv beeinflusst wurde.



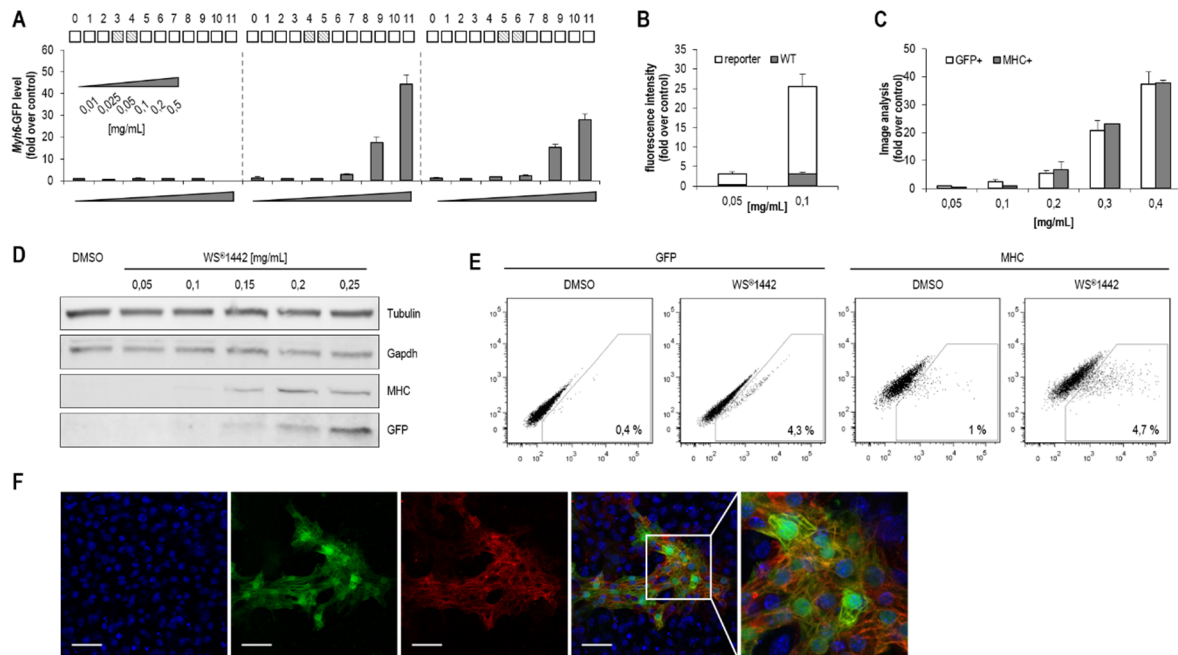
Der Effekt der unspezifischen Fluoreszenz ist vermutlich auf die Akkumulation und Adhäsion einiger im Weißdorn enthaltenen Inhaltsstoffe an die Zellen zurückzuführen. Dass dieser Effekt dabei weniger bis gar nicht bei Substanzbehandlung der Zellen zu früheren Zeitpunkten im Assay zum Tragen kommt, könnte darin begründet liegen, dass zum einen die Zellmasse, an der diese autofluoreszierenden Inhaltsstoffe anhaften können, zu Beginn noch geringer ist, und zum anderen die Anzahl nachfolgender Mediumwechsel im ersten Fall größer ist, sodass diese Inhaltsstoffe anschließend häufiger abgewaschen werden. Hierbei wurde aber auch deutlich, dass der weißdorninduzierte kardiogene Effekt bei Substanzbehandlung von Tag 4 bis Tag 6 einer ausführlichen Validierung bedurfte.

### 5.3. Validierung der WS<sup>®</sup>1442-induzierten Kardiogenese im mESC-Differenzierungsassay

Um zunächst den Anteil der unspezifischen Fluoreszenz der Bestandteile des Weißdorn-Extraktes am detektierten Gesamtfluoreszenzsignal zu erfassen, wurden parallel sowohl Zellen der Wildtyp- als auch der  $\alpha$ MHC-GFP-Reporterzelllinie wie gewohnt ausplattiert und unter Assay-Bedingungen kultiviert. Dabei wurden die Zellen an Tag 4 für 48 h mit WS<sup>®</sup>1442 in verschiedenen Konzentrationen behandelt und an Tag 11 schließlich fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Hierbei konnte unter denselben Aufnahmebedingungen am Mikroskop in beiden Fällen ein Signal im GFP-Kanal detektiert werden. Da bei der Wildtyp-Zelllinie das Fluoreszenzsignal nicht auf den Reporter  $\alpha$ MHC-GFP zurückzuführen ist, kann es sich dabei nur die unspezifische Fluoreszenz durch die im Weißdorn-Extrakt enthaltenen Inhaltsstoffe handeln. Dieser falsch-positive Effekt ist auch Bestandteil des Gesamtfluoreszenzsignals, welches für die Reporterzelllinie detektiert wird. Dieser Anteil beträgt in diesem Fall aber lediglich 15 %, sodass die anderen 85 % den realen WS<sup>®</sup>1442 -induzierten kardiogenen Effekt widerspiegeln (Abbildung 32, B). Eben diese Reporteraktivität wurde anschließend mittels verschiedener Methoden weiter validiert. Dazu wurde zunächst die Anwesenheit des GFP-Reporters mittels Antikörperfärbung und anschließender fluoreszenzmikroskopischer Messung nachgewiesen. Derselbe GFP-Antikörper wurde darüber hinaus auch verwendet, um mittels Western Blot das Protein nachzuweisen (Abbildung 32, D). Auch hier konnte die Dosis-Wirkungsbeziehung, wie sie zuvor durch den phänotypischen *Readout* nach der WS<sup>®</sup>1442-Behandlung der Zellen bekannt war, validiert werden.

Dass nicht nur die Expression des Reporters GFP, sondern auch die des endogenen  $\alpha$ MHC-Promoters, durch die Behandlung mit dem Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 stimuliert wird, wie es zu erwarten ist, wurde daraufhin als nächstes untersucht und validiert. Auch hierbei wurde zunächst mit Hilfe eines Antikörpers, dem *anti-MHC-eFluor660*, und der fluoreszenzmikroskopischen Methode das Protein nachgewiesen (Abbildung 32, F). In diesem Zusammenhang wurde zudem die Korrelation zwischen dem durch den Reporter detektierten Signal und dem des MHC-Antikörpers mittels *Imaging* untersucht (Abbildung 32, C). Dabei waren die relativen Werte in Bezug auf

die Signalintensität der Kontrolle für das GFP sowie den Promoter  $\alpha$ MHC nahezu identisch für die jeweils eingesetzte WS<sup>®</sup>1442-Konzentration. Dieselbe Dosisabhängigkeit zeigte sich auch im Western Blot und der absoluten Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 32, D-E).

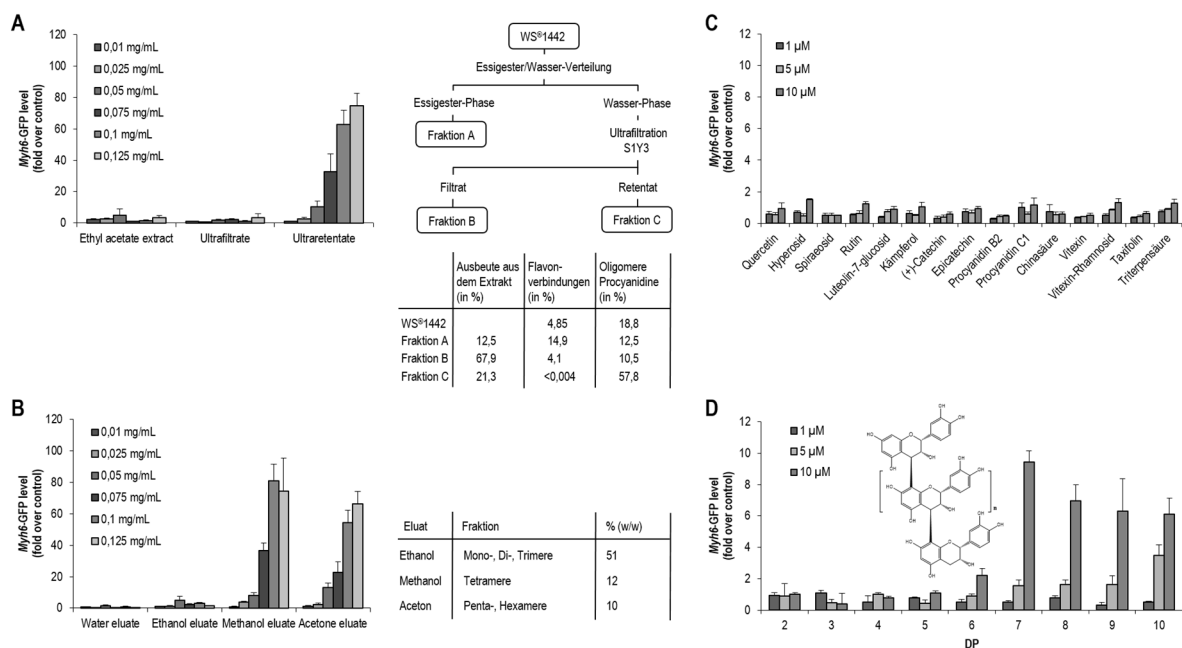


**Abb. 32:** Validierung der kardiogenen Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 in murinen ES-Zellen. Die murinen ES-Zellen werden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und von Tag 4 bis Tag 6 mit WS<sup>®</sup>1442 in den jeweils oben angegebenen Konzentrationen behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment. Die Behandlung der Zellen mit dem Extrakt erfolgte darüber hinaus auch zu anderen Zeitpunkten des Assays (A). Vergleichend dazu wurden Zellen der Wildtyp-Zelllinie unter denselben Bedingungen kultiviert und von Tag 4 bis Tag 6 mit WS<sup>®</sup>1442 behandelt (B). Die Zellen der Reporterzelllinie wurden zusätzlich nach Tag 11 mit dem Antikörper *anti*-MHC angefärbt und nach fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme analysiert (C). Die Antikörper *anti*-GFP und *anti*-MHC wurden weiterhin verwendet, um die von Tag 4 bis Tag 6 mit WS<sup>®</sup>1442 behandelten und an Tag 11 lysierten Zellen mittels Western Blot zu analysieren (D). Eine absolute Quantifizierung der durch DMSO- und Extrakt-Behandlung generierten Kardiomyozyten wurde mittels Durchflusszytometrie über das Reportersignal (GFP) und Antikörperfärbung (MHC) durchgeführt (E). Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen der Reporterzelllinie wurden nach Tag 11 mit dem Antikörper *anti*-MHC angefärbt und am Konfokalmikroskop Leica SP5 (20x Vergrößerung, DAPI (blau), GFP (=Reporter) (grün),  $\alpha$ MHC (=Promoter) (rot)) untersucht (F). Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m.

#### 5.4. Identifizierung der kardiogen wirksamen Inhaltsstoffe des Weißdorn-Spezialextraktes WS<sup>®</sup>1442

Um die Inhaltsstoffe zu identifizieren, die für die weißdorninduzierte Kardiogenese der pluripotenten Stammzellen verantwortlich sind, wurde nach dem Ansatz der *bioassay-guided fractionation* vorgegangen. Hierbei stellte der Kooperationspartner Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG Fraktionen des Weißdorn-Spezialextraktes WS<sup>®</sup>1442 zur Verfügung, die nach analytischer Auftrennung von Chatterjee *et al.*<sup>[250]</sup> und Vennat *et al.*<sup>[263]</sup> gewonnen wurden. Zudem stellte der Kooperationspartner eine Auswahl von 15 Einzelsubstanzen zu Verfügung, die für Weißdorn beschrieben sind und nun auf ihre kardiogene Eigenschaft untersucht werden sollten.

Aus der Testung der nach Chatterjee *et al.* isolierten Fraktionen ging hervor, dass das an oligomeren Procyanidinen (OPC) reiche Ultraretentat eine sehr hohe, dosisabhängige kardiogene Aktivität aufweist, während die flavonreiche Ethylacetat-Fraktion inaktiv war (Abbildung 33, A). Diese Ergebnisse deckten sich mit denen aus der Testung der nach Vennat *et al.* isolierten Fraktionen, in der nur diejenigen kardiogen aktiv waren, in denen höhermolekulare OPC angereichert waren (Abbildung 33, B). Hierbei waren durch das Extraktionsverfahren in dem Methanol Eluat tetramere und in dem Aceton Eluat pentamere und höher molekulare OPC anzufinden. Das dimer-/trimerreiche bzw. mit flavonoiden Monomeren haltige Ethanol-Eluat wies im Vergleich dazu keine signifikante kardiogene Aktivität auf.



**Abb. 33:** Identifizierung der kardiogenen Inhaltsstoffe von WS®1442 im mESC-Differenzierungsassay. Die murinen ES-Zellen werden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und von Tag 4 bis Tag 6 mit Substanzen, deren kardiogene Wirkung untersucht werden soll, behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluorezenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluorezenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Dabei wurden sowohl isolierte Fraktionen nach den unterschiedlichen Methoden von Chatterjee *et al.* (A) und Vennat *et al.* (B) als auch Einzelsubstanzen wie kommerziell erhältliche Referenzsubstanzen (C) und von Hensel *et al.* isolierte OPC (D) untersucht. DP=Polymerisierungsgrad (*degree of polymerization*). Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Die Testung verschiedener Einzelsubstanzen belegte die Hypothese, dass die kardiogene Aktivität auf eine hochmolekulare Stoffklasse zurückzuführen ist. Monomere Einzelsubstanzen niedrigen Molekulargewichts zeigten sich ebenso inaktiv wie das dimere Procyanidin B2 und das trimere Procyanidin C1 (Abbildung 33, C), wohingegen die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hensel (Münster) aus der Arzneipflanze isolierten OPC ab einem Polymerisationsgrad (DP) von  $\geq 7$  eine kardiogene Aktivität aufwiesen (Abbildung 33, D). Basierend auf diesen Ergebnissen scheint das aktive Prinzip des Weißdorn-Spezialextraktes WS®1442 als Stimulator der kardialen Differenzierung von pluripotenten Stammzellen in erster Linie auf höhermolekulare oligomere Procyanidine zurückzuführen zu sein. Es kann allerdings

nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere hochmolekulare Substanzen, die bei den entsprechenden Fraktionierungsverfahren im Methanol Eluat (nach Vennat *et al.*) oder im Ultraretentat (nach Chatterjee *et al.*) angereichert wurden, zum kardiogenen Wirkspektrum beitragen.

### 5.5. Charakterisierung des Wirkmechanismus von WS<sup>®</sup>1442 auf zellulärer Ebene mittels qPCR

Nachdem die kardiogene Wirkung von WS<sup>®</sup>1442 bereits auf Protein-Ebene validiert werden konnte, sollte darüber hinaus auch die Validierung auf mRNA-Ebene erfolgen, wobei mittels qPCR die Anwesenheit ausgewählter kardialer Markergene untersucht wurde. Diese Experimente waren aber nicht nur für die weitere Validierung essentiell, sondern auch für ein besseres Verständnis des Wirkprofils des Extraktes und seiner aktiven Inhaltsstoffe auf zellulärer Ebene.

Um den zugrunde liegenden Wirkmechanismus näher untersuchen zu können und die Zellpopulation, die in dem Expositionszeitraum von Tag 4 bis Tag 6 adressiert wird, benennen zu können, wurden zunächst zu verschiedenen Zeitpunkten des Differenzierungsassays Zellproben genommen und diese anschließend auf entwicklungsbiologische Marker untersucht, um anhand dessen ein Profil des Differenzierungsverhaltens der Zellen während des elftägigen Assay-Zeitraumes zu erhalten. Dabei wurden die Zellen von Tag 4 bis Tag 6 entweder mit DMSO, dem Gesamtextrakt WS<sup>®</sup>1442 (0,3 mg/mL) oder dem Methanol Eluat (0,1 mg/mL) behandelt. Die entwicklungsbiologischen Marker wurden dahingehend gewählt, dass vor allem die kardiopoietische Differenzierung der Zellen von der Mesoderm-Induktion und -Strukturierung bis hin zu der Kardiomyozyten-Ausbildung genauer untersucht werden konnte<sup>[154],[188]</sup> (Abbildung 34, A).

Die Expression des *basic helix-loop-helix* Transkriptionsfaktors *Mesoderm posterior 1* (*Mesp1*) stellt dabei den ersten bekannten molekularen Schritt der Kardiogenese dar und wird während der murinen Embryonalentwicklung in der Phase der Ausbildung des Primitivstreifens durch den T-box Transkriptionsfaktor Eomesodermin (Eomes) initiiert<sup>[264]</sup>. *Mesp1* steuert die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren sowie die Repression pluripotenzerhaltender Gene und fördert so die kardiovaskuläre Spezifizierung<sup>[265]</sup>. Die Anwesenheit von *Mesp1*<sup>+</sup> kardiovaskulären Vorläuferzellen konnte hierbei an Tag 4, dem Zeitpunkt der Behandlung der Zellen mit DMSO, WS<sup>®</sup>1442 oder dem Methanol Eluat, nachgewiesen werden, woraus zudem geschlossen werden konnte, dass die (kardiale) Mesoderm-Ausbildung bereits erfolgt war. Darüber hinaus war dem Expressionsprofil zu entnehmen, dass diese Zellpopulation im Expositionszeitraum bis Tag 6 signifikant abnahm und schließlich an Tag 8 kaum noch auf Transkriptionsebene nachweisbar war, wobei die WS<sup>®</sup>1442- und Eluat-behandelten Zellen jeweils geringfügig höhere *Mesp1*-Expressionslevel aufwiesen als die Kontrolle.

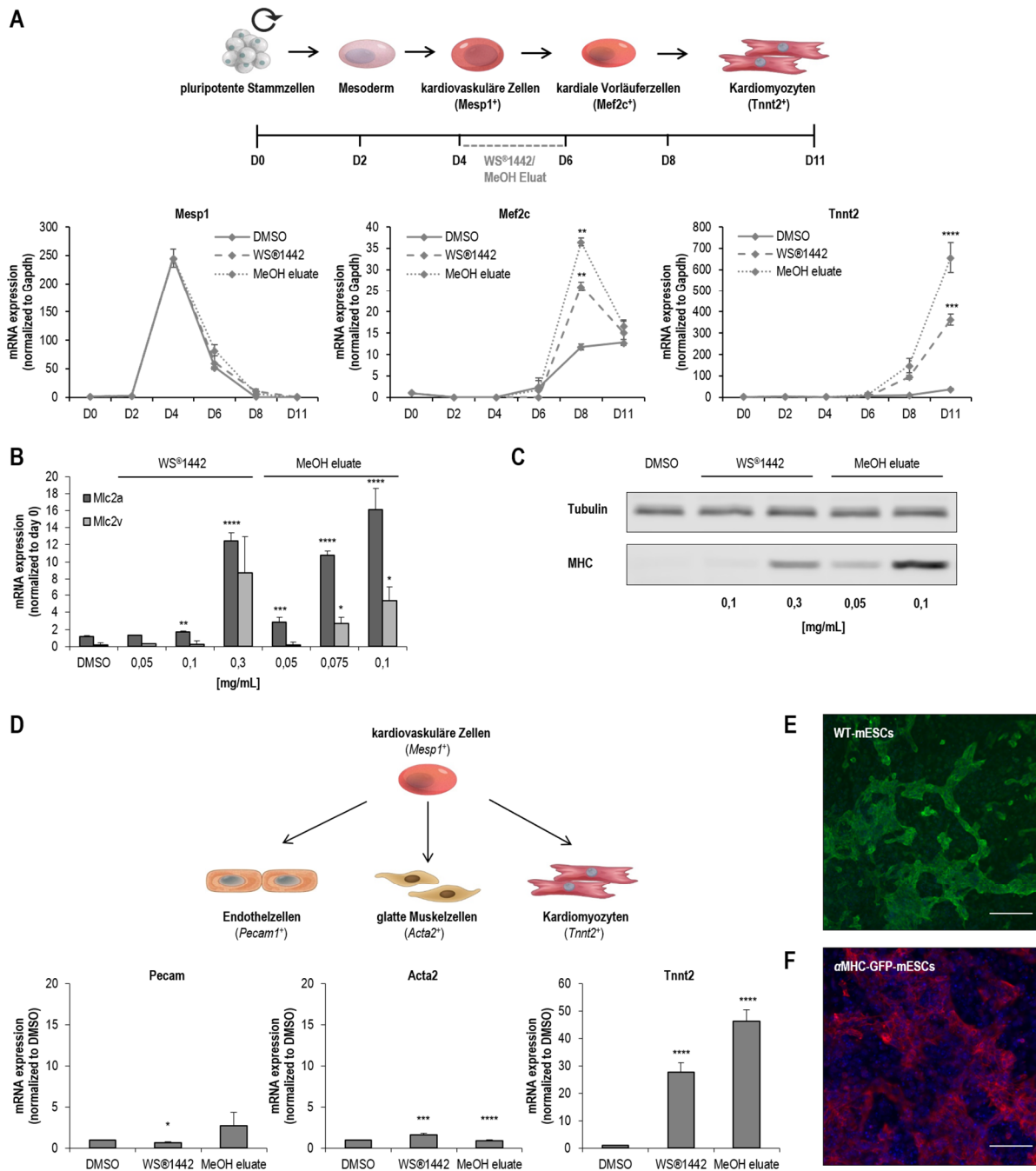
*Mesp1*-exprimierende Zellen formen das *first heart field* (FHF) sowie kardiale Vorläufer des *second heart field* (SHF), die beide wiederum im Zuge einer kardialen Spezifizierung durch die Expression weiterer kardialer Transkriptionsfaktoren wie *Nkx2.5*, *GATA4* und *Mef2c* gekennzeichnet sind<sup>[264]</sup>. Der Übergang der Phasen der kardiovaskulären und der kardialen Spezifikation ist dabei anhand der Expressionsprofile gut erkennbar. Während hierbei die *Mesp1*-Expressionslevel zwischen Tag 6 und Tag 8 auf nahezu Null absinken, beginnt in demselben Zeitraum die *Mef2c*-Expression anzusteigen, wobei diese durch die Behandlung der Zellen mit dem Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 und seinen in dem Methanol Eluat angereicherten aktiven Inhaltsstoffen signifikant stimuliert wurde. Es war zu erkennen, dass die DMSO-Kontrolle diesen Entwicklungsschritt der kardialen Spezifikation nur moderat zu steigern vermochte, während WS<sup>®</sup>1442 und das Methanol Eluat diesen signifikant förderte. Dieses hat zur Folge, dass im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle signifikant mehr *Mef2c*<sup>+</sup> kardiale Vorläuferzellen vorlagen, die sich in dem nachfolgenden kardiopoietischen Differenzierungsschritt der Kardiomyozyten-Induktion zu Kardiomyozyten ausbilden konnten, was an dem Expressionsprofil des Kardiomyozyten-Markers *Tnnt2* verifiziert werden konnte. Dabei zeigte sich ebenfalls, dass der kardiogene Effekt des Gesamtextraktes durch eine Anreicherung der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe im Eluat gesteigert werden konnte.

Das Expressionsprofil der beiden bedeutsamsten *myosin-light-chain 2* Isoformen, *Mlc2a* und *Mlc2v*, kann darüber hinaus Auskunft über die Diversität und die Reife der gebildeten Kardiomyozyten geben<sup>[266]</sup>. Während der gerichteten kardialen Differenzierung<sup>[266],[267]</sup> sowie der embryonalen Entwicklung des Herzens<sup>[268]</sup> wird dabei *Mlc2a* zeitlich vor *Mlc2v* exprimiert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird die *Mlc2a*-Expression bei der Ausbildung des Ventrikels herunterreguliert und beschränkt sich in adulten Herzen auf die Atrien<sup>[268]</sup>. *Mlc2a* wird zudem in differenzierenden Zellen exprimiert, die sich noch entweder in atriale oder ventrikuläre Kardiomyozyten entwickeln können, während *Mlc2v* ein selektiverer bzw. eindeutigerer Marker für ventrikuläre Kardiomyozyten ist<sup>[267]</sup>. Auf Grund dessen betonen Bhattacharya *et al.*, dass für eine Bewertung der Effizienz der Kardiogenese sowie der Identität der Kardiomyozyten-Subtypen nicht ausschließlich die Anwesenheit und Expressionshöhe kardialer Marker betrachtet werden sollte, sondern auch beachtet werden muss, welche entwicklungsbiologische Phase zum untersuchten Zeitpunkt der Differenzierung abgebildet wird<sup>[269]</sup>. In dem vorliegenden Fall wurden das Expressionsprofil von *Mlc2a* und *Mlc2v* wie oben beschrieben anhand von Proben untersucht, die an Tag 11 erhalten und zuvor von Tag 4 bis Tag 6 mit verschiedenen Konzentrationen des Gesamtextraktes und des Methanol Eluats behandelt worden waren (Abbildung 34, B). Sowohl die WS<sup>®</sup>1442- als auch die Eluat-behandelten Zellen zeigten hierbei einen dosisabhängigen Anstieg der *Mlc2a*- und *Mlc2v*-Expression, wobei interessanterweise der atriale Phänotyp stärker vertreten war als der ventrikuläre. Dieses könnte womöglich dahingehend gedeutet werden, dass die Kardiomyozyten, die an Tag 11 in diesem Differenzierungsassay erhalten werden, einen frühen und unreifen Phänotyp darstellen. In diesem Zusammenhang verglichen Liang *et al.* in ihren Arbeiten mit humanen PS-Zellen die *MLC2a*- und *MLC2v*-

Expression 20, 40 und 60 Tage nach Induktion der (kardialen) Differenzierung. Die Autoren konnten dabei zeigen, dass nach 20 Tagen fast alle TNNT<sup>+</sup>-Zellen MLC2a<sup>+</sup> waren und MLC2v<sup>+</sup>-Zellen kaum nachweisbar waren, wohingegen nach 60 Tagen 50 % der TNNT<sup>+</sup>-Zellen MLC2v exprimierten und der Anteil MLC2a<sup>+</sup>-Zellen um 80 % gesunken war<sup>[266]</sup>. Darüber hinaus belegen umfangreiche Untersuchungen von Li *et al.* mittels *single cell* PCR Array-Technologie an mESC-abgeleiteten, murinen neonatalen und adulten Kardiomyozyten, dass die mESC-abgeleiteten Kardiomyozyten denen aus dem embryonalen Mäuseherzen bis zu der neonatalen Phase stark ähneln, wobei eine Kardiomyozyten-Reifung, die normalerweise in der neonatalen Entwicklung einsetzen würde unter den Bedingungen der mESC-*in vitro*-Differenzierung auszubleiben scheint<sup>[270]</sup>.

Folglich belegt die erhöhte *Mlc2a*-Expression der Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen zum einen die im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gesteigerte Kardiogenese und weist darauf hin, dass es sich um einen unreifen Kardiomyozyten-Subtyp handelt, der an Tag 11 der mESC-Differenzierung erhalten wird. Es finden sich darüber hinaus aber auch interessante Belege, dass der erhaltene Phänotyp in einer substanzinduzierten Subtypen-Spezifizierung begründet liegen könnte, die durch die Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat von Tag 4 bis Tag 6 gefördert wird. Gassanov *et al.* zeigten in diesem Zusammenhang, dass die Behandlung muriner ES-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung mit Retinsäure (RA) die kardiale Differenzierung stimuliert und zudem die Ausbildung eines atrialen Phänotyps fördert<sup>[271]</sup>. Des Weiteren belegen Arbeiten von Zhang *et al.* mit humanen ES-Zellen, dass eine gerichtete Differenzierung atrialer und ventrikulärer Kardiomyozyten durch Modulation des RA-Signalweges möglich ist, wobei 94 % der Noggin- und RA-behandelte Zellen den atrialen Phänotyp aufwiesen, wohingegen 83 % der Noggin- und RAi-behandelten Zellen das elektrophysiologische Profil ventrikulärer Kardiomyozyten zeigten<sup>[272]</sup>. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse einer Transkriptomanalyse mit WS<sup>®</sup>1442- und Methanol Eluat-behandelten Zellen, dass das Gen *Aldh1a2*, welches für das Enzym codiert, das die Synthese von Retinsäure aus Retinaldehyd katalysiert, durch die Substanzbehandlung signifikant hochreguliert war (Kapitel 5.8.4.). Dementsprechend wäre es möglich, dass WS<sup>®</sup>1442 und seine in dem Methanol Eluat angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffe über eine *Aldh1a2*-Überexpression und den RA-Signalweg die Kardiogenese fördern und dabei insbesondere die Ausbildung des atrialen Phänotyps fördern.

Lescroart *et al.* sowie Devine *et al.* wiesen in ihren Studien zur Verfolgung der kardialen Entwicklung *in vivo* nach, dass Zellen des *first heart field* (FHF) ausschließlich Endothelzellen oder Kardiomyozyten, aber nie beide Zelltypen hervorbringen, wohingegen Zellen des *second heart field* (SHF) entweder Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen oder Kardiomyozyten und Endothelzellen entstehen lassen<sup>[273],[274]</sup>. Jüngste Arbeiten von Li *et al.* kamen zu einem ähnlichen Ergebnis, wobei sich mESC-abgeleitete Nkx2.5<sup>+</sup> kardiale Vorläuferzellen vornehmlich in Kardiomyozyten oder glatte Muskelzellen entwickelten und solche embryonalen Ursprungs entweder in Kardiomyozyten oder Endothelzellen<sup>[270]</sup>.



**Abb. 34:** Untersuchung des Einflusses von WS®1442 auf die Expression entwicklungsbiologischer Markergene während der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen werden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und von Tag 4 bis Tag 6 mit DMSO, WS®1442 und dem Methanol Eluat in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Expression der jeweiligen Markergene wurde auf das *housekeeping* Gen *Gapdh* normiert. Für das Expressionsprofil während des Assays wurden in Zweitagesabständen Zellproben genommen und auf Anwesenheit der Marker für kardiovaskuläre Zellen (*Mesp1*<sup>+</sup>), kardiale Vorläuferzellen (*Mef2c*<sup>+</sup>) und Kardiomyozyten (*Tnnt2*<sup>+</sup>) untersucht (**A**) ( $p \leq 0.05 = *$ ,  $p \leq 0.01 = **$ ,  $p \leq 0.001 = ***$ ,  $p \leq 0.0001 = ****$ ). Die Zellproben von Tag 11 wurden zudem auf die Kardiomyozyten-Subtyp-Marker *Mlc2a* und *Mlc2v* (**B**) sowie zusätzlich auf die Marker für Endothelzellen (*Pecam*) und glatte Muskelzellen (*Acta2*) untersucht (**D**). Auf Protein-Ebene wurde darüber hinaus die Kardiogenese mittels Western Blot und dem Antikörper *anti*-MHC (**C**) sowie fluorezenzmikroskopisch mit dem Antikörper *anti*-Tnnt2 in der Wildtyp- (**E**) und der Reporterzelllinie verifiziert (**F**). Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m.

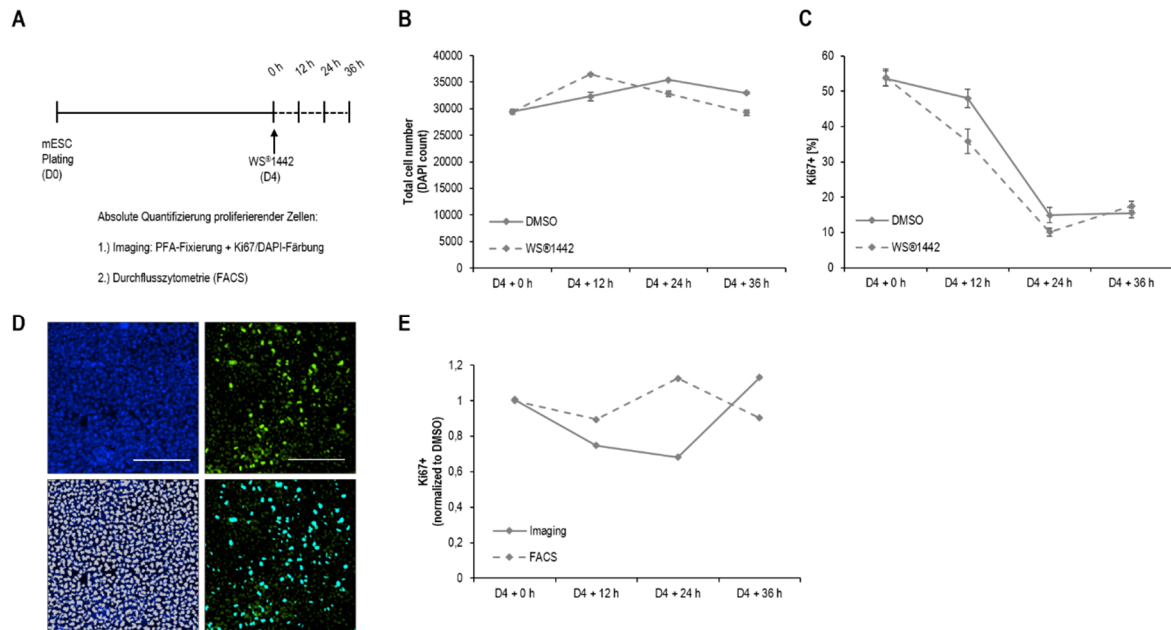
Nachdem die Kardiogenese sowohl auf mRNA-Ebene (Abbildung 34, A/B) als auch auf Protein-Ebene u.a. mittels Western-Blot (Abbildung 34, C) nachgewiesen und die *Mesp1*<sup>+</sup> kardiovaskulären Vorläuferzellen als diejenige Zellpopulation identifiziert werden konnte, die möglicherweise von WS<sup>®</sup>1442 kardiogen stimuliert wird, sollte in Anlehnung an die oben genannten Referenzen zudem untersucht werden, ob die Differenzierung dieser Zellen ausschließlich hin zu Kardiomyozyten (*Tnnt2*<sup>+</sup>) erfolgt oder auch andere mesodermspezifische Zellpopulationen wie Endothelzellen (*Pecam*<sup>+</sup>) oder glatte Muskelzellen (*Acta2*<sup>+</sup>) gebildet werden. Hierzu wurden dieselben Zellproben von Tag 11 verwendet, die zuvor auch für das Differenzierungsprofil der Zellen im gesamten Assay verwendet wurden, und bezüglich der Expression der Marker *Pecam*, *Acta2* und *Tnnt2* untersucht, wobei die jeweils für die Proben WS<sup>®</sup>1442 und Methanol Eluat erhaltenen Expressionswerte als Vielfaches der DMSO-Kontrolle dargestellt wurden, um den über die ungerichtete Differenzierung hinausgehenden Effekt eindeutiger herauszustellen. Dadurch war zu erkennen, dass in Folge der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat die kardiovaskulären Vorläuferzellen nicht zu Endothelzellen oder glatte Muskelzellen differenzieren, sondern spezifisch zu Kardiomyozyten (Abbildung 34, D). Diese *Tnnt2*<sup>+</sup> Kardiomyozyten konnten zudem fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des *Tnnt2*-Antikörpers sowohl in der Wildtyp- als auch der Reporterzelllinie nachgewiesen werden (Abbildung 34, E/F).

### 5.6. Untersuchung eines proliferationsstimulierenden Effektes von WS<sup>®</sup>1442 auf frühe kardiale Vorläuferzellen

Die kardiogene Aktivität des Weißdorn-Extraktes WS<sup>®</sup>1442 auf die im Expositionszeitraum von Tag 4 bis Tag 6 vorliegende Zellpopulation könnte entweder in einem proliferationsstimulierenden oder einem differenzierungsfördernden Wirkmechanismus begründet liegen. Während bei letzterem womöglich die kardiale Spezifizierung früher kardialer Vorläuferzellen stimuliert wird, könnte diese Zellpopulation möglicherweise auch durch die Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und seiner in dem Methanol Eluat angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffen in ihrer Proliferation angeregt werden, sodass mehr Zellen vorliegen, die sich der kardialen Differenzierung folgend zu Kardiomyozyten ausbilden können.

Der Einfluss einer proliferationsfördernden Wirkkomponente sollte dabei zum einen durch die numerische Bestimmung der Zellen mittels einer DAPI-Zellkernfärbung erfolgen und zum anderen mit Hilfe des Antikörpers *anti-Ki67*, der sich aktiv teilende Zellen in allen Phasen des Zellzyklus (späte G1-, S-, M- und G2-Phase) außerhalb der G0-Phase markiert. Hierbei wurde für die Quantifizierung der DAPI<sup>+</sup>- und *Ki67*<sup>+</sup>-Zellen sowohl die automatische Bild-Analyse (*Imaging*) als auch die Durchflusszytometrie verwendet. In beiden Fällen wurden die Zellproben zu denselben Zeitpunkten (0 h, 12 h, 24 h, 36 h) nach Behandlung der Zellen mit dem Weißdorn-Extrakt an Tag 4 gewonnen und nach dem jeweiligen Protokoll zum Fixieren, Permeabilisieren und Anfärben der Zellen aufbereitet (Abbildung 35, A).





**Abb. 35:** Untersuchung eines proliferationsstimulierenden Effektes von WS®1442. Die murinen ES-Zellen werden über 4 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und am vierten Tag mit WS®1442 bzw. DMSO behandelt. Nach den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen PFA-fixiert und mit DAPI sowie dem *Ki67*-Antikörper angefärbt und anschließend fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des Antikörper- und DAPI-Fluoreszenzsignales) (A). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand der Quantifizierung DAPI<sup>+</sup> Zellen mit Hilfe des *Imaging*-Algorithmus *Multiwavelength Cell Scoring* (B). Der Anteil proliferierender Zellen wurde anhand der *Ki67*<sup>+</sup> Zellen bestimmt (C-D). Maßstabsbalken = 500 µm. Die erhaltenen Quantitäten wurden denen aus der parallel durchgeführten durchflusszytometrischen Bestimmung gegenübergestellt (E).

Die absolute Quantifizierung der DAPI<sup>+</sup>-Zellen mit Hilfe der automatischen Bild-Analyse zeigte dabei sowohl für die DMSO- als auch die WS®1442-behandelten Zellen innerhalb der ersten zwölf Stunden der Behandlung einen leichten Anstieg der Zellzahl (Abbildung 35, B). Dieser Effekt war bei WS®1442 geringfügig ausgeprägter, worauf jedoch eine Abnahme der Zellzahl innerhalb des weiteren Expositionszeitraumes folgte. Dahingegen stieg die Zellzahl der kontrollbehandelten Zellen innerhalb von 24 h auf das zuvor erreichte Ausmaß der WS®1442-behandelten Zellen nach 12 h an, bevor eine moderate Minderung der Zellzahl zu verzeichnen war. Der Verlauf der Zellzahl innerhalb der 36-stündigen Behandlung der Zellen mit dem Weißdorn-Extrakt könnte folglich dahingehend interpretiert werden, dass WS®1442 innerhalb der ersten zwölf Stunden einen moderaten proliferationsstimulierenden Effekt auf die Zellen ausübt, jedoch dessen lange Verweildauer auf den Zellen die Viabilität der Zellen durch toxische Einflüsse einschränkt und in Folge dessen die Zellzahl abnimmt. Insgesamt ist der Unterschied der Zellzahl WS®1442- und kontrollbehandelter Proben zueinander, aber auch im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt, nur minimal, sodass hierbei lediglich ein moderater Effekt zu verzeichnen war.

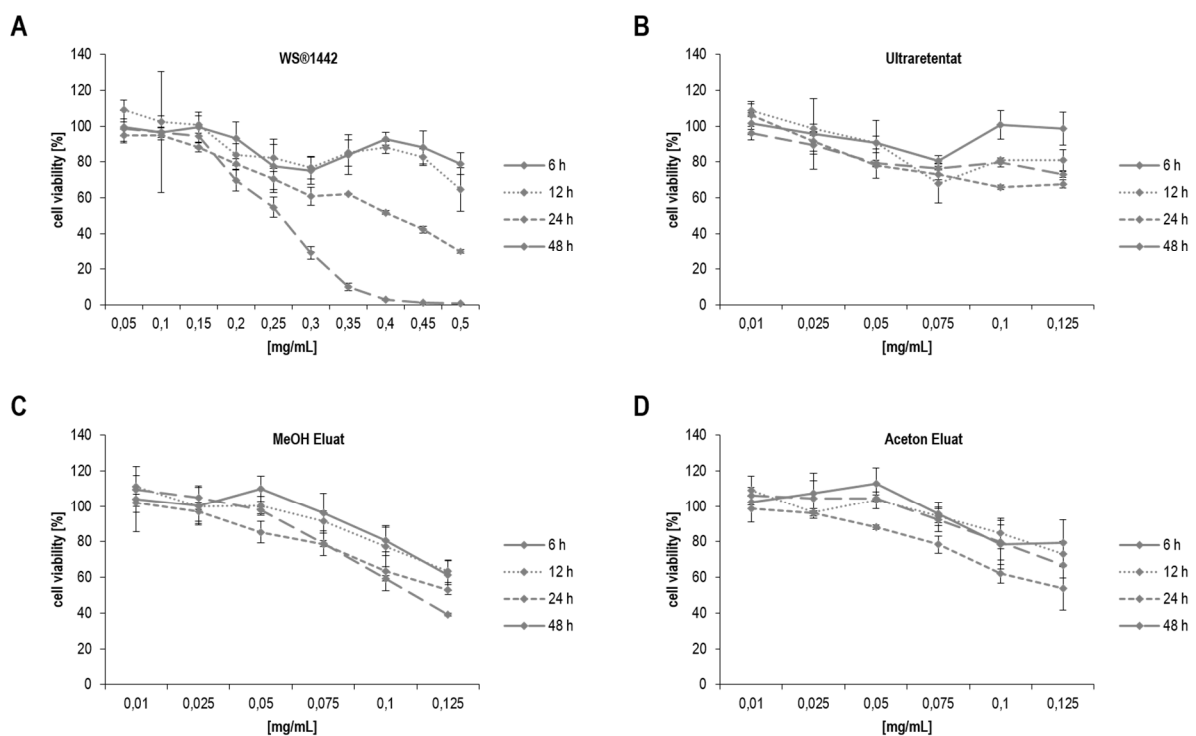
Darüber hinaus sollte nicht nur die absolute Zahl aller Zellen erfasst werden, sondern mit Hilfe des *Ki67*-Antikörpers auch der Anteil der tatsächlich aktiv proliferierenden Zellen, um den möglichen proliferationsstimulierenden Effekt von WS®1442 zu

überprüfen. Die automatische Bild-Analyse zeigte dabei, dass der Anteil an proliferierenden Zellen innerhalb der ersten 24 h der DMSO- und WS<sup>®</sup>1442-Behandlung rapide von 55 % auf 10 % Ki67<sup>+</sup>-Zellen abfiel, wobei in diesem Verlauf der prozentuale Anteil sich teilender Zellen bei den DMSO-behandelten Zellen jeweils geringfügig höher war (Abbildung 35, C/D). Innerhalb der ersten zwölf Stunden, in denen für die WS<sup>®</sup>1442-behandelten Zellen über die Zellkernzählung ein möglicher proliferationsstimulierender Effekt festgestellt wurde, war der Unterschied zwischen DMSO und WS<sup>®</sup>1442 jedoch besonders ausgeprägt. Um den Proliferationsbeeinflussenden Effekt des Weißdorn-Extraktes gegenüber der DMSO-Kontrolle genauer kenntlich zu machen, wurden die mittels Durchflusszytometrie und *Imaging* ermittelten Ki67<sup>+</sup>-Werte auf DMSO normalisiert (Abbildung 35, E). Die beiden Methoden zeigten dabei für die Zellen nach 12-stündiger WS<sup>®</sup>1442-Behandlung eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Proliferationsrate, die nach 24-stündiger bzw. 36-stündiger Expositionsdauer wieder kurzzeitig das DMSO-Niveau erreichte bzw. dieses leicht übertraf. Ein signifikanter proliferationsstimulierender Effekt ist für WS<sup>®</sup>1442 anhand der oben gezeigten Daten nicht eindeutig zu erkennen. Vielmehr lassen vor allem die Ergebnisse der Zellkernzählung aber den Schluss eines möglichen toxischen Einflusses des Extraktes bei längerer Expositionsdauer zu.

In diesem Zusammenhang bieten kommerziell erhältliche Assay-Kits die Möglichkeit die Zellviabilität und -proliferation genauer zu untersuchen und somit die zuvor erhaltenen Ergebnisse zu validieren. Hierbei wurde u.a. der *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Assay verwendet, mit Hilfe dessen metabolisch aktive Zellen über eine ATP-abhängige Luciferase-Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin nachgewiesen und an deren Gesamtzahl toxische und proliferative Effekte abgelesen werden konnten. Für die Untersuchung eines durch den Extrakt und seiner in den Fraktionen angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffe induzierten toxischen und/oder proliferationsstimulierenden Effektes wurden die Zellen an Tag 4 erneut mit WS<sup>®</sup>1442 sowie den Fraktionen mit der höchsten kardiogenen Aktivität (Ultraretentat, Methanol und Aceton Eluat) behandelt und nach verschiedenen Expositionsdauern (0 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h) die Zellviabilität und -proliferation untersucht. Damit sollte zum einen die frühe Phase der Behandlung genauer untersucht werden, da die oben genannten Ergebnisse einen raschen Einfluss des Weißdorn-Extraktes auf die Zellen innerhalb der ersten zwölf Stunden vermuten ließen, und zum anderen ein toxischer Einfluss durch eine lange Expositionsdauer.

Hierbei zeigte sich, dass mit zunehmender Expositionsdauer sowohl mit dem Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 als auch mit den aus ihm gewonnenen kardiogenen Fraktionen die Zahl metabolisch aktiver Zellen bzw. die metabolische Aktivität pro Zelle weniger wurde (Abbildung 36, A-D). Dieser (toxische) Effekt war gleichzeitig durch eine Dosisabhängigkeit gekennzeichnet. Dass Konzentrationen des Extraktes ab 0,3 mg/mL die Viabilität der Zellen einschränken, war aus dem phänotypischen *Readout* an Tag 11 des Assays bereits bekannt, jedoch galten die Konzentrationen unterhalb dieser kritischen Grenze bisher als unbedenklich und erwiesenermaßen kardiogen. Vor allem die Konzentrationen von 0,25 mg/mL WS<sup>®</sup>1442 bzw. 0,1 mg/mL

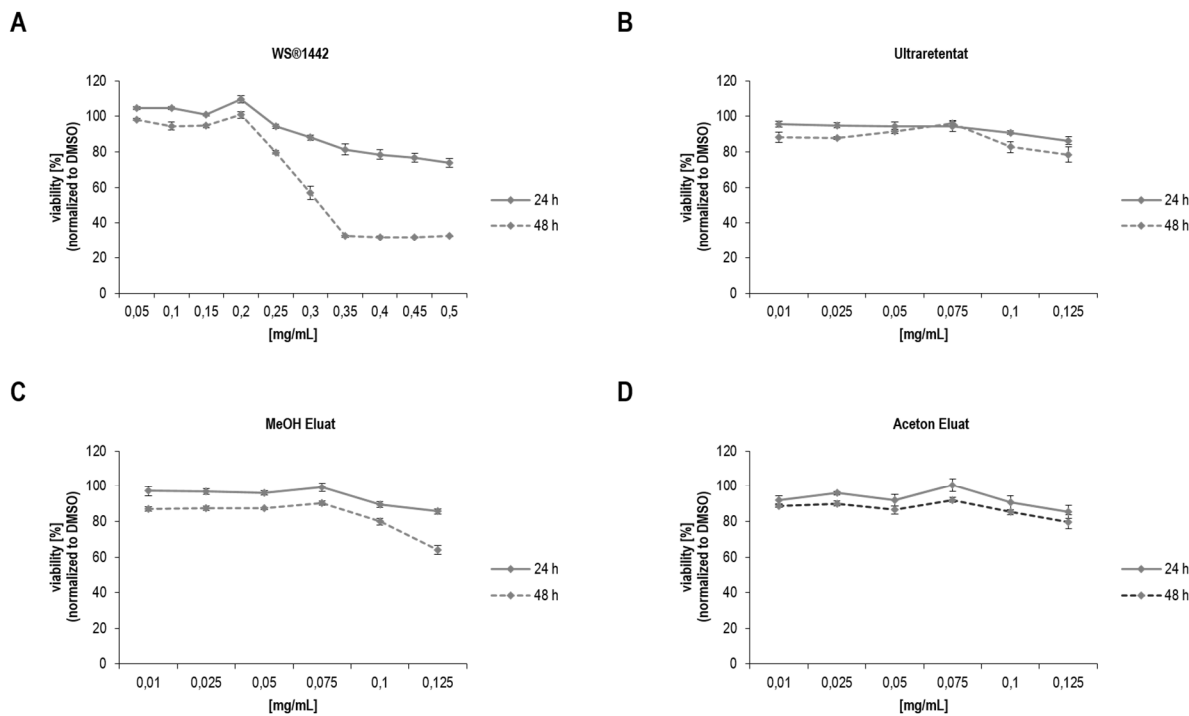
Methanol Eluat zeigen in diesem Zusammenhang die höchste kardiogene Aktivität, scheinen jedoch die Zellviabilität auf bis zu 60 % herabzusetzen (Abbildung 36, A+C). Ein möglicher Erklärungsansatz dafür, dass diese Konzentrationen nichtsdestotrotz kontrahierende Kardiomyozyten ausbilden, könnte eine regenerierende Phase nach Beendigung der Substanzbehandlung sein. Während für den *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Assay lediglich Proben eingesetzt wurden, die innerhalb der 48-stündigen Expositionsdauer erhalten wurden, folgt in dem *HT*-Assay darüber hinaus eine fünftägige Weiterkultivierung bis Tag 11, in der sich die Zellen über remodelierende Mechanismen erholen könnten. Zudem wäre es denkbar, dass durch diesen substanzinduzierten Stress ein Selektionsdruck auf bestimmte Zellpopulationen ausgeübt wird, sodass in der Folge vor allem diese einer kardiopoietischen Entwicklung folgen. Ein proliferationsstimulierender Einfluss kann anhand dieser ermittelten Daten jedoch ausgeschlossen werden.



**Abb. 36:** Lumineszenzbasierte Viabilitätsassays (*CellTiter-Glo*<sup>®</sup>) mit murinen ES-Zellen zur Untersuchung eines proliferationsstimulierenden Effektes von WS®1442. Die murinen ES-Zellen werden über 4 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und am vierten Tag mit WS®1442 und den kardiogenen Fraktionen in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gemäß dem Herstellerprotokoll lysiert, mit dem Substrat inkubiert und anschließend am Tecan *plate reader* vermessen. Die detektierten Signalintensitäten wurden auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) normiert (A-D).

Mit Hilfe des *WST-1 CytoScan*<sup>®</sup>-Assays sollte darüber hinaus ein weiterer Assay den Einfluss des Weißdorn-Extraktes und seiner Fraktionen auf Viabilität und Proliferation der frühen kardialen Vorläuferzellen bestimmen. Hierbei beruht das Prinzip des Assays auf der Reduktion des Tetratzoliums Salzes WST-1 zum Formazan durch zelluläre Dehydrogenasen, wobei das entstandene gelbe Formazan anschließend fluorimetrisch detektiert (420-480 nm) werden kann und direkt mit der Zellzahl

korreliert. Auch hier wurden die Zellen zuvor Extrakt- bzw. Eluat-behandelt, wobei die Expositionsdauer 24 bzw. 48 h betrug. Im Gegensatz zum *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Assay stagnierte hierbei die Viabilität jedoch im Falle Extrakt-behandelter Zellen bis zu einer Konzentration von 0,2 mg/mL und im Falle Eluat-behandelter Zellen bis zu einer Konzentration von 0,075 mg/mL bei nahezu 100 % ehe toxische Effekte erkennbar waren (Abbildung 37, A-D). Übereinstimmend mit dem *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Assay war hingegen der toxische Einfluss der Expositionsdauer sowie die signifikant höhere Toxizität des Gesamtextraktes im Vergleich zu den getesteten Fraktionen.



**Abb. 37:** Fluoreszenzbasierte Viabilitätsassays (*WST-1 CytoScan*<sup>®</sup>) mit murinen ES-Zellen zur Untersuchung eines pro-proliferativen Effektes von WS<sup>®</sup>1442. Die murinen ES-Zellen werden über 4 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und am vierten Tag mit WS<sup>®</sup>1442 und den kardiogenen Fraktionen in den oben angegebenen Konzentrationen behandelt. Nach den oben angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gemäß dem Herstellerprotokoll lysiert, mit dem Substrat inkubiert und anschließend fluorimetrisch vermessen. Die detektierten Signalintensitäten wurden auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) normiert (**A-D**).

Folglich könnten diese Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass insbesondere der ATP-abhängige Metabolismus der Zellen stressbedingt abgesenkt wird, die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle bei nicht-toxischen Konzentrationen jedoch kaum beeinflusst wird und dementsprechend ein proliferationsstimulierender Effekt ausgeschlossen werden kann. Toxische Effekte waren vor allem bei den WS<sup>®</sup>1442-behandelten Zellen zu beobachten, wohingegen diese bei dem Ultraretentat sowie dem Methanol Eluat deutlich weniger stark ausgeprägt waren. Diese beiden Fraktionen weisen jedoch eine bedeutend höhere kardiogene Aktivität als der Gesamtextrakt auf, woraus möglicherweise geschlossen werden könnte, dass vor allem das Vielstoffgemisch Weißdorn-Extrakt eine stressinduzierende Komponente enthält, die sich aber nicht primär für den kardiogenen Wirkmechanismus verantwortlich zeichnet. Interessanterweise belegen in diesem Zusammenhang die Expressionsprofile, die durch die Transkriptomanalyse nach 6- und 24-stündiger

Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat erhalten wurden, dass mehrere Marker einer stressinduzierten Zellantwort wie *Atf3* und *Ptgds* hochreguliert waren, wobei die Expressionslevel Eluat-behandelter Zellen jedoch jeweils höher waren (Kapitel 5.8.2./5.8.4.).

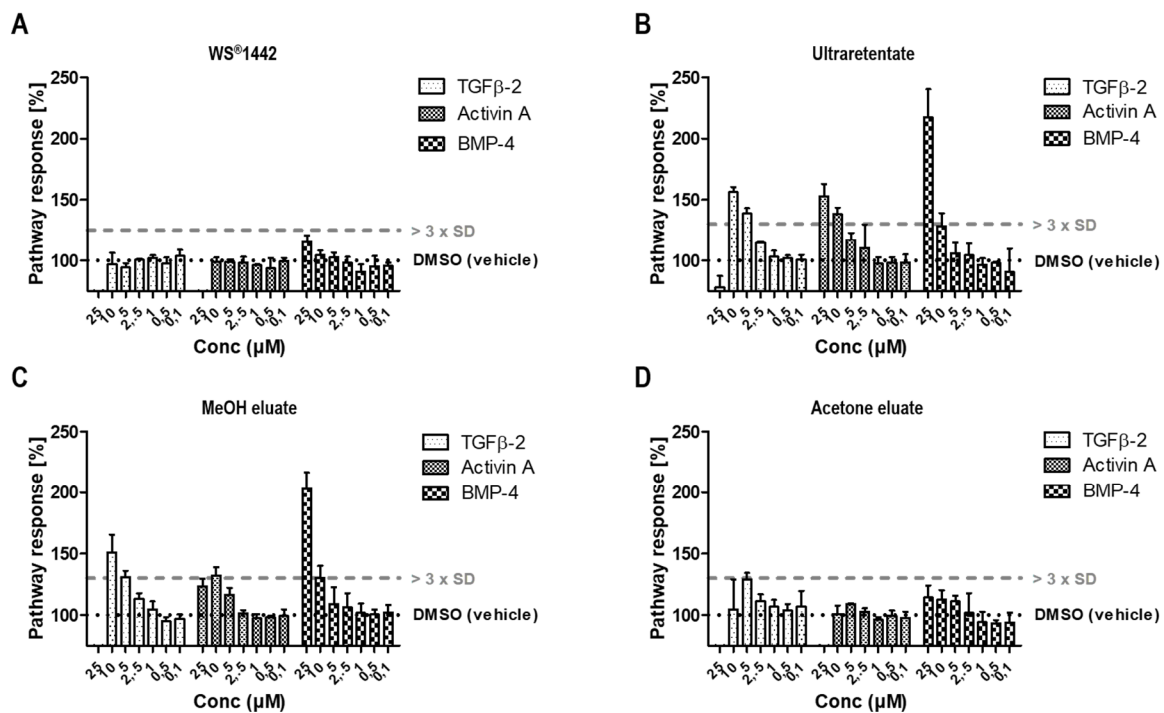
### 5.7. Untersuchung der Modulation entwicklungsbiologischer Signalwege durch WS<sup>®</sup>1442 und Extrakt-Fractionen

Nachdem ein proliferationsstimulierender Wirkmechanismus des Weißdorn-Extraktes WS<sup>®</sup>1442 weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, sollte untersucht werden, ob die kardiogene Aktivität in der Modulation eines für die kardiopoietische Differenzierung entscheidenden Signalweges begründet liegt. In diesem Zusammenhang konnte mit Hilfe literaturbekannter kardiogener Substanzen bereits evaluiert werden, welche Signalwege in dem Assay-Zeitfenster, in dem die weißdorninduzierte Kardiogenese zu beobachten war, von Bedeutung waren (Abbildung 17, Kapitel 3.5.). Die TGF $\beta$ -Inhibitoren zeigten wie der Weißdorn-Extrakt WS<sup>®</sup>1442 und seine kardiogenen Fraktionen ebenfalls von Tag 4 bis Tag 6 ihre höchste kardiogene Aktivität, woraus geschlossen werden könnte, dass der weißdorninduzierten Kardiogenese ein TGF $\beta$ -inhibierender Wirkmechanismus zugrunde liegen könnte. Da überlappend zu diesem Zeitfenster aber auch die Inhibierung des BMP-Signalweges (Tag 3 bis Tag 5) bzw. des Wnt-Signalweges (Tag 5 bis Tag 7) eine kardiogenesefördernde Rolle spielen könnte, sollte der Wirkmechanismus mit Hilfe der im Arbeitskreis etablierten Reporterassays näher untersucht werden.

Hierbei sollte zunächst die Aktivität des Extraktes WS<sup>®</sup>1442 und seiner kardiogenen Fraktionen auf den TGF $\beta$ -, Activin A- und BMP-Signalweg untersucht werden, wobei ein in der Arbeitsgruppe etablierter dualer Reporterassay verwendet wurde, bei dem HEK293T-Zellen transient mit einem Firefly-Luciferase- und einem Renilla-Luciferase-Plasmid (pRL-TK) co-transfiziert werden<sup>[192],[275]</sup>. Die Bestimmung der Aktivität auf den TGF $\beta$ -/Activin A-Signalweg wurde dabei mit dem Reporterplasmid pSBE4-Luc durchgeführt, während für die BMP-Aktivitätsbestimmung das Reporterplasmid pBRE-Luc verwendet wurde. Die Sequenz des *Smad binding element 4* (SBE bzw. SBE4 wegen der 4-fachen Wiederholung der Smad-bindenden Sequenz) wurde in diesem Zusammenhang in der Promoterregion des *JunB*-Gens identifiziert, dessen Transkription wiederum durch TGF $\beta$ , Activin A und BMP2 induziert wird<sup>[276]</sup>, wohingegen die des *BMP responsive element* (BRE) dem Promoter des *Id1*-Gens entstammt und durch verschiedene BMPs reguliert wird.

Betrachtet man zunächst die Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 auf den TGF $\beta$ -Signalweg, zeigt sich, dass in den getesteten Konzentrationen (0,1 bis 25  $\mu$ g/mL) weder eine inhibierende noch eine stimulierende Wirkung zu verzeichnen war. Vor allem das Ausbleiben eines inhibierenden Effektes auf den TGF $\beta$ -Signalweg deckt sich nicht mit

den Erwartungen basierend auf den Ergebnissen des Differenzierungsassays, da in diesem die TGF $\beta$ -Inhibierung zu dem Zeitpunkt höchster weißdorninduzierter kardiogener Aktivität die Kardiogenese fördert. Dementsprechend interessant ist das Ergebnis einer starken dosisabhängigen Aktivierung des TGF $\beta$ -Signalweges, das für die kardiogenen Fraktionen erhalten wurde. Insbesondere das Ultraretentat und das Methanol Eluat, in denen die höhermolekularen OPC angereichert sind, vermochten den Signalweg in der höchsten nicht-toxischen Konzentration um 150 % zu steigern (Abbildung 38, B-C). Damit zeichnete sich auch ein ähnliches Bild wie bei der Untersuchung der Aktivität auf den Activin A-Signalweg. Hier war für WS<sup>®</sup>1442 und das Aceton Eluat keine signifikante Aktivität feststellbar (Abbildung 38, A+D), wohingegen das Methanol Eluat dosisabhängig die Aktivität des Signalweges auf 150 % steigerte. Bei dem Ultraretentat fiel diese Aktivierung mit 130 % moderater aus. All diese Ergebnisse stehen damit scheinbar im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen im Differenzierungsassay und legen vielmehr die Vermutung nahe, dass der für die weißdorninduzierte Kardiogenese verantwortliche Mechanismus in seiner kardio generen Potenz so ausgeprägt sein muss, dass dieser den anti-kardiogenen Einfluss einer TGF $\beta$ -Stimulation ausgleicht bzw. überkompensiert.



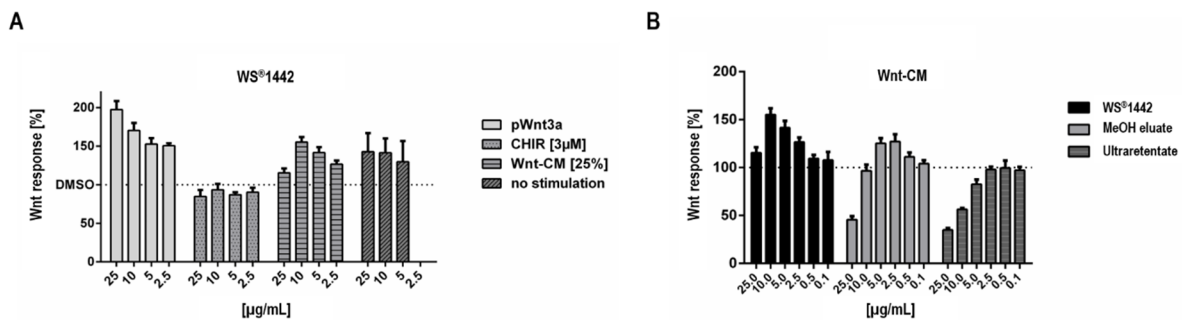
**Abb. 38:** Durchführung verschiedener Reporterassays mit HEK293T-Zellen zur Untersuchung der Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 und seinen kardiogenen Fraktionen auf den TGF $\beta$ - Activin A- und BMP-Signalweg. Die HEK-Zellen wurden mit den Kontroll- (Renilla-Luciferase) und Reporterplasmiden (pSBE4/pBRE-Luc) transfiziert und in den oben angegebenen Konzentrationen mit WS<sup>®</sup>1442 (**A**) und seinen kardiogenen Fraktionen (**B-D**) behandelt. Für die Analyse wurden die Reportersignale auf die der Renilla-Kontrolle normiert und die jeweilige Signalweg-Aktivität auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) bezogen (Daten von Prof. Dr. Dennis Schade).

Bezüglich des BMP-Signalweges war auf Grund vorangegangener Ergebnisse im Differenzierungsassay zu erwarten, dass weder WS<sup>®</sup>1442 noch seine aktiven Fraktionen einen inhibierenden Effekt ausüben, da diese in dem Zeitfenster (D3-D5), in dem die BMP-Inhibition bedeutend für die Kardiogenese war, inaktiv waren. Diese

Vermutung konnte in dem Reporterassay bestätigt werden. Vielmehr war der Einfluss dieser Substanzen auf den BMP-Signalweg nicht durch einen inhibierenden, sondern einen stark aktivierenden Effekt gekennzeichnet. Dieser Effekt war dabei für WS<sup>®</sup>1442 und das Aceton Eluat mit einer Aktivierung des Signalweges von bis zu 125 % weniger stark ausgeprägt als bei dem Ultraretentat oder dem Methanol Eluat, die den Signalweg dosisabhängig auf über 200 % zu stimulieren vermochten (Abbildung 38, A-D). Eine dermaßen hohe Stimulation des BMP-Signalweges, die durch die Behandlung der Zellen mit den in den kardiogenen Fraktionen angereicherten Inhaltsstoffen in dem Differenzierungsassay zwischen Tag 4 und Tag 6 in Erscheinung treten könnte, wäre anhand der bisherigen Ergebnisse vorstellbar, da die kardiale Aktivität im Differenzierungsassay mit der BMP-Aktivität des Reporterassays für WS<sup>®</sup>1442 und die jeweilige Fraktion korreliert und die zeitliche Phase der Exposition im mESC-Assay mit den eigenen Ergebnissen sowie denen in der Literatur in Einklang steht. In diesem Zusammenhang postulieren Willems *et al.*, dass für eine gerichtete kardiale Differenzierung muriner ES-Zellen nicht nur eine BMP-Aktivierung in der prä-mesodermalen Phase sowie eine BMP-Inhibition in der post-mesodermalen Phase von Bedeutung sind, sondern darüber hinaus auch die nachfolgende kardiale Spezifizierung durch eine Stimulation des BMP-Signalweges gefördert wird<sup>[154]</sup>. Da der von Willems *et al.* verwendete mESC-Assay dem hiesigen in seinem zeitlichen Verlauf stark ähnelt, wäre folglich ein BMP-stimulierender Wirkmechanismus, der die WS<sup>®</sup>1442- und Fraktion-induzierte Kardiogenese begründet, durchaus möglich. Der Aktivierung des BMP-Signalweges könnte dabei womöglich eine stressvermittelte Caspase-Aktivierung zugrunde liegen. So belegen die Daten der Transkriptomanalyse, dass verschiedene Stress-Mediatoren durch WS<sup>®</sup>1442 und seine in dem Methanol Eluat angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffe hochreguliert werden, wodurch u.a. Caspase 3 aktiviert werden könnte. Wie eine Untersuchung potentieller BMP-Mimetika in dem hier dargestellten BMP-Reporterassay zeigte, könnte eine Aktivierung dieser Caspase dabei möglicherweise für die Aktivierung des BMP-Signalweges ursächlich sein (Kap. 4.3.1./4.3.2.).

Darüber hinaus sollte die Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 und seiner kardiogenen Fraktionen auf den Wnt-Signalweg untersucht werden. Wie bereits erwähnt, kann die Kardiogenese pluripotenter Stammzellen in Abhängigkeit der Differenzierungsphase sowohl durch Aktivierung als auch durch Inhibierung des Wnt-Signalweges gefördert werden<sup>[38]</sup>. In dem Differenzierungsassay mit den murinen ES-Zellen war die kardiogene Aktivität der Wnt-Inhibitoren zwischen Tag 5 und Tag 7 am höchsten, womit dieses Zeitfenster mit dem von WS<sup>®</sup>1442 und seinen aktiven Fraktionen überlappte, für die zwischen Tag 4 und Tag 6 die höchste Kardiogenese festgestellt worden war. Folglich könnte die kardiogene Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 in einem Wnt-inhibierenden Wirkmechanismus begründet liegen. Um dieses zu verifizieren, wurde ein etablierter Reporterassay mit HEK293T-Zellen und den Plasmiden Wnt3a, SuperTOPflash (STF) und Renilla verwendet, wobei die Signalweg-Aktivität über eine *Firefly*-Luciferase bestimmt werden konnte, deren Aktivität ins Verhältnis zur Luciferase-Aktivität der Renilla-Kontrolle gesetzt wurde<sup>[62]</sup>.

Zunächst wurde die Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 auf den Wnt-Signalweg unter diesen Versuchsbedingungen untersucht, wobei sich eine starke dosisabhängige Aktivierung des Signalweges auf 200 % zeigte (Abbildung 39, A). Unter abgewandelten Assay-Bedingungen, bei denen die Aktivität der STF-Luciferase nicht über das Wnt3a-Plasmid beeinflusst, sondern durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges mittels des niedermolekularen Wnt-Aktivators CHIR<sup>[277]</sup> bzw. mittels Wnt-konditioniertem Medium stimuliert wurde, sollte darüber hinaus untersucht werden, ob Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus und einen synergistischen Effekt durch WS<sup>®</sup>1442 möglich waren. Unter diesen stimulierten Bedingungen war jedoch nur bei der Aktivierung mit dem Wnt-konditionierten Medium ein moderater stimulierender Effekt von WS<sup>®</sup>1442 festzustellen, während bei einer Wnt-Aktivierung durch CHIR dieser Effekt ausblieb. Dass unter Wnt-aktivierenden Bedingungen durch CHIR und konditioniertes Medium keine bzw. nur eine moderate Aktivitätssteigerung zu verzeichnen war, könnte dabei mit einer möglichen Limitierung der Aktivierung des Wnt-Signales begründet werden, sodass mit WS<sup>®</sup>1442 keine weitere Stimulierung über ein bestimmtes Maß hinaus mehr möglich ist. Fand eine WS<sup>®</sup>1442-Behandlung hingegen ohne jegliche Stimulierung statt, sodass nur der Wnt-aktivierende Effekt des Weißdorn-Extraktes zum Tragen kam, war interessanterweise eine moderate Aktivierung des Wnt-Signalweges auf knapp 150 % festzustellen.



**Abb. 39:** Durchführung von Reporterassays mit HEK293T-Zellen zur Untersuchung der Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 und seinen kardiogenen Fraktionen auf den Wnt-Signalweg. Die HEK-Zellen wurden mit den Kontroll- (Renilla-Luciferase) und Reporterplasmiden (pWnt3a/STF-Luc) transfiziert und in den oben angegebenen Konzentrationen mit WS<sup>®</sup>1442 behandelt. Die Untersuchung der Signalweg-Aktivität wurde dabei unter stimulierten (CHIR/Wnt-konditioniertes Medium) und nicht-stimulierten Bedingungen durchgeführt (**A**). Unter Wnt-stimulierten Bedingungen wurden vergleichend auch die kardiogenen Fraktion Ultraretentat und Methanol Eluat getestet (**B**). Für die Analyse wurden die Reportersignale auf die der Renilla-Kontrolle normiert und die Signalweg-Aktivität auf die DMSO-Kontrolle (=100 %) bezogen (Daten von Fabian Weßler).

Die Wnt-stimulierende Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 war auf Grund bisheriger Ergebnisse aus dem mESC-Differenzierungsassay nicht zu erwarten gewesen, da vor allem eine Inhibition des Signalweges in der Phase, in der der Weißdorn-Extrakt seine höchste kardiogene Aktivität zeigte, die Kardiogenese förderte. Auf Grund dessen sollte mit Hilfe der Fraktionen Ultraretentat und Methanol Eluat, deren kardiogene Aktivität die des Gesamtextraktes übersteigt, untersucht werden, ob die kardiogene Aktivität mit der Wnt-Aktivierung korrelierte. Interessanterweise zeigte sich dabei unter den Bedingungen mit Wnt-konditioniertem Medium für die beiden Fraktionen ein im Vergleich zum Extrakt gegenteiliger Effekt, bei dem nicht eine Aktivierung, sondern eine Inhibition des Wnt-Signalweges zu beobachten war (Abbildung 39, B). Folglich kommen diese Reporterassays zu dem interessanten Ergebnis, dass WS<sup>®</sup>1442 zwar den Wnt-Signalweg in moderatem Maße aktiviert, dieser Effekt jedoch nicht ursächlich für die im Differenzierungsassay festgestellte Kardiogenese ist und auf eine

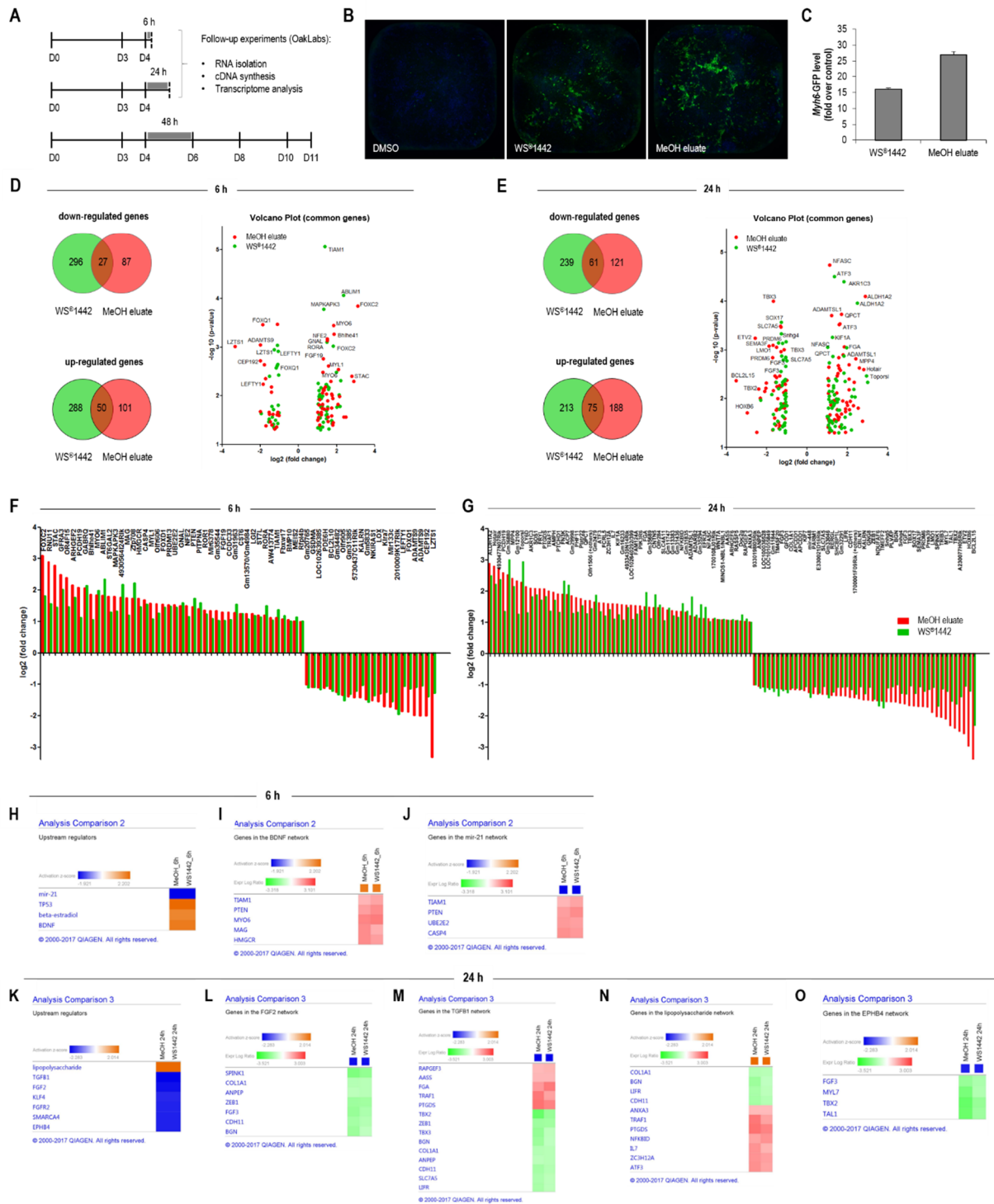


Stoffklasse zurückzuführen ist, die weder im Ultraretentat noch im Methanol Eluat angereichert ist. Dahingegen zeigen die in diesen beiden Fraktionen angereicherten Inhaltsstoffe einen Wnt-inhibierenden Effekt, der in Einklang mit einer kardiogenen Wirkung im Differenzierungsassay zwischen Tag 4 und Tag 6 steht. Eine Wnt-Aktivierung wirkt in diesem Zeitfenster vielmehr „anti-kardiogen“, sodass die WS<sup>®</sup>1442-induzierte Kardiogenese in einem anderen Wirkmechanismus begründet sein muss. Jedoch wäre es möglich, dass die kardiogene Aktivität der Fraktionen Ultraretentat und Methanol Eluat durch die Wnt-inhibierende Wirkkomponente ihrer Inhaltsstoffe zusätzlich gesteigert wird.

### **5.8. Genom-weite Transkriptomanalysen der mESC-Differenzierung nach Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat**

Wie die oben diskutierten Ergebnisse bereits zeigten, schien der Weißdorn-Extrakt und die aus ihm erhaltenen Fraktionen in dem Expositionszeitraum von Tag 4 bis Tag 6 des Differenzierungsassays bereits nach kurzer Zeit auf die frühen kardialen Vorläuferzellen einzuwirken und ihre embryonalbiologische Entwicklung hin zu einer kardialen Spezifikation zu lenken. Um die komplexen regulatorischen Mechanismen in diesem Differenzierungsprozess genauer untersuchen zu können und den zugrunde liegenden kardiogenen Wirkmechanismus zu erfassen, sollte mit Hilfe einer Transkriptomanalyse, die bei der Firma OakLabs GmbH in Auftrag gegeben wurde, auf mRNA-Ebene untersucht werden, welche Gene und zellulären Zielstrukturen durch die Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat in ihrer Expression beeinflusst wurden. Dabei war es zudem wichtig zu erfassen, welche Effekte auf die verschiedenen Signalwege unmittelbar in Erscheinung traten und wie sich deren Einfluss über positiv- und negativ-regulatorische Mechanismen auf den Genotyp nach einiger Zeit darstellte. Auf Grund dessen sollte sowohl die Genexpression nach 6-stündiger als auch nach 24-stündiger Exposition untersucht werden, wobei eine Schnittmenge der Expressionsprofile aus Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen die Wahrscheinlichkeit erhöhen sollte die zellulären Zielstrukturen und Effektoren zu identifizieren, die dem kardiogenen Wirkmechanismus zugrunde liegen.

Dazu wurden die Zellen an Tag 4 des Differenzierungsassays mit WS<sup>®</sup>1442 (0,25 mg/mL), dem Methanol Eluat (0,1 mg/mL) sowie der Kontrolle DMSO behandelt und nach 6- und 24-stündiger Inkubation als Lysat für die weitere Durchführung durch die Firma OakLabs GmbH aufbereitet (Abbildung 40, A). Um zu kontrollieren, ob die induzierte Kardiogenese wie gewohnt stattfand und die gesammelten Proben tatsächlich einen zeitlichen Abschnitt dieser darstellten, wurde parallel ein Assay über die gesamte Differenzierung durchlaufen, bei dem die Substanzbehandlung von Tag 4 bis Tag 6 andauerte und die Kardiogenese an Tag 11 fluoreszenzmikroskopisch verifiziert wurde (Abbildung 40, A-C).



**Abb. 40:** Transkriptomanalyse zur Untersuchung des Expressionsprofils nach 6- und 24-stündiger Behandlung mit WS®1442 bzw. dem Methanol Eluat. Die murinen ES-Zellen werden dafür in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und an Tag 4 entweder mit DMSO oder WS®1442 (0,25 mg/mL) bzw. dem Methanol Eluat (0,1 mg/mL) behandelt. Nach 6 und 24 h wurden die Zellen trypsinisiert und der Firma OakLabs GmbH für die Transkriptomanalyse zur Verfügung gestellt (A). Parallel wurden Zellen 48 h substanzbehandelt und bis Tag 11 kultiviert sowie anschließend nach PFA-Fixierung und DAPI-Färbung fluoreszenzmikroskopisch untersucht (B) und analysiert (C). Die Gen-Annotation erfolgte mit Hilfe der Qiagen IPA network analysis, wobei diejenigen Gene, deren Expression nach 6- bzw. 24-stündiger Extrakt- und Eluat-Behandlung signifikant hoch- bzw. herunterreguliert ( $\log_2(\text{fold change}) > 1$  oder  $-1$ ;  $p\text{-value} < 0,05$ ) war, gegenübergestellt wurden (D-E). Für die 6-stündige Exposition konnten 66 Gene identifiziert werden, die sowohl von WS®1442 als auch von dem Methanol Eluat signifikant ( $\log_2(\text{fold change}) > 1$  oder  $-1$ ;  $p\text{-value} < 0,05$ ) reguliert worden waren (F), für die 24-stündige Exposition waren es 107 Gene (G). Eine Analyse der upstream-Regulatoren erfolgte für die 6 h-Exposition (H-J) und für die 24 h-Exposition mit WS®1442 und Methanol Eluat (K-O).

Da diesem Differenzierungsassay kein Protokoll zur gerichteten Differenzierung der murinen ES-Zellen zugrunde liegt, erfolgt die Differenzierung nicht mesodermselektiv, sondern auch entlang der anderen Keimblätter (Endoderm, Ektoderm). Auch wenn die Transkriptomanalyse in diesem Zusammenhang einen detaillierten Einblick in das Entwicklungsverhalten der Zellen zu dem untersuchten Zeitpunkt der Differenzierung ermöglicht, sollte der Fokus primär auf die Untersuchung der kardiopoietischen Differenzierung gelegt werden. Wie Untersuchungen in den in der Arbeitsgruppe etablierten Reporterassays zur Beeinflussung der für die Kardiogenese bedeutsamsten Signalwege durch den Extrakt und den in den Fraktionen angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffen zeigten (Kapitel 5.7.), war dabei vor allem bei dem Vielstoffgemisch WS<sup>®</sup>1442 prinzipiell nicht auszuschließen, dass andere nicht für die Kardiogenese verantwortliche Inhaltsstoffe nicht auch Effekte hervorriefen, die der Kardiogenese zuwiderliefen. Um die der kardiogenen Aktivität zugrunde liegenden Effekte zu identifizieren, sollte folglich für die Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen die Schnittmenge der Gene gebildet werden, die im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit DMSO entweder in ihrer Expression hoch- oder herunterreguliert wurden, wobei der unmittelbare Einfluss nach 6 h und sowie der daraus folgende Genotyp nach 24 h erfasst werden sollte (Abbildung 40, D-G).

#### **5.8.1. Expressionsprofil der Gene, die durch 6-stündige Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant herunterreguliert wurden**

Das Expressionsprofil nach 6-stündiger Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat zeigte u.a. für *Lefty1* eine signifikante Expressionsminderung im Vergleich zur Kontrolle. *Lefty1*, dessen Expression durch die Bindung des Komplexes aus Klf4, Oct4 und Sox2 an den *Lefty1*-Promoter reguliert wird, ist an der Erhaltung der Selbsterneuerung und Pluripotenz muriner ES-Zellen beteiligt und wird in Folge dessen als „stemness“-Marker beschrieben<sup>[278]</sup>. Darüber hinaus stellt *Lefty1* einen negativen Regulator des Nodal-Signalweges dar, wobei lediglich die Nodal-Smad2- und nicht die BMP-Smad1/5-Signalisierung reguliert werden<sup>[279]</sup>. In diesem Zusammenhang zeigen zudem *knockdown*-Experimente mit murinen ES-Zellen (*Lefty1* KD) eine erhöhte Phosphorylierung von Smad2 sowie ein erhöhtes Differenzierungspotential, wobei die Ausbildung mesodermaler Zellen gefördert wurde<sup>[280]</sup>. Die hier verringerten *Lefty1*-Expressionslevel Extrakt- und Eluat-behandelter Zellen scheinen demzufolge schlüssig, da zum einen die Pluripotenz im Laufe der Differenzierung sukzessive abnahm und zum anderen durch die Substanzbehandlung insbesondere die Entwicklung mesodermsspezifischer Zellen gefördert wurde wie vorangegangene Untersuchungen mittels qPCR gezeigt hatten (Kapitel 5.5.).

Darüber hinaus zählte auch *Lzts1* zu den Genen, die nach 6-stündiger Extrakt- und Eluat-Behandlung signifikant verringerte Expressionslevel aufwiesen. In vergleichenden Microarray-Studien zur Untersuchung des Einflusses von Activin A und BMP4 auf die Bildung des definitiven Endoderms (DE) verweisen Teo *et al.* auf die

Expression von *Lzts1* im hinteren Primitivstreifen von Mäusen, dem Ort der Bildung des definitiven Endoderms mit hoher BMP-Empfänglichkeit<sup>[281]</sup>. In Folge dessen überlappt die *Lzts1*-Expression mit der von *Eomes*, einem entscheidenden Regulator der Ausbildung des definitiven Endoderms und des kardialen Mesoderms im Zusammenhang einer Activin/Nodal-Signalisierung<sup>[282],[283]</sup>. Neben *Eomes* stellen hierbei auch *Mixl1*, *Wnt3* und *Brachyury T* Gene dar, die mit der Ausbildung und Strukturierung des murinen Primitivstreifens assoziiert sind. So passt es ins Bild, dass neben *Lzts1* eben diese Gene genauso nach der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat eine verringerte Expression aufwiesen wie die bekannten BMP-*target*-Gene *Id1* und *Smad6*. Die verringerte *Lzts1*-Expression kann also dahingehend interpretiert werden, dass zu dem Zeitpunkt der Substanzbehandlung die murinen ES-Zellen im Zuge der kardiopoietischen Differenzierung bereits die Mesoderm-Bildung vollzogen haben und durch etwaige BMP-inhibierende Einflüsse diese Entwicklung gefördert wird.

Dazu passt auch das Expressionsprofil von *Adamts9*, das in frühen Phasen der embryonalen Entwicklung ebenfalls im Primitivstreifen exprimiert wird und für die Expression von *BMP4* und *Brachyury T* von entscheidender Bedeutung ist wie Studien mit *Adamts9*-Mutanten belegen<sup>[284]</sup>. *Adamts9* gehört zu der Gruppe der ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin*)-Proteasen und spaltet in Zuge dessen Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) wie Aggrecan und Versican und ist folglich für dessen Strukturierung und Funktion von entscheidender Bedeutung<sup>[285]</sup>. Verschiedene Studien belegen dabei das Auftreten *Adamts9*-vermittelter Versican-Spaltung über weite Phasen der kardialen Entwicklung hinweg, wie beispielsweise dem ventrikulärem Remodeling oder der Ausbildung des Herzausflusstraktes<sup>[286],[287]</sup>. Studien mit *Adamts9*-Mutanten weisen in diesem Zusammenhang Defekte in der ECM-Organisation sowie kardiovaskuläre Anomalien auf<sup>[288]–[290]</sup>. Aufgrund der ECM-remodellierenden Eigenschaften wird für *Adamts9* zudem ein Einfluss auf die Induktion, Migration und post-migratorische Differenzierung von Neuralleistenzellen postuliert<sup>[291]</sup>. Des Weiteren finden sich Beispiele für einen negativ-regulatorischen Einfluss auf die Angiogenese<sup>[292]</sup>. Ob in diesem Fall durch die verminderte *Adamts9*-Expression jedoch ein angiogener Effekt zum Tragen kommt, ist schwer zu benennen, da zwar auch die von Hoffmann *et al.* genannten anti-angiogenen Marker wie *Timp1* und *Sfrp4* nach Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat in ihrer Expression im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert waren, aber auch die angiogenen Marker wie beispielsweise *Pcdh10* dieses Expressionsprofil aufwiesen.

Vielmehr zeichnet sich durch das Expressionsprofil der herunterregulierten Gene das Bild, dass im Zuge eines kardialen Entwicklungsprozesses die Phasen der Mesoderm-Ausbildung und -Spezifizierung bereits abgeschlossen sind, was sich anhand der substanzinduzierten verringerten Expression der Marker *Eomes*, *Brachyury T*, *Kdr* und *Mesp1* belegen lässt. *Foxq1*, *forkhead box Q1*, ein Mitglied der Fox-Transkriptionsfaktor-Familie mit ebenfalls signifikant verringerter Expression, unterstützt diese Hypothese.

Verschiedene Studien belegen dabei einen *crosstalk* zwischen Genen der Fox- und Hox-Familien, wobei für *Foxq1* eine regulatorische Abhängigkeit von Hox-Transkriptionsfaktoren wie *Hoxa1* und *Hoxc13* in ES-Zellen sowie bei der Entwicklung von Haarfollikeln beschrieben wird<sup>[293],[294]</sup>. Darüber hinaus finden sich Beispiele für eine Beteiligung an der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) durch Unterdrückung der *E-Cadherin*-Expression<sup>[295]</sup>. Arbeiten von Feuerborn *et al.* geben zudem für *Foxq1* einen Einfluss auf die epitheliale Differenzierung an<sup>[296]</sup>. *Foxq1* scheint dabei eine funktionale Rolle für die Epithelplastizität einzunehmen, wobei u.a. *knockdown*-Experimente Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts und ein Herabsetzen des Fortlaufes der Zellzyklus G1-Phase aufzeigten. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch andere TGFβ-abhängige Transkriptionsfaktoren, die die Epithelplastizität beeinflussen wie *Twist1*, *Ets1*, *Zeb1* und *Zeb2* nach der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat in ihrer Expression herabgesetzt waren und zeitgleich der Transkriptionsfaktor *Foxc2*, der im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Fox-Familie wie *Foxq1* die Epithel-Entwicklung unterdrückt und dabei die mesenchymale Differenzierung fördert<sup>[297]</sup>, signifikant überexprimiert war. Jüngste Arbeiten von Yeo *et al.* nennen zudem einen Zusammenhang zwischen der frühen Expression von Fox-Transkriptionsfaktoren - vor allem von FOXC1, FOXD1 und FOXQ1 - und der Kardiogenese-Effizienz in der Kultur humaner ES-Zellen<sup>[298]</sup>, wobei durch Wnt-Induktion dieser Transkriptionsfaktoren eine Co-Aktivierung von Wnt3 und Eomes festzustellen war, die mit der Mesoderm-Bildung korreliert.

Von den genannten Fox-Transkriptionsfaktoren weist in diesem Fall nach 6-stündiger Substanzbehandlung *Foxq1* eine verringerte Expression gegenüber der Kontrolle auf, wohingegen *Foxc1* und *Foxd1* in ihrer Expression signifikant hochreguliert waren.

### **5.8.2. Expressionsprofil der Gene, die durch 6-stündige Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant hochreguliert wurden**

Neben den Fox-Transkriptionsfaktoren *Foxc1* und *Foxd1* weist vor allem *Foxc2* eine starke Überexpression nach der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat auf. Für *Foxc2* wurde ebenfalls eine entscheidende Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung von Mäusen beschrieben sowie in der Förderung der mesenchymalen Differenzierung bei zeitgleicher Inhibierung der Epithel-Entwicklung<sup>[297]</sup>. Ein Funktionsverlust dieses Gens führt zu einer Reihe von Entwicklungsstörungen wie einem ventrikulären Septumdefekt (VSD) des Herzens oder einem abnormalen Herzmuskel<sup>[299]</sup>, sowie zu prä- und perinatalem Tod durch kardiovaskuläre Defekte<sup>[300]–[303]</sup>, womit die besondere Rolle von *Foxc2* bei der Strukturierung und Morphogenese des Herzens herausgestellt wurde. Jüngste Arbeiten von Amin *et al.* zur Untersuchung der phasenspezifischen Expression von *Foxc2* in der Embryonalentwicklung von Mäusen lassen in diesem Zusammenhang vermuten, dass dabei die Rolle von kardialen *Foxc2*<sup>+</sup>/*Fgf15*<sup>+</sup>-Neuralleistenzellen (*cardiac neural crest cells*, CNCC) für die Ausbildung des Herzausflustrakts und/oder des ventrikulären Septums von entscheidender Bedeutung ist<sup>[304]</sup>. Kume *et al.* beschreiben zudem eine

Expression von *Foxc2* in Vorläuferzellen des *second heart field* (SHF) sowie im Preepicardium<sup>[303]</sup>. Ein Zusammenspiel von kardialen Neuralleistenzellen und SHF-abgeleiteten Zellen während der Morphogenese des Herzausflustraktes wurde dabei bereits von Park *et al.* postuliert<sup>[305]</sup>. Interessant ist aber vor allem die Möglichkeit der damit verbundenen Regulation der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) epikardialer Zellen, für die bereits eine Differenzierung hin zu Kardiomyozyten belegt werden konnte<sup>[306],[307]</sup>. In diesem Zusammenhang wird *Foxc2* von Battula *et al.* gemeinsam mit *Twist* und *Snai1* als EMT-assoziiertes Gen benannt<sup>[308]</sup>.

Die besondere Rolle von *Fgf15* in der Entwicklung des Herzausflustraktes wird nicht nur wie soeben beschrieben von Amin *et al.* postuliert<sup>[304]</sup>, sondern auch durch Arbeiten von Vincentz *et al.* bestätigt<sup>[309]</sup>. Hierbei zeigten *Fgf15*-defiziente Mäuse frühe morphologische Defekte des kardialen Ausflustraktes, der in einer Beeinträchtigung der Funktion der kardialen Neuralleistenzellen begründet zu sein schien. Diese ist jedoch u.a. notwendig für die ordnungsgemäße Herzversorgung und -funktion, sowie der Herzausflustrakt-Septierung<sup>[310]-[312]</sup>. Darüber hinaus ist die *Fgf15*-Expression vor allem für das zentrale Nervensystem belegt<sup>[313]</sup>.

Dieses gilt auch für das in diesem Fall überexprimierte *Protocadherin 19* (*Pcdh19*) des  $\delta 2$ -Protocadherin-Typs, welches als Mitglied der nicht-geclusterten Protocadherin-Familie im Gegensatz zu Mitgliedern der geclusterten Protocadherin-Familie während der Embryonalentwicklung nicht nur insbesondere im zentralen Nervensystem exprimiert wird, sondern auch in einer Vielzahl anderer Gewebe wie dem Primitivstreifen, dem paraxialen Mesoderm, der Niere, der Lunge oder dem Herzen<sup>[314]</sup>. Mehrere Studien belegen hierbei zudem eine Rolle von *Pcdh19* in der Somitogenese, der Strukturierung des axialen Mesoderms und der Gastrulation<sup>[315]-[317]</sup>.

Beim Vergleich der Gene, die sowohl durch WS<sup>®</sup>1442 als auch durch das Methanol Eluat 6 h nach Substanzzugabe hochreguliert waren, fanden sich des Weiteren mit *Myo6* und *My11* auch Gene, die für Proteine der Myosin-Familie kodieren. *Myo6* kodiert dabei für ein (-)-Ende-gerichtetes Motor-Protein<sup>[318]</sup>, das in der Clathrin-vermittelten Endozytose, dem endozytotischen Transport und Aussortieren und der Autophagie involviert ist<sup>[319],[320]</sup>, sowie das perijunctionale Aktin-Zytoskelett und die Membranproteine E-Cadherin und  $\beta$ -Catenin stabilisiert<sup>[321]</sup>. Arbeiten von Tamaki *et al.* und Takarada *et al.* belegen zudem einen Einfluss auf die Neurogenese und stellten eine signifikant erhöhte *Myo6*-Expression im Hippocampus von Mäusen nach traumatischen Stress fest<sup>[322],[323]</sup>. Für die *Myo6*-Defizienz *in vivo* sind zudem kardiale Abnormitäten wie eine Hypertrophie des linken Ventrikels und eine Verlängerung des QT-Intervalls bekannt<sup>[324]</sup>.

Ein anderes Gen aus der Myosin-Familie, *My11* (*fast skeletal alkali myosin light polypeptide 1*), war ebenfalls signifikant in seiner Expression gegenüber der Kontrolle erhöht. *My11* stellt dabei einen spezifischen und frühen Marker für Muskel-

Vorläuferzellen dar<sup>[325]</sup> und kann ebenfalls in Herzmuskeln wie dem Atrium und dem linken Ventrikel exprimiert werden<sup>[326],[327]</sup>. Es zählt zu den wichtigsten Genen, die in die Muskelkontraktion involviert sind<sup>[328]</sup>, und stellt u.a. ein *target*-Gen des kardialen Transkriptionsfaktors GATA4 dar<sup>[329]</sup>. Es besteht aus zwei unabhängigen Promotern, *Mlc1f* und *Mlc3f*, die im hohen Maße während verschiedener Phasen embryonaler Myogenese aktiviert werden<sup>[326]</sup>, wobei die Expression von *Mlc1f* durch Mitglieder der *Mef2*-Familie reguliert wird<sup>[330]</sup>. Interessanterweise belegen Studien von Koning *et al.*, dass unter hypoxischen Bedingungen myogene Satellitenzellen vermehrt proliferieren und zeitgleich die *Myf1*-Expression hochreguliert ist<sup>[331]</sup>, wohingegen Arbeiten von Zhang *et al.* einen anti-proliferativen Effekt von *Myf1* auf Myoblasten durch Inhibierung des Übergangs von der G1- zu der S-Phase des Zellzyklus angeben<sup>[332]</sup>. In diesem Fall kann jedoch ein anti-proliferativer Effekt postuliert werden, da bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse zellzyklusrelevante Gene wie *Cdk* und *p21* eine verminderte Expression aufwiesen. Folglich steht die erhöhte Expression von *Myf1* durch die Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat nicht nur im Einklang mit den Untersuchungen eines proliferationsstimulierenden Wirkmechanismus (Kapitel 5.6.), sondern belegt auch, dass die Differenzierung der mesodermalen Zellen der kardialen Entwicklungslinie folgt.

Die erhöhte Expression von *Bhlhe41*, auch bekannt als *DEC1* und *Sharp1*, lässt ferner darauf schließen, dass diese Differenzierung nicht hin zu Skelettmuskeln erfolgt, da *Bhlhe41* ein negativer Regulator für diesen Entwicklungsschritt ist und diese myogene Differenzierung durch Wechselwirkung mit *MyoD* inhibiert<sup>[333]</sup>. Die Überexpression dieses Gens ist folglich auch mit krankhaftem Muskelschwung assoziiert<sup>[334]</sup>. *Bhlhe41* ist ein *basic helix-loop-helix (bHLH)*-Transkriptionsfaktor und entscheidend an zellulären Prozessen wie der Differenzierung, der Apoptose und der Hypoxievermittelten Zellantwort involviert<sup>[335]</sup>. Bei letzterem zeigt sich *Bhlhe41* dafür verantwortlich die Expression von HIF1 $\alpha$ -*target*-Genen zu unterdrücken und interagiert direkt mit HIF1 $\alpha$  durch Bindung an das *hypoxia-response element (HRE)*, wodurch auch die Expression von VEGF-Genen herunterreguliert wird<sup>[335],[336]</sup>. Interessanterweise zeigen die Arbeiten von Suzuki und Kollegen ebenfalls eine verminderte Expression des *bHLH*-Transkriptionsfaktors *Twist1* und des EMT-Regulators *Zeb1* bei *Bhlhe41*-Überexpression<sup>[336]</sup>, die sich auch in dem vorliegenden Fall der Substanzbehandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat finden lässt. Eine andere Arbeitsgruppe um Reshma Taneja entdeckte zudem, dass eine Überexpression von *Bhlhe41* einen negativ-regulatorischen Einfluss auf den TGF $\beta$ -Signalweg hat und die Smad3-vermittelte Expression von ECM-Genen wie auch Kollagen inhibiert<sup>[337]</sup>. Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse der Transkriptomanalyse findet sich auch in diesem Fall eine signifikant verminderte Expression von *Col1a1*. Eine Inhibition des TGF $\beta$ -Signalweges würde zwar in das aktive Zeitfenster passen (D4-D6), jedoch wäre anhand der erhaltenen Ergebnisse aus den Reporterassays auch ein TGF $\beta$ -aktivierender Wirkmechanismus denkbar (Kapitel 5.7.).

Die *Bhlhe41*-Überexpression kann aber durchaus im Kontext einer stressinduzierten zellulären Immunantwort betrachtet werden, da darüber hinaus weitere Gene nach der Substanzbehandlung im Vergleich zur Kontrolle überexprimiert waren, die für Entzündungsproteine (*Atf3*, *Icam1*), Zytokine (*Il2*, *Tnf*) oder Chemokine kodieren. So zeigt sich beispielsweise auch eine erhöhte Expression von *Gnal* (*guanine nucleotide-binding protein G(olf) subunit alpha*), einem Modulator des Transmembransignalsystems<sup>[338]</sup>, welcher als G-Protein und Chemokin eine tragende Rolle bei der Immunüberwachung und Entzündungen zukommt<sup>[339]</sup>. Ferner wiesen vor allem *Ptgds* und *Ccl2* signifikant erhöhte Expressionsprofile gegenüber der Kontrolle auf und belegen somit die Hypothese einer stressvermittelten Zellantwort.

Das Expressionsprofil, das 6 h nach Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat erhalten wurde, zeichnet folglich das Bild eines stressinduzierten Umbauprozesses der zellulären Matrix, was zudem das Differenzierungsverhalten der mesodermalen Zellen in einem kardiogenen Maße zu beeinflussen scheint, da u.a. alternative Entwicklungswege inhibiert werden. Gene, die an einer solchen Immunantwort beteiligt sind, umfassen dabei Transkriptionsfaktoren, Zytokine, Chemokine, Interferone, Wachstumsfaktoren sowie Adhäsionsmoleküle und Enzyme, die in die Regulation reaktiver Sauerstoffspezies involviert sind, wobei deren Expression teilweise auch untereinander genauestens reguliert ist<sup>[340]</sup>. Beispiele solcher Gene finden sich wie oben beschrieben nach 6-stündiger, aber auch nach längerer Substanzbehandlung, wie das Expressionsprofil nach 24 h offenbart.

### **5.8.3. Expressionsprofil der Gene, die durch 24-stündige Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant herunterreguliert wurden**

Das Expressionsprofil nach 6-stündiger Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat war bezüglich der herunterregulierten Gene zum einen dadurch gekennzeichnet, dass Markergene des Mesendoderms (*T*, *Mixl1*) stark herunterreguliert waren und damit der entwicklungsbiologische Schritt der Mesoderm-Bildung als abgeschlossen gesehen werden kann, und zum anderen dadurch, dass die Expression nicht-mesodermaler Gene z.T. inhibiert wurde und in Folge dessen die Entwicklung der Zellen vermehrt in kardiale Vorläuferzellen des *first* und *second heart field* erfolgen konnte. Dabei übernehmen Signalwege je nach Aktivierung und Inhibierung eine Schaltfunktion hin bzw. entgegen dieser Entwicklungslinien.

Ein Beispiel stellt in diesem Zusammenhang der Notch-Signalweg dar, bei dessen Aktivierung die hämatopoetische Differenzierung, bei dessen Inhibierung wiederum die kardiale Differenzierung von Stammzellen gefördert wird<sup>[341].</sup><sup>[342]</sup>. Folglich ist es interessant, dass nach 24 h sowohl für WS<sup>®</sup>1442- als auch für Methanol Eluat-behandelte Zellen eine verminderte Expression Notch-relevanter Gene wie *Hey1*, *Hey 2*, *Hes1* und *Myc* festzustellen war, worin der kardiogene Effekt begründet sein könnte. Zeitgleich finden sich in *Lmo1* und *Tal1* Beispiele für Gene, die in Folge der Substanzbehandlung ebenfalls herunterreguliert waren und für die eine Abhängigkeit



vom Notch-Signalweg beschrieben ist, deren entwicklungsbiologischer Kontext jedoch nicht die Kardiogenese, sondern die Hämatopoese ist. Hierbei ist u.a. der bHLH-Transkriptionsfaktor SCL (TAL1) an der Selbsterneuerung hämatopoetischer Zellen beteiligt, der mit LIM-only Proteinen wie LMO1 und LMO2 Transkriptionskomplexe bildet, die an der spezifischen Gen-Expression von hämatopoetischen Zellen mitwirken<sup>[343]</sup>. Gerby *et al.* beschreiben im Zuge dessen eine Abhängigkeit der SCL (TAL1)/LMO1-vermittelten Aktivität vom *Notch1/Hes1/Myc*-Signalweg<sup>[344]</sup>, wobei Mandoli *et al.* neben den Onkogenen *Notch1*, *SCL (TAL1)* und *LMO1* auch *ID1* und *JAG1* als für die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) verantwortliche Gene angibt<sup>[345]</sup>.

Der Notch-Signalweg spielt aber auch eine entscheidende Rolle in der Neurogenese, wobei sowohl die Erhaltung des Status der neuronalen Vorläuferzellen als auch die Förderung der Neurogenese beschrieben sind<sup>[346]</sup>. So erhält ein aktiver Signalweg die neuronalen Vorläuferzellen durch *Hes1* und *Hes5*, wobei insbesondere *Hes1* den Status dieser Zellen erhält und proneuronale Gene wie *Ngn2* unterdrückt<sup>[347]</sup>. Diese proneuronalen Gene wirken anti-proliferativ und fördern die neuronale Differenzierung, sodass eine geringe Hes-Aktivität diesen Effekt zur Folge hat. Arbeiten von Kinameri *et al.* geben an, dass auch Gene der Prdm-Familie wie u.a. *Prdm6* in diesen Notch-Hes-Signalweg involviert sind und folglich die Neurogenese beeinflussen<sup>[346]</sup>. *Prdm6* fällt aber auch in dem vorliegenden Fall durch ein signifikantes Expressionsprofil auf, und könnte sich damit womöglich ebenfalls in die Reihe Notch-abhängiger Gene einfügen, die in Folge der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat herunterreguliert wurden. Als Transkriptions-Repressor scheint *Prdm6* zudem aber auch eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Differenzierung und Proliferation glatter Muskelzellen zu haben<sup>[348]</sup>. Darüber hinaus wurde *Prdm6* als Faktor beschrieben, der das Überleben und die Differenzierung von Endothelzellen im vaskulären System kontrolliert<sup>[349]</sup>. Davis und Kollegen postulierten dabei für *Prdm6* eine Funktion als transkriptioneller Repressor, bei der die Differenzierung glatter Muskelzellen unterdrückt und ihre Proliferation gefördert wird<sup>[348]</sup>. Während dieser negativ regulatorische Effekt von Davis *et al.* mit *Prdm6* siRNA-transfizierten SMCs bestätigt wird und zu einer Expressionserhöhung von *Myocardin (Myocd)* und *Gata6* führte<sup>[348]</sup>, weisen Microarray-Analysen von Gewies *et al.* für *Prdm6* auch einen positiv-regulatorischen Einfluss auf die Transkription von Genen hin, die u.a. mit Angiogenese assoziiert sind<sup>[350]</sup>. Diese Erkenntnisse stehen in Einklang mit dem Expressionsprofil, das nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat erhalten wurden, da sowohl *Prdm6* als auch Angiogenese-assoziierte Gene wie *Angpt1*, *Eng*, *Gata2*, *Vwt*, *Cdh5* signifikant herunterreguliert waren.

Darüber hinaus scheinen sowohl der Semaphorin- als auch der mTOR-Signalweg durch die Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat beeinflusst worden zu sein, da u.a. *Sema3f* und *Slc7a5* im Vergleich zur Kontrolle signifikant herunterreguliert waren. In glatten Muskelzellen zeigt *Sema3f* im Zusammenspiel mit *Nrg2* eine inhibierende Wirkung auf die RhoA-Aktivität, was zu einer verminderten *myosin light*

*chain*-Phosphorylierung und Zytoskelettsteifigkeit führt<sup>[351]</sup>. Eine Inhibierung der PI3K/AKT/mTORC2-Aktivität durch die Sema3f-Nrg2-Interaktion wird dabei von Nakayama und Kollegen postuliert<sup>[352]</sup>. Sema3f inhibiert zudem die VEGFC- und VEDFA-vermittelte Migration und Proliferation von Endothelzellen *in vitro*<sup>[353],[354]</sup>. Jin *et al.* konnten des Weiteren in Hühnerembryonen die Expression von *Sema3f* in epithelialen und mesenchymalen Zellen in der Cushing-Region des Herzens während der Phase des kardialen Remodeling nachweisen, und stellen damit die Expression dieses Gens in den Kontext der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT)<sup>[355]</sup>. Padang *et al.* hingegen konnten in RNA-Sequenzierungsstudien bei BAVr-Patienten neben einer *Adams9*-Expressionsverringerung auch eine für *Sema3f* feststellen<sup>[356]</sup>.

Der mTOR-Signalweg spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Proliferation, wobei eine Rückkopplung bezüglich Sauerstoff- und Aminosäureversorgung sowie des Energiestatus der Zelle entscheidend ist<sup>[357],[358]</sup>. Der bidirektionale Transporter SCL7A5/SCL3A2 reguliert in diesem Zusammenhang zeitgleich den Efflux von L-Glutamin aus und den Transport essentieller Aminosäuren in die Zelle unter Aktivierung des mTOR-Signalweges<sup>[359]</sup>. Diese Aktivierung verbinden Elorza und Kollegen im Kontext der Hypoxie mit dem HIF-Signalweg unter Einfluss einer HIF2a-SCL7A5-mTORC1-Signalkaskade<sup>[360]</sup>. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu anderen Studien, die eine Hypoxie-induzierte Unterdrückung der mTORC1-Aktivität sowohl über HIF1-abhängige als auch über HIF-unabhängige Signalwege beschreiben<sup>[361],[362]</sup>. Im vorliegenden Fall der WS<sup>®</sup>1442-Behandlung wiesen neben *Sc7a5* auch *HIF1a* und *HIF2a* eine verringerte Expression auf, sodass diese Ergebnisse mit denen von Elorza und Kollegen in Einklang stehen. Die Expression von *Sc7a5* ist darüber hinaus vor allem für das Gehirn und die Blut-Hirn-Schranke belegt<sup>[363]</sup>, jedoch finden sich auch Beispiele für eine Expression im Herzen, wobei eine Glutaminolyse-assoziierte Überexpression mit dem Krankheitsbild der ischämischen Herzkrankheit in Verbindung steht<sup>[364]</sup>.

Wie bereits erwähnt, fiel im Expressionsprofil nach 6-stündiger Substanzbehandlung insbesondere auf, dass die mesendodermalen Marker *Brachyury T* und *Mixl1* signifikant herunterreguliert waren und die Zellen zu dem Zeitpunkt dementsprechend die Phase der Mesoderm-Bildung bereits abgeschlossen haben mussten. Zeitgleich konnte die Anwesenheit von Markergenen früher kardialer Vorläuferzellen wie *Mesp1* und *Isl1* bestätigt werden, was dahingehend interpretiert werden kann, dass der der Mesoderm-Bildung nachfolgende Entwicklungsschritt der kardialen Strukturierung und Spezifikation unter Ausbildung des *first* und *second heart field* zum untersuchten Zeitpunkt stattfand. *In vivo* ist ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen für die Entwicklung des *second heart field* während der Herzhöhnenverlängerung entscheidend, wobei FGF, BMP, Shh, Notch, Retinsäure und Wnt beteiligt sind<sup>[365],[366]</sup>. Insbesondere das Gleichgewicht aus pro-proliferativen Wnt-, Hedgehog- und FGF-Signalen und differenzierungsfördernden BMP-Signalen ist dabei für die Ausbildung des Ausflusstraktes aus SHF-Zellen von Bedeutung. Zudem stellen die Transkriptionsfaktoren Tbx1 und Isl1 wichtige Bestandteile dieser Entwicklungsachse dar. Fgf3, Fgf8 und Fgf10 sind hierbei an der Entwicklung des *second heart field*

beteiligt<sup>[305],[367],[368]</sup>, wobei ihre Expression u.a. im pharyngealen Mesoderm durch die Wnt/ $\beta$ -Catenin/Notch-Signalkaskade reguliert wird<sup>[369]–[371]</sup>. Diese Wnt/FGF-Aktivität führt zu einer Expansion von *Isl1*<sup>+</sup>-Vorläuferzellen, die für die Regulation der Herzentwicklung und der postnatalen kardialen Homöostase wichtig sind<sup>[372]</sup>. Die T-box Transkriptionsfaktoren *Tbx1*, *Tbx2* und *Tbx3* sind hingegen während der Entwicklung des *second heart field* an der BMP-/FGF-Signalisierung beteiligt, wobei diese im Fall von *Tbx1* über die *target*-Gene *Six1* und *Eya1* stattfindet<sup>[373]</sup>.

Bei Betrachtung des Expressionsprofils nach 24-stündiger Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat fällt nun auf, dass einige der oben genannten SHF-Marker wie *Isl1* im Vergleich zum 6 h-Expressionsprofil stark herunterreguliert waren. Weitere Beispiele finden sich in *Hand2* und insbesondere *Fgf3*, die nach 6-stündiger Behandlung entweder gar nicht oder sogar positiv in ihrer Expression beeinflusst worden waren und nach 24 h eine signifikant verringerte Expression aufwiesen. Vor allem die stark verringerte *Fgf3*-Expression könnte mit dem Expressionsprofil der T-box Transkriptionsfaktoren *Tbx2* und *Tbx3* in einem Zusammenhang stehen, wobei deren Expression im Vergleich zum 6 h-Expressionsprofil nach 24-stündiger Substanzbehandlung nochmal bedeutend negativ beeinflusst worden ist.

Mitglieder der T-box-Familie von Transkriptionsfaktoren sind entscheidende Regulatoren der myokardialen Proliferation und Strukturierung. Dabei werden *Tbx1*, *Tbx2*, *Tbx3*, *Tbx5*, *Tbx18* und *Tbx20* im Herzen exprimiert und regulieren die embryonale Entwicklung des Herzens<sup>[374]</sup>. Da *Tbx3* im pharyngealen Mesenchym und den kardialen Neuralleistenzellen des Ausflusstraktes exprimiert und an dessen Rotation und Septierung beteiligt ist, postulieren Bakker *et al.* eine regulatorische Einflussnahme von *Tbx3* auf diese Zellen<sup>[375]</sup>. Kardiale Neuralleistenzellen sind hierbei verantwortlich für die Morphogenese des Ausflusstraktes und beeinflussen die Proliferation im *second heart field*<sup>[376]</sup>, sodass in diesem Zusammenhang interessant ist, dass neben *Tbx3* auch andere Gene (*Shh*, *Wnt11*, *Pitx2*, *Tbx2*), die für die Morphogenese des Ausflusstraktes verantwortlich sind, signifikant nach der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat herunterreguliert sind. Darüber hinaus unterdrückt *Tbx3* die Kammerbildung im atrioventrikulären Kanal sowie im sinoatrialen Knoten und stellt die Entwicklung und Funktion von Herzschrittmacherzellen sicher, indem die Expression der Gene des atrialen arbeitenden Myokardiums (*Nppa* (ANF), *Cx40*, *Cx43*) sowie die atriale Differenzierung unterdrückt werden, und zeitgleich die Expression von Schrittmacher-Genen stimuliert wird<sup>[377],[378]</sup>. *Tbx3* wird dementsprechend von Li und Kollegen neben *Tbx2* und *Hcn4* als Schrittmacher-Gen beschrieben, dessen Regulation vom NRG-1/ErbB-Signalweg abhängt<sup>[379]</sup>. In Folge dessen kann durchaus in Betracht gezogen werden, dass WS<sup>®</sup>1442 und das Methanol Eluat die Zellen in ihrer Differenzierung dahingehend beeinflussen, dass nach der Phase der kardialen Strukturierung die Spezifizierung in den Schrittmacher-Phänotyp verhindert wird, und stattdessen möglicherweise die Differenzierung vor allem zu atrialen Zellpopulationen gefördert wird. Diese Subtypen-Spezifizierung stünde mit dem Expressionsprofil der an Tag 11 erhaltenen

*Tnnt*<sup>+</sup> Kardiomyozyten in Einklang, die erhöhte Expressionslevel des atrialen Kardiomyozyten-Markers *Mlc2a* aufwiesen (Kapitel 5.5.).

An einer solchen Subtypen-Spezifizierung könnte zudem mit *Myocd* ein anderer kardialer Marker beteiligt sein, dessen Expression ebenfalls nach 24 h signifikant herunterreguliert war. Myocardin (*Myocd*) ist ein transkriptioneller Co-Aktivator des *serum response factor* (SRF) und entscheidend an der Expression von Genen glatter und kardialer Muskelzellen wie *ANF* und *Tlgn* beteiligt<sup>[380],[381]</sup> sowie an dem Überleben von Kardiomyozyten und deren sarkomeren Organisation<sup>[382]</sup>. Creemers *et al.* nennen *Myocd* in diesem Zusammenhang als direktes *target* von *Mef2c*- und *Foxo*-Proteinen in der kardiovaskulären Entwicklung<sup>[383]</sup>, und Kwon *et al.* beschreiben eine *Notch1/Wnt/β-Catenin*-Abhängigkeit der Expression von *Myocd*, *Isl1* und *Smyd1* in Zuge der Differenzierung kardialer Vorläuferzellen<sup>[384]</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen identifizierten in Screening-basierten Methoden zudem *Myocd* neben *Gata4*, *Tbx5*, *Mef2c* und *Nkx2.5* als wichtigen Bestandteil der Gruppe von Transkriptionsfaktoren zur effizienten Reprogrammierung von Fibroblasten in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen<sup>[385]–[387]</sup>. Interessanterweise postulierten Wang *et al.* zudem jüngst einen Mechanismus, bei dem die *Myocd*-Expression durch das Zytokin *Dkk3* über *ATF6*-Signalisierung und Inhibierung des *Erk*-Signalweges induziert und so die Differenzierung glatter Muskelzellen gefördert wird<sup>[388]</sup>. Da die *Myocd*-Expression erst nach 24-stündiger und nicht nach 6-stündiger Behandlung mit *WS*<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat signifikant negativ beeinflusst worden ist, könnte die verringerte Expression also Folge einer *Notch*-abhängigen Signalkaskade im Zusammenhang einer Differenzierung zu kardialen Vorläuferzellen sein wie sie Kwon *et al.* beschreiben<sup>[384]</sup>.

#### **5.8.4. Expressionsprofil der Gene, die durch 24-stündige Behandlung mit *WS*<sup>®</sup>1442 bzw. dem Methanol Eluat signifikant hochreguliert wurden**

Bei dem Vergleich der verschiedenen Expressionsprofile fällt auf, dass die in Folge der 6-stündigen Substanzbehandlung hochregulierten Markergene des kardialen Mesoderms (*Mesp1*) und kardialer Vorläuferzellen (*Isl1*) nach 24 h herunterreguliert waren und im Gegenzug die *Mef2c*-Expression zugenommen hatte. Andere Markergene, die ebenfalls kardiale Vorläuferzellen (FHF/SHF) kennzeichnen, wie beispielsweise *Nkx2.5*, *Hand1*, *Hand2*, *Tbx1* und *Tbx5*, wiesen gegenüber der Kontrolle jedoch kaum einen bis nur leicht verminderten Expressionsunterschied auf (Anhang 11.2.). Interessanterweise findet sich aber eine Zellpopulation, die eine signifikant erhöhte Expression des kardialen Stammzell-Markers *Sca1* zeigte. Dieser war nach 24-stündiger Behandlung mit *WS*<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat gegenüber der Kontrolle ebenso überexprimiert wie der andere kardiale Stammzell-Marker *c-kit*. Für *Sca1*<sup>+</sup> kardiale Vorläuferzellen wird dabei das therapeutische Potential einer endogenen Herz-Regeneration diskutiert, da diese Zellpopulation auch im adulten Herzen ansässig zu sein scheint und die Fähigkeit besitzt nach Schädigung die Funktion des Herzens wiederherzustellen<sup>[389]</sup>. In diesem Zusammenhang zeigten beispielsweise auch Oh *et al.* in einem *in vivo*-Maus-Modell, dass *Sca1*-Zellen an

beschädigtes Myokard gelangen und zumindest z.T. zu Kardiomyozyten differenzieren<sup>[390]</sup>.

Des Weiteren bestätigt sich das Bild, das bereits im 6 h-Expressionsprofil erhalten wurde, dass die Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat vor allem zu einer Überexpression von Genen führt, die im Kontext einer stressvermittelten Zellantwort stehen. Hierbei wiesen die nach 6-stündiger Substanzbehandlung signifikant hochregulierten inflammatorischen Gene *Gnal*, *Bhlhe41* und *Pcdh19* auch nach 24 h noch eine deutliche Überexpression gegenüber der Kontrolle auf. Die erhöhten Expressionslevel weiterer Gene der unmittelbaren Immunantwort wie *Atf3* (*activating transcription factor 3*) und *Ptgds* (*prostaglandin D2 synthase*) stiegen darüber hinaus zwischen den Untersuchungszeiträumen von 6 und 24 h sogar noch weiter an. *Atf3*, ein Mitglied der ATF/CREB-Familie von Transkriptionsfaktoren, kann dabei von unterschiedlichsten extra- und intrazellulären Stimuli induziert werden und kodiert in der Folge weitere Transkriptionsfaktoren, die in Zellprozesse wie Zelltod, Überleben und Proliferation sowie inflammatorische Antwort eingebunden sind<sup>[391],[392]</sup>. Zudem scheint *Atf3* im Gefäßsystem apoptotische Prozesse in Endothelzellen zu regulieren<sup>[393]</sup>, sowie für die Migration glatter Muskelzellen verantwortlich zu sein<sup>[394]</sup>. Die Rolle von *Atf3* bei ischämischen Myokardschäden (*myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI*) untersuchten darüber hinaus Yang *et al.*<sup>[395]</sup> und Bround *et al.* berichten von einem positiven Effekt zur Reduktion von Kardiomyopathien, Hypertrophien und Myozytensterben im adulten Herzen, wenn eine *Atf3*-Überexpression vorliegt<sup>[396]</sup>.

In den Kontext der Kardioprotektion sowie Stress-Signalisierung passt auch die erhöhte Expression von *Ptgds*<sup>[397]</sup>. Dieses Gen kodiert für das Enzym Prostaglandin D2 Synthase, das in der Bildung des antikoagulatorisch und vasodilatatorisch wirkenden Prostaglandins D2 involviert ist. Hirawa *et al.* beschreiben dabei eine *Ptgds*-Überexpression mit einem adaptiven Mechanismus zum Schutz kardiovaskulärer Schäden auf Grund antiinflammatorischer Eigenschaften<sup>[398]</sup>. Die Expression könne dementsprechend erhöht sein, um vor einer Plättchenaggregation in atherosklerotischen Blutgefäßen zu schützen und die Zunahme glatter Muskelzellen zu verhindern<sup>[399]</sup>.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Überexpression von *Zc3h12a*. Dieses wurde im Zuge einer Transkriptomanalyse humaner Monozyten-abgeleiteter Zellen nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder MCP1 (*monocyte chemotactic protein 1*) erstmalig beschrieben und dementsprechend mit dem Namen *MCPIP1* (*monocyte chemotactic protein-induced protein 1*) versehen. Einige Studien belegen hierbei für *Zc3h12a* eine antiinflammatorische Wirkung, die in einer Abschwächung des inflammatorischen Zustandes durch Minderung der Expression der stressinduzierenden Mediatoren selbst wie IL-1 $\beta$ , MCP1, TNF $\alpha$  und APP in Folge einer negativen Rückkopplung begründet liegt<sup>[400],[401]</sup>. Folglich könnte die Abnahme der

erhöhten Expressionslevel von *MCP1* (*Ccl2*) und *Tnf* von 6- nach 24-stündiger Substanzbehandlung mit der Überexpression von *Zc3h12a* in einem Zusammenhang stehen. Liang *et al.* postulieren für *Zc3h12a* zudem eine Eigenschaft als Deubiquitinase und führen dabei den antiinflammatorischen Effekt auf eine negativ-regulatorische Einflussnahme auf den JNK- und NF- $\kappa$ B-Signalweg zurück<sup>[402]</sup>. Diese Wirkmechanismen werden auch von Niu *et al.* angeführt, um den in ihren Arbeiten festgestellten positiven Einfluss von *Zc3h12a* auf das kardiale Remodeling zu begründen<sup>[403]</sup>. In ihrem Infarkt-Modell wiesen dabei nach Ligation des linken Koronarventrikels die transgenen Mäuse mit kardiomyozytenspezifischer *Zc3h12a*-Expression gegenüberüber der Wildtyp-Kontrollgruppe u.a. eine erhöhte Überlebensrate, verringerte kardiale Hypertrophie, weniger Fibrose und Narbenbildung sowie eine geringere Zytokin-Expression und Caspase-Aktivität auf. Hingegen kommen Studien von Zhou *et al.* zu dem Schluss, dass *Zc3h12a* an der Entwicklung ischämischer Herzkrankheiten und der Apoptose von Kardiomyozyten beteiligt ist<sup>[404]</sup>. Ein kardioprotektiver Effekt wird folglich durchaus kontrovers diskutiert. Interessanterweise wird für *Zc3h12a* aber auch ein angiogener<sup>[405]</sup>,<sup>[406]</sup> sowie ein kardiogener Effekt diskutiert<sup>[406]</sup>. Auf Grund der Tatsache, dass angiogeneserelevante Gene (*Angpt1*, *Eng*, *Gata2*, *Vwt*, *Cdh5*) jedoch in ihrer Expression herunterreguliert waren, scheint zumindest in dem hier vorliegenden Fall dieser Effekt nicht in Erscheinung zu treten. Dass die *Zc3h12a*-Expression aber die kardiale Differenzierung Knochenmark-abgeleiteter mesenchymaler Stammzellen fördert, die von Autophagie-getriebenen intrazelluläre Reorganisationsprozesse begleitet wird, scheint nicht nur für einen regenerativen therapeutischen Ansatz interessant zu sein<sup>[406]</sup>, sondern auch ein möglicher Erklärungsansatz für den beobachteten kardiogenen Effekt bei murinen ES-Zellen nach der Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat.

Eine Mehrzahl der signifikant überexprimierten Gene steht folglich im Kontext einer stressvermittelten Zellantwort wie sich auch anhand weiterer Beispiele wie *Phf11b* und *Qpct* belegen lässt. So ist zum einen die Funktion von Zink-Finger-Proteinen wie *Phf11* beispielsweise die Regulation apoptotischer Prozesse<sup>[407]</sup> sowie die der Expression von Zytokinen<sup>[408]</sup> und zum anderen die von Isoenzymen der Glutaminylicyclase wie *Qgct* die Regulation der Monozyten-Infiltration unter inflammatorischen Bedingungen<sup>[409]</sup>.

Des Weiteren zeigten auch die Gene *Neurofascin* (*Nfasc*) und *ADAMTS-like-1* (*Adamts11*) eine erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrolle. Beide Gene sind vor allem in einem neuronalen Entwicklungskontext beschrieben, wobei dem von *Nfasc* kodierten Zelladhäsionsmolekül eine bedeutende Rolle für die Zell-Zell-Kommunikation im Nervensystem zukommt<sup>[410]</sup>. Zudem ist Neurofascin für die Strukturierung und Ausbildung von Neuriten von Bedeutung, wobei sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Domäne über FGFR1 mit dem FGF-Signalweg interagieren<sup>[411]</sup>. Das durch den Hedghog-Signalweg regulierte Gen *Adamts11*, auch bekannt als *Punctin-1*, findet sich u.a. in Neuronen während der Embryonalentwicklung von Mäusen und kodiert ein ECM-Protein, das Aggrecan und Versican spaltet.

Proteolytische Degradation und/oder Aktivierung von Komponenten der extrazellulären Matrix ist dabei während der Morphogenese ein gängiges Prinzip<sup>[412]</sup>.

Das Gen, das nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat jedoch den signifikantesten Expressionsunterschied zur Kontrolle aufwies und im Vergleich am stärksten hochreguliert war, war interessanterweise *Aldh1a2*. *Aldh1a2*, auch *retinaldehyde dehydrogenase 2* (*Raldh2*), katalysiert den zweiten Schritt der Retinsäure (RA)-Biosynthese, bei der das zuvor aus Retinol (Vitamin A) gebildete Retinaldehyd zu Retinsäure synthetisiert wird, und ist damit von zentraler Bedeutung für den RA-Signalweg<sup>[413]</sup>. Verschiedene Studien an Embryonen von Zebrafischen, Hühnern und Mäusen belegen dabei den Einfluss von RA in der frühen Phase der Embryonalentwicklung des Herzens und insbesondere bei der Spezifikation des Ausflusstraktes<sup>[414]–[416]</sup>. Zudem sind ein Mangel sowie ein Übermaß an RA mit dramatischen Effekten auf die Morphologie der Herzkammern assoziiert<sup>[417]</sup>. Einen entscheidenden Einfluss von *Aldh1a2* und dem RA-Signalweg auf die Einfluss- /Ausfluss- und atriale bzw. ventrikuläre Spezifikation des murinen embryonalen Herzens postulieren darüber hinaus auch Nadia Rosenthal und ihre Kollegen, wobei die Bevorzugung eines atrialen Phänotyps durch einen positiv-regulatorischen Einfluss von RA von einem engen Zeitfenster und dem zellulären Entwicklungsstatus während der embryonalen Herzentwicklung abhängig zu sein scheint<sup>[416],[418]</sup>. Protze *et al.* konnten interessanterweise in diesem Zusammenhang in ihren jüngsten Arbeiten die Differenzierung humaner pluripotenter Stammzellen durch eine phasenspezifische RA-Exposition zu einem sino-atrialen Kardiomyozyten-Subtyp fördern<sup>[419]</sup> und auch Zhang *et al.* entwickelten in ihren Arbeiten mit humanen ES-Zellen eine Methode zur Subtypen-Spezifizierung atrialer und ventrikulären Kardiomyozyten durch die gezielte Beeinflussung des RA-Signalweges<sup>[272]</sup>. Die Autoren verweisen im Zuge dessen zudem darauf, dass sich durch die Generierung selektiver Subtypen-Populationen Anwendungen für die Zelltherapie ergeben könnten. Darüber hinaus konnte eine RA-induzierte atriale Spezifizierung auch für murine ES-Zellen belegt werden<sup>[271]</sup>. Gassanov *et al.* zeigten hierbei, dass RA die kardiale Differenzierung muriner ANP (*atrial natriuretic peptide*)-eGFP-exprimierender ES-Zellen zu einem atrialen Phänotyp zeit- und dosisabhängig fördert und die Expression kardialer Ionenkanäle sowie von *Mlc2a* begünstigt. Wie oben bereits erwähnt, zeigte auch in der vorliegenden Arbeit das Expressionsprofil der an Tag 11 erhaltenen Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen eine erhöhte *Mlc2a*-Expression (Kapitel 5.5.). Folglich wäre es in Anbetracht der oben vorgestellten Referenzen möglich, dass WS<sup>®</sup>1442 und die in dem Methanol Eluat angereicherten aktiven Inhaltsstoffe während des Expositionszeitraumes von Tag 4 bis Tag 6 den RA-Signalweg stimulieren und in Folge dessen die kardiale Differenzierung fördern, wie es bereits von Gassanov *et al.* und Wobus *et al.* gezeigt wurde<sup>[271],[420]</sup>. Dass hierbei möglicherweise ein atrialer Phänotyp begünstigt wird, stünde mit Ergebnissen mehrerer Studien mit humanen und murinen Stammzellen in Einklang<sup>[271],[272],[419]</sup>. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen in einem murinen *in vivo*-Postinfarkt-Modell, dass die *Aldh1a2*-Expression und die Aktivität des RA-Signalweges bei myokardialer Ischämie vor allem in den kardialen Fibroblasten erhöht ist und diese nach RA-Stimulation eine geringere Proliferation

aufweisen, woraus sich womöglich ein positiver Effekt auf das postischämische Remodeling ergibt<sup>[421]</sup>.

### 5.8.5. Untersuchung von *upstream*-Regulatoren Extrakt- und Eluat-induzierter Effekte auf Transkriptomebene nach 6-stündiger Exposition

Nachdem das Expressionsprofil der Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen anhand der oben beschriebenen einzelnen hoch- bzw. herunterregulierten Gene diskutiert und sich ein Überblick über die Diversität der beeinflussten zellulären Zielstrukturen und Signalwege verschafft worden war, sollte mit Hilfe der *Qiagen IPA*-Software untersucht werden, ob Quervernetzungen zwischen einzelnen *targets* bestanden, die nicht direkt transkriptionell reguliert und daher anhand des Expressionsprofils und der bisherigen Analyse nicht direkt ersichtlich waren. Die Erkenntnisse über negative und positive regulatorische Wechselwirkungen sollten hierbei dazu beitragen den zugrunde liegenden kardiogenen Wirkmechanismus zu erfassen.

Diese Methode der Analyse der Transkriptomdaten verwies dabei interessanterweise auf den besonderen Einfluss des *brain-derived-neurotrophic factor* (BDNF) nach 6-stündiger Behandlung der Zellen mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat, wobei insbesondere eine Verbindung zu dem oben bereits beschriebenen Myo6 zu bestehen scheint (Abbildung 40, H-I). Yano *et al.* postulieren in diesem Zusammenhang beispielsweise, dass Myo6 und das Myo6-bindende Protein GIPC1 für die BDNF-vermittelte Neurotransmitter-Freisetzung im postnatalen Hippokampus essentiell sind<sup>[422]</sup>. Obwohl zahlreiche weitere Studien die Bedeutung von BDNF für das zentrale Nervensystem belegen<sup>[423],[424]</sup>, scheint dieses Neurotrophin darüber hinaus auch eine wichtige Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung einzunehmen<sup>[389],[425],[426]</sup>. So finden sich BDNF und sein Rezeptor TrkB nicht nur in neuronalem Gewebe, sondern auch u.a. im Epithel koronarer Arterien und sind an der Entwicklung der Kapillaren sowie der Bildung des kardialen Endothels beteiligt, wobei Fehlregulationen beispielsweise mit einer Verdünnung der Herzkammern, einer verringerten Kontraktilität des Herzens sowie einer frühen postnatalen Letalität bei Mäusen assoziiert sind<sup>[426]</sup>. Im Vergleich dazu geht eine BDNF-Überexpression scheinbar mit einer erhöhten Kapillardichte in kardialem Gewebe einher<sup>[417],[418]</sup>. Zudem wird BDNF ein protektiver Einfluss in der Pathogenese koronarer Herzkrankheiten zugeschrieben, wobei ein erhöhter BDNF-Level im Serum mit einem verringerten Risiko an kardiovaskulären Krankheiten assoziiert zu sein scheint<sup>[427]-[430]</sup>. Des Weiteren inhibiert BDNF die Kardiomyozyten-Apoptose durch Erhöhung der Bcl2-Aktivität sowie durch Senkung der Caspase 3-Aktivität im ischämischen Myokard<sup>[431]</sup>, woraus möglicherweise ein kardioprotektiver Effekt abgeleitet werden kann<sup>[426]</sup>. In diesem Zusammenhang scheinen auch eine BDNF-induzierte VEGF-, Akt-, TRPC3/6 Kanal- sowie Makrophagen-Aktivierung einen protektiven Mechanismus gegen eine myokardiale Ischämie zu begünstigen, wie mehrere *in vitro*- und *in vivo*-Studien andeuten<sup>[426]</sup>. In Studien von Kermani *et al.* führte eine exogene Zufuhr von BDNF zudem zu einer Mobilisierung myeloider (CD11b<sup>+</sup>) und hämatopoetischer (Sca1<sup>+</sup>) Vorläuferzellen, die zu den geschädigten Gefäßen migrierten und an der Gefäßbildung sowie -stabilisierung über Freisetzung angiogener



Faktoren mitwirkten<sup>[432]</sup>. BDNF ist dementsprechend nicht nur an der kardiovaskulären Entwicklung und Pathophysiologie beteiligt, sondern wirkt womöglich auch kardioprotektiv, indem u.a. die Angiogenese gefördert wird und überlebensfördernde Faktoren stimuliert werden. Zudem scheinen gemäß den Arbeiten von Samal *et al.* aber die BDNF-vermittelten Effekte nicht nur auf Nerven- und Epithelzellen beschränkt zu sein, sondern auch einen regulatorischen Einfluss auf kardiale Vorläuferzellen zu haben<sup>[389]</sup>. Die Autoren identifizierten dabei in vergleichenden Microarray-Studien mit Sca1<sup>+</sup> kardialen Vorläuferzellen eine erhöhte BDNF-Expression in dem murinen Herzinsuffizienz-Modell und zeigten darüber hinaus, das exogenes BDNF unter diesen Bedingungen das kardiogene Potential dieser Zellen u.a. durch Stimulation der Migration erhöht, woraus sich möglicherweise therapeutische Anwendungen für die Herzinsuffizienz-Therapie ergeben könnten<sup>[389]</sup>.

Die Untersuchung der *upstream*-Regulatoren, die nach 6-stündiger Exposition durch WS<sup>®</sup>1442 und das Methanol Eluat in ihrer Aktivierung negativ beeinflusst wurden, ließ darüber hinaus eine besondere Bedeutung der microRNA-21 (miR21) vermuten (Abbildung 40, H). MicroRNAs sind nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von 18 bis 25 Nukleotiden, die an einer Vielzahl biologischer und pathologischer Prozesse wie der Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt sind sowie bei der Regulation der Herzfunktion und seiner Strukturierung eine wichtige Rolle einnehmen<sup>[433]</sup>. In diesem Zusammenhang ist miR21 in zahlreichen Krebserkrankungen auch eine der am stärksten hochregulierten miRNA und scheint in der Inhibition des programmierten Zelltods verwickelt zu sein<sup>[434]</sup>. Zu den validierten *targets* zählen dabei u.a. Tropomyosin 1, verschiedene Proteine der p53-Familie und LRRFIP1, ein Inhibitor des NF- $\kappa$ B-Signalweges<sup>[435]</sup>. Zudem führt ein miR21-*silencing* zu erhöhten PTEN- und PDCD4-Leveln sowie einer Caspase-3/7-Aktivierung<sup>[436]</sup>. Darüber hinaus ist eine *miR21*-Überexpression bei kardialer Hypertrophie<sup>[437],[438]</sup> und kardialer Apoptose<sup>[439]</sup> beschrieben. Thum *et al.* identifizierten dabei in ihrem *in vivo*-Herzinsuffizienz-Modell an Mäusen miR21 als die am stärksten hochregulierte miRNA, die insbesondere in den kardialen Fibroblasten exprimiert wurde und die ERK-MAP-Kinase-Aktivität über Inhibition von Spry1 erhöhte, und belegten, dass mit chemisch modifizierten und konjugierten miRNA-Inhibitoren die Fibrose inhibiert und die Herzfunktion verbessert werden kann<sup>[440]</sup>. Hingegen zeigten Sayed *et al.* in ihrem transgenen Mäuse-Modell, dass eine *miR21*-Überexpression eine Unterdrückung der Ischämie-induzierten PTEN- und FasL-Überexpression, eine Zunahme der Akt-Phosphorylierung, eine Abnahme der Infarktgröße und eine Verbesserung der Herzinsuffizienz zur Folge hat<sup>[435]</sup>. Demzufolge scheinen Einfluss auf Apoptose und Fibrose und damit schädigende und nutzbringende Wirkungen von miR21 gleichermaßen diskutiert zu werden, wie auch Studien zu einem protektiven Effekt von miR21 bei kardialer Vorkonditionierung belegen<sup>[441]</sup>. Wie oben bereits beschrieben scheint eine mögliche kardioprotektive Wirkung des *upstream*-Regulators BDNF in der Erhöhung der Bcl2- und VEGF-Aktivität sowie Senkung der Caspase 3-Aktivität begründet zu liegen<sup>[426]</sup>, wobei eine *miR21*-Überexpression ebenfalls mit diesen Effekten assoziiert zu sein scheint<sup>[442]</sup>. Darüber hinaus postulieren verschiedene Arbeitsgruppen einen Einfluss von miR21 auf die Proliferation c-kit<sup>+</sup> und Sca1<sup>+</sup>

kardialer Stammzellen<sup>[443],[444]</sup>. In dem vorliegenden Fall zeichnet sich jedoch das Bild einer Extrakt- und Eluat-induzierten negativen Regulation der miR21-Aktivität, sodass sich vielmehr eine Parallele zu den Arbeiten von Campagnolo *et al.* ergibt, die in murinen embryonalen Stammzellen eine Verminderung der *miR21*-Expression durch Resveratrol feststellten, was in der Folge die Akt-Phosphorylierung minderte und die Expression endothelialer Marker wie CD31, VE-Cadherin und eNOS förderte<sup>[445]</sup>. Der Zusammenhang von miR21-Expression und Angiogenese, Apoptose und Fibrose wird also kontrovers diskutiert, wobei hierbei möglicherweise ein pro-apoptotischer Effekt im Vordergrund stehen könnte, wie die gesteigerte Caspase-Aktivität zumuten lässt (Abbildung 40, J).

#### 5.8.6. Untersuchung von *upstream*-Regulatoren Extrakt- und Eluat-induzierter Effekte auf Transkriptomebene nach 24-stündiger Exposition

Während die Untersuchung der *upstream*-Regulatoren nach 6-stündiger Exposition vor allem auf eine Extrakt- und Eluat-induzierte Aktivierung verschiedener Effektoren hindeutete, war der Einfluss von WS<sup>®</sup>1442 und der im Methanol Eluat angereicherten Inhaltsstoffe nach 24 h vielmehr durch eine Hemmung verschiedener entwicklungsbiologischer Signalwege gekennzeichnet. So scheinen insbesondere der Fgf- und Tgf $\beta$ -Signalweg, die für die Entwicklung des Herzens sowie dessen Regeneration von großer Bedeutung sind<sup>[446]</sup>, in ihrer Aktivität negativ beeinflusst worden zu sein (Abbildung 40, K). Fgf2 spielt hierbei nicht nur als parakrines Signalmolekül in der postnatalen Herz-Pathophysiologie eine Rolle, sondern stimuliert auch die kardiale Differenzierung von Stammzellen sowie die kardiale Reprogrammierung von Fibroblasten *in vitro*<sup>[447]</sup>. Verschiedene *loss-* und *gain-of-function*-Studien belegen in diesem Zusammenhang den regulatorischen Einfluss von Fgf2 auf die Zellproliferation, Angiogenese, Kollagensynthese, kardiale Hypertrophie sowie Fibrose bei ischämischer Schädigung des Herzens<sup>[448],[449]</sup>, wobei die kardioprotektive Wirkung von Fgf2 u.a. in der Inhibition der Autophagie über Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges<sup>[450]</sup> sowie der Minderung des endoplasmatischen Stresses über Aktivierung des PI3K/Akt/ERK1/2-Signalweges begründet zu sein scheint<sup>[451]</sup>. Darüber hinaus postulieren Svystonyuk *et al.*, dass Fgf2 die Tgf $\beta$ 1-induzierte Myofibroblasten-Aktivierung und ECM-Dysfunktion verringern<sup>[452]</sup>. Interessanterweise scheint Tgf $\beta$ 1 aber auch in diesem Fall durch die 24-stündige Extrakt- und Eluat-Behandlung in seiner Aktivität abgeschwächt zu werden (Abbildung 40, K), wobei insbesondere auffällt, dass mehrere zelluläre *targets*, die sowohl mit dem Fgf- als auch dem Tgf $\beta$ -Signalweg in Verbindung zu stehen scheinen und signifikant herunterreguliert waren, im Kontext Fibrose- und Apoptose-induzierter Gewebe-Remodellierung stehen, wie Col1a1<sup>[453]</sup>, Cadherin 11 (Cdh11)<sup>[454]</sup> oder auch Biglycan (Bgn)<sup>[455]</sup> (Abbildung 40, L-M). *Zeb1* gehörte ebenfalls zu diesen Genen und lässt möglicherweise nicht nur einen Einfluss endoplasmatischer Stress- und Apoptose-Regulation<sup>[456]</sup>, sondern auch einer Epithelial-mesenchymalen Transition und *stemness*-Beeinflussung erkennen<sup>[457]</sup>, wie das Klf4-Aktivitätsprofil vermuten lässt (Abbildung 40, K).

Die in den vorangegangenen Kapiteln bereits diskutierte These eines Extrakt- und Eluat-induzierten zellulären Stresses wird auch durch die Untersuchung der *upstream*-Regulatoren nach 24-stündiger Exposition belegt, wobei WS<sup>®</sup>1442 und die im Methanol Eluat angereicherten Inhaltsstoffe scheinbar Lipopolysaccharid (LPS)-ähnliche Effekte induzieren (Abbildung 40, K). Interessanterweise scheint hierbei eine Vielzahl an zellulären *targets* involviert zu sein, die bereits bei dem negativ-beeinflussten Fgf2- und Tgfβ1-Netzwerk in Erscheinung trat, wobei eine verringerte *Cdh11*-, *Col1a1*- und *Bgn*-Expression für diese Stressor-Aktivität ebenso kennzeichnend war wie eine *Ptgds*- und *Traf1*-Überexpression (Abbildung 40, N). Die Extrakt- und Eluat-induzierte *Zc3h12a*- und *Atf3*-Überexpression scheint in diesem Zusammenhang zudem ebenfalls von Bedeutung zu sein und bestätigt den Eindruck einer zellulären Immunantwort in Folge der 24-stündigen Exposition.

Neben der Regulation apoptotischer und fibrotischer Effekte scheinen WS<sup>®</sup>1442 und Methanol Eluat womöglich aber auch die Angiogenese zu beeinflussen, wobei u.a. das Ephrin-Netzwerk einen möglichen Effektor darstellt (Abbildung 40, K). Insbesondere die Wechselwirkung der Ephrin Tyrosin Rezeptor-Kinase EphB4 und ihres Liganden EphrinB2 ist im Zusammenhang verschiedener embryonaler Entwicklungsprozesse beschrieben und gilt im Zuge pathologischer Formen der Angiogenese wie der Tumor-Vaskularisierung als therapeutisches *target*<sup>[458]</sup>. Darüber hinaus wurde die Bedeutung der EphB4-EphrinB2-Signalisierung für die kardiovaskuläre Entwicklung in mehreren *loss-of-function*-Studien eruiert, wobei eine EphB4- und EphrinB2-Expression im Gefäßendothel und den Ventrikeln des Herzens nachgewiesen werden konnte sowie deren *knockdown* mit Entwicklungsstörungen wie beispielsweise einer fehlerhaften Gefäßbildung oder verringerten Herzgröße assoziiert war<sup>[459]–[461]</sup>. EphB4 scheint zudem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Kontraktilität kleiner Arterien und des Blutdrucks zu haben<sup>[462]</sup> sowie die intrazelluläre Kommunikation von Kardiomyozyten über *gap junctions* zu beeinflussen<sup>[463]</sup>. Ferner zeigen Arbeiten von Steinle *et al.*, dass eine EphB4-Aktivierung die Migration und Proliferation von Endothelzellen über den PI3K/Akt-Signalweg fördert, wohingegen eine Inhibition die Akt-Phosphorylierung mindert und die Zell-Proliferation inhibiert<sup>[464],[465]</sup>. Im Zuge dessen wird die Modulation der EphB4-EphrinB2-Signalisierung auch im Sinne einer therapeutischen Angiogenese bei ischämischen kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert<sup>[466],[467]</sup>. Interessanterweise scheint EphB4 zudem ein Modulator der mesodermalen Differenzierung zu sein wie Untersuchungen an *EphB4*<sup>+/-</sup> und *EphB4*<sup>-/-</sup> pluripotenten embryonalen Stammzellen vermuten lassen<sup>[468]</sup>. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Chen *et al.* mit der auch in dieser Arbeit verwendeten mESC-Reporterzelllinie (CGR8 αMHC-eGFP)<sup>[32]</sup>. Die Autoren geben an, dass eine EphB4-Inhibition die kardiale Differenzierung der murinen ES-Zellen verhindert, wobei dieser Effekt durch die kollagensynthesefördernde Wirkung von Ascorbinsäure<sup>[161],[469]</sup> kompensiert werden konnte<sup>[470]</sup>. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls bei einer Kokultivierung der EphB4-defizienten Zellen (*EphB4*<sup>-/-</sup> ES-Zellen) mit humanen Knochenmark-abgeleiteten Endothelzellen, woraus die Autoren schlussfolgerten, dass die EphB4-exprimierenden Endothelzellen ein Mikroumfeld („*niche*“) bilden, das die kardiale Differenzierung der ES-Zellen fördert. In ihren jüngsten Arbeiten entdeckte

dieselbe Arbeitsgruppe zudem, dass EphB4 und EphrinB2 in Nkx2.5<sup>+</sup> kardialen Vorläuferzellen, aber nicht in  $\alpha$ MHC<sup>+</sup> Kardiomyozyten exprimiert werden, und eine Inhibition der EphB4-EphrinB2-Signalisierung zu einem frühen Zeitpunkt der mESC-Differenzierung die kardiale Entwicklung verhindert<sup>[471]</sup>.

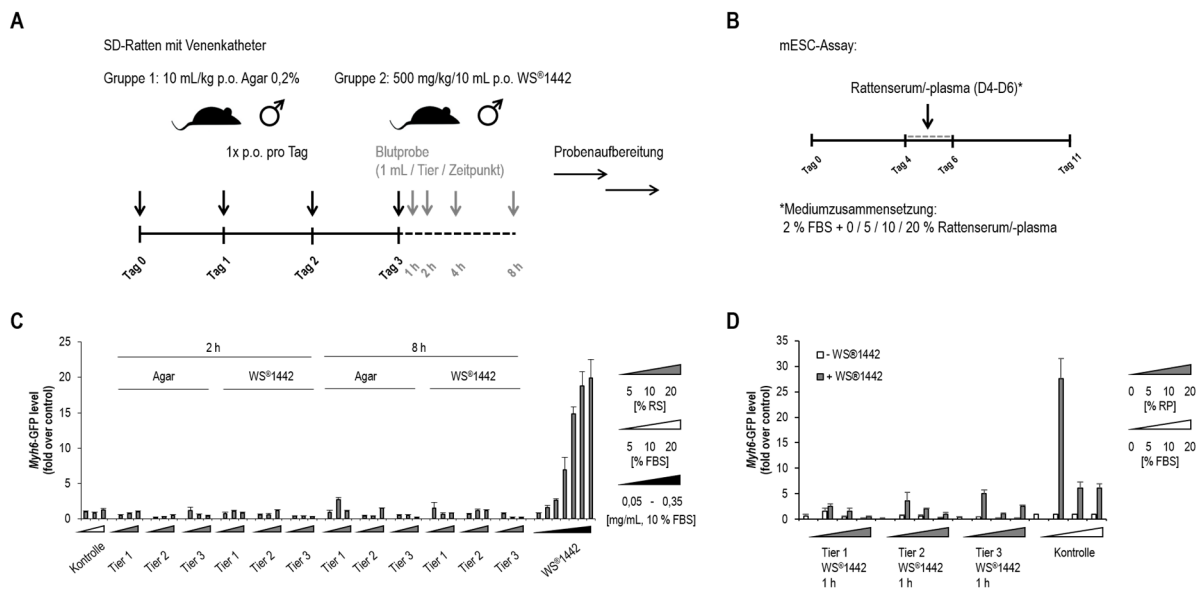
Der negativ regulatorische Einfluss von WS<sup>®</sup>1442 und den in dem Methanol Eluat angereicherten Inhaltsstoffen auf die EphB4-EphrinB2-Signalisierung könnte womöglich also auf einen antiangiogenetischen Effekt hinweisen, der zudem mit dem Expressionsprofil oben diskutierter *targets* (Kapitel 5.8.3.) in Einklang stünde. In diesem Zusammenhang scheint insbesondere der bHLH-Transkriptionsfaktor TAL1 (SCL) von Bedeutung zu sein (Abbildung 40, O), dessen Einfluss auf den Notch-Signalweg und die hämatopoetische System belegt ist<sup>[343]</sup>. Da auch basische Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (bFgf) als pro-angiogene Faktoren gelten<sup>[472]</sup> und *Fgf3* nach 24-stündiger Extrakt- und Eluat-Behandlung signifikant herunterreguliert war, scheint diese Annahme schlüssig. Denkbar wäre aber auch, dass dieses Expressionsprofil im Kontext einer induzierten kardialen Subtypenspezifizierung steht, sodass eine verminderte *Fgf3*- und *Tbx2*-Expression (Abbildung 40, O) möglicherweise die fehlende Ausbildung von Schrittmacherzellen kennzeichnet<sup>[379]</sup>.

## 5.9. Bioverfügbarkeitsstudien

Die Prozesse der Immunantwort sowie der Regeneration haben eine große *in vivo*-Relevanz und sind vor allem im Zusammenhang mit ischämischen Herzkrankheiten und dem Herzinfarkt von Bedeutung. Da die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe des Weißdorn-Extraktes WS<sup>®</sup>1442, die für die Kardiogenese verantwortlich sind und in dem Testmodell der Differenzierung von murinen ES-Zellen zu Kardiomyozyten das in der Transkriptomanalyse gezeigte Wirkprofil zeigen, nicht zwangsläufig eine Wirkung am adulten Herzen haben müssen, sollte in einem nächsten Schritt die Bioverfügbarkeit dieser Inhaltsstoffe untersucht werden.

Hierbei wurden zunächst in einem von dem Kooperationspartner Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG durchgeführten Experiment männliche Ratten (*Sprague Dawley*<sup>®</sup> Ratten) über einen Zeitraum von drei Tagen entweder mit WS<sup>®</sup>1442 oder mit Agar gefüttert und anschließend über einen Venenkatheter nach 1, 2, 4 und 8 h Blutproben entnommen (Abbildung 41, A). Die aufbereiteten Serumproben wurden daraufhin in dem mESC-Differenzierungsassay zwischen Tag 4 und Tag 6 auf die Zellen gegeben, wobei die Konzentration des im Kultivierungsmedium enthaltenen FBS von 10 auf 2 % während der Exposition herabgesetzt wurde (Abbildung 41, B). Dadurch sollte die FBS-Konzentration auf ein die Zellviabilität gewährleistendes Maß reduziert werden, das aber zeitgleich eine Untersuchung der kardiogenen Wirkung der im Rattenserum enthaltenen Inhaltsstoffe in Anwesenheit des FBS ermöglichen sollte ohne darüber hinaus in der Summe zu viel Serum auf die Zellen zu geben.

In den getesteten Serumkonzentrationen 5, 10 und 20 % zeigte sich dabei bei keiner der Proben, weder bei denen, die nach Fütterung mit Agar, noch bei denen, die nach Fütterung mit WS<sup>®</sup>1442 erhalten wurden, eine kardiogene Aktivität. Vielmehr war bei der höchsten Serumkonzentration von 20 % ein Koagulationseffekt zu erkennen, der die gewohnte Kultivierung der Zellen unmöglich machte. Dass generell die Kardiogenese durch die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe des Weißdorn-Extraktes induziert werden konnte, belegt die dosisabhängige kardiogene Aktivität des Weißdorn-Extraktes, und lässt darauf schließen, dass die kardiogenen Inhaltsstoffe nicht bioverfügbar sind (Abbildung 41, C).



**Abb. 41:** Untersuchung der Bioverfügbarkeit der kardiogenen Inhaltsstoffe von WS<sup>®</sup>1442 in der mESC-Differenzierung. Die murinen ES-Zellen werden über 11 Tage in einem 384-Well Assayplattenformat in Differenzierungsmedium kultiviert und von Tag 4 bis Tag 6 mit Serumproben, deren kardiogene Wirkung untersucht werden soll, behandelt. Die PFA-fixierten und DAPI-gefärbten Zellen wurden schließlich fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert und analysiert (4x Vergrößerung, Aufnahme des GFP- und DAPI-Fluoreszenzsignales) und die Ergebnisse als Vielfaches der Kontrollwerte aufgetragen. Die Serumproben wurden dabei von SD-Ratten erhalten, die drei Tage mit WS<sup>®</sup>1442 bzw. Agar in den oben angegebenen Konzentrationen gefüttert wurden und denen anschließend zu den oben angegebenen Zeitpunkten Blutproben entnommen wurden, die daraufhin aufbereitet wurden (**A**). Die erhaltenen Serumproben wurden anschließend von Tag 4 bis Tag 6 mit der oben angegebenen Mediumzusammensetzung auf die Zellen gegeben (**B**). Dabei wurden die Proben entweder mit oder ohne WS<sup>®</sup>1442 (0,25 mg/mL) gespikt (**C-D**). RS=Rattenserum, RP=Rattenplasma. Gezeigt sind die Mittelwerte +/- SEM von mindestens vier Replikaten aus einem repräsentativen Experiment.

Da die hohen getesteten Serumkonzentrationen zu Koagulationseffekten führten mit der Folge, dass in manchen Fällen keine eindeutigen Messwerte erhalten werden konnten, wurde der Experimentaufbau anschließend in der Weise abgeändert, dass zum einen zusätzlich zu den Serum- auch Plasmaproben gewonnen wurden und zum anderen parallel die Proben mit dem Extrakt WS<sup>®</sup>1442 gespikt wurden. Dabei war der Koagulationseffekt ausschließlich bei den Serumproben zu beobachten, sodass diese Proben aus der Messreihe rausfielen. Die Plasmaproben hingegen konnten problemlos im Kultivierungsmedium gelöst und getestet werden mit dem Ergebnis, dass auch hier keine kardiogene Aktivität zu detektieren war (Abbildung 41, D). Bei den gespikten Proben, die parallel getestet wurden, zeigte sich das interessante

Phänomen, dass diese Aktivität abhängig von der Konzentration sowohl des Rinderserums als auch des Rattenplasmas war und folglich eine Bindungsaffinität festzustellen war. Je höher die eingesetzte Konzentration des Serums bzw. Plasmas war, desto geringer war die kardiogene Aktivität des Weißdorn-Extraktes WS<sup>®</sup>1442 in der Konzentration 0,25 mg/mL. Während also die Plasmaproben keine Kardiogenese generierten, war diese für die Proben, die mit WS<sup>®</sup>1442 gespikt wurden, messbar. Es besteht in diesem Zusammenhang jedoch ggf. die Möglichkeit, dass *in vitro* kardiogen wirksame Inhaltsstoffe bei dem Prozess der Serum- und Plasmagewinnung abgetrennt werden bzw. nicht in ausreichend hohen Konzentrationen für eine *in vitro*-Aktivität vorliegen. Dieses wäre insbesondere für die hochmolekularen Substanzen, die sich für die Kardiogenese verantwortlich zeigen, ein Problem.

### 5.10. Zusammenfassung und Ausblick

Der Weißdorn-Spezialextrakt WS<sup>®</sup>1442 wird als Phytotherapeutikum zur symptomatischen Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt, wobei mehrere Studien seine kardio- und vasoprotektive Wirkung belegen<sup>[147]</sup>. Eine regenerative Wirkkomponente wurde dabei noch nicht beschrieben und wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in einem stammzellbasierten Assay-System untersucht. Dabei konnte sowohl in murinen als auch in humanen ES-Zellen eine dosisabhängige kardiogene Aktivität von WS<sup>®</sup>1442 festgestellt werden. Die Extrakt-induzierte Kardiogenese wurde daraufhin in dem hier verwendeten mESC-Differenzierungsassay hinreichend validiert, wobei sowohl die Aktivität des Reporters (GFP) als auch des Promoters ( $\alpha$ MHC) mit Hilfe selektiver Antikörper und verschiedener Methoden (Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie, Western Blot) auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus belegten auch *Tnnt2*<sup>+</sup>-Zellen der Wildtyp- und Reporterzelllinie die Anwesenheit generierter Kardiomyozyten nach WS<sup>®</sup>1442-Behandlung. Dank der von der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG zur Verfügung gestellten Extrakt-Fractionen sowie einer Substanzbibliothek bekannter niedermolekularer Weißdorn-Inhaltsstoffe konnte die kardiogene Aktivität auf hochmolekulare Inhaltsstoffe des Extraktes zurückgeführt werden. In diesem Zusammenhang wiesen die OPC-reichen Fraktionen Ultraretentat (nach Chatterjee *et al.*<sup>[250]</sup>) und Methanol Eluat (nach Vennat *et al.*<sup>[263]</sup>) die höchste kardiogene Aktivität auf und auch die von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas Hensel (Münster) isolierten OPC steigerten erst ab einem Polymerisierungsgrad von  $\geq 7$  die Kardiogenese der murinen ES-Zellen.

Mittels qPCR wurde anschließend der Wirkmechanismus von WS<sup>®</sup>1442 und der in dem Methanol Eluat angereicherten kardiogenen Inhaltsstoffe auf zellulärer Ebene untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass diese während der Exposition in der Phase höchster kardiogener Extrakt- und Eluat-Aktivität vermutlich (frühe) kardiale Vorläuferzellen adressieren, da diese Zellen den spezifischen Marker *Mesp1* exprimierten. Interessanterweise war in diesem Zusammenhang zu beobachten, dass während der 48-stündigen Exposition scheinbar die kardiale Spezifizierung durch WS<sup>®</sup>1442 und insbesondere das Methanol Eluat massiv gefördert werden konnte, da

die *Mef2c*-Expression stark zunahm, was zur Folge hatte, dass zum Ende des Assays signifikant mehr *Tnnt2*<sup>+</sup> Kardiomyozyten nachgewiesen werden konnten.

Wie nachfolgende Untersuchungen mittels verschiedener Assays (Ki67-Antikörperfärbung, *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>- und WST-1-Assay) ergaben, liegt der kardiogene Wirkmechanismus dabei vermutlich nicht in einem proliferationsstimulierenden Effekt begründet, da weder ein signifikanter Zellzuwachs noch eine gesteigerte metabolische Aktivität, die Rückschlüsse auf die Zellzahl zulässt, festgestellt werden konnten. Die Assays zeigten in diesem Zusammenhang jedoch, dass vor allem eine längere Exposition von WS<sup>®</sup>1442 und der kardiogenen Fraktionen die Viabilität der Zellen negativ beeinflusste, was vor allem für den Gesamtextrakt galt. Mit Hilfe der im Arbeitskreis etablierten Reporterassays sollte im Anschluss eruiert werden, ob dahingegen die kardiogene Aktivität auf eine Modulation der für die Kardiogenese bedeutsamen Signalwege Activin A, BMP, TGF $\beta$  und Wnt zurückzuführen ist. Hierbei zeigten die beiden kardiogensten Fraktionen Ultraretentat und Methanol Eluat insbesondere eine deutliche Aktivierung des BMP-Signalweges, was möglicherweise den (eigentlichen) kardiogenen Effekt zusätzlich fördern könnte, aber jedoch allein nicht ursächlich für diesen ist, da u.a. der Extrakt WS<sup>®</sup>1442 kaum eine Aktivität zeigte. Dieser wies hingegen eine Aktivierung des Wnt-Signalweges auf, was jedoch der Kardiogenese zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung zuwiderläuft und wahrscheinlich auf eine Stoffklasse zurückzuführen ist, die in den anderen, kardiogenen Fraktionen nicht angereichert wird, da diese Fraktionen den Wnt-Signalweg eher inhibierten.

Um die mechanistischen Untersuchungen noch detaillierter durchführen zu können, wurde eine Transkriptomanalyse in Auftrag gegeben, mit deren Hilfe zum einem der unmittelbare Effekt von WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat nach 6-stündiger Exposition erfasst werden sollte und zum anderen der durch verschiedene regulatorische Mechanismen entstehende Genotyp nach längerer Exposition (24 h), wobei die Schnittmenge der Expressionsprofile von Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen die Wahrscheinlichkeit erhöhen sollte, den zugrunde liegenden kardiogenen Wirkmechanismus aufzuklären. Interessanterweise bestätigten dabei die Expressionsprofile u.a. die These aus den Viabilitäts- und Proliferationsassays, dass die Behandlung mit WS<sup>®</sup>1442 und den in den kardiogenen Fraktionen angereicherten Inhaltsstoffen die Zellen zu stressen scheint, wodurch womöglich nicht nur ihre Viabilität beeinflusst wird. So wiesen die Extrakt- und Eluat-behandelten Zellen nach 6-stündiger Exposition eine signifikante Überexpression verschiedener Gene auf, die für Entzündungsproteine (*Atf3*, *Icam1*), Zytokine (*IL2*, *Tnf*) und Chemokine (*Ccl2*, *Gnal*) kodieren, wobei die Expression der Gene *Atf3* und *Ptgds*, die eine unmittelbare Immunantwort belegen, im Verlauf der Exposition sogar noch weiter anstieg. In diesem Zusammenhang zeigte sich auch eine Überexpression von Genen, die mit apoptotischen Prozessen assoziiert sind (*Bhlhe41*, *Phf11b*). Möglich wäre dementsprechend, dass WS<sup>®</sup>1442 und die im Methanol Eluat angereicherten Inhaltsstoffe durch die Stimulation apoptotischer Prozesse zum einen umbaufördernde

Mechanismen aktivieren, die insbesondere kardiale Entwicklungsprozesse begünstigen wie die Mesoderm-Strukturierung (*Pcdh19*-Überexpression), und zum anderen eventuell einen Selektionsdruck auf bestimmte Zellpopulationen ausüben, sodass andere Entwicklungspfade zugunsten der kardialen Spezifizierung gehemmt werden.

Eine *Aldh1a2*-Überexpression und damit Aktivierung des Retinsäure (RA)-Signalweges nach 24-stündiger Extrakt- bzw. Eluat-Behandlung könnte darüber hinaus ebenfalls mit der kardiogenen Aktivität im Zusammenhang stehen. Mehrere Studien belegen dabei den positiven Einfluss des RA-Signalweges für die kardiale Differenzierung muriner und humaner ES-Zellen, wobei ein atrialer Kardiomyozyten-Subtyp gefördert wird<sup>[271],[272],[419]</sup>. Interessanterweise zeigten in diesem Zusammenhang qPCR-Experimente, dass die *Tnnt2*<sup>+</sup> Kardiomyozyten, die nach WS<sup>®</sup>1442- und Methanol Eluat-Behandlung erhalten wurden, ebenfalls vornehmlich atrialen Genotyps (*Mlc2a*<sup>+</sup>) waren. Ob die im Vergleich zur *Mlc2v*-Expression erhöhte *Mlc2a*-Expression jedoch diese These stützt oder vielmehr einen unreifen Kardiomyozyten-Typ kennzeichnet, müssen nachfolgende Untersuchungen mit länger kultivierten Kardiomyozyten zeigen, die dann vor allem elektrophysiologisch analysiert werden.

Darüber hinaus ergaben Untersuchungen der *upstream*-Regulatoren einen Einfluss des BDNF-Netzwerkes, der auch in Zusammenhang mit der Extrakt- und Eluat-induzierten Stimulation *Sca1*<sup>+</sup> kardialer Vorläuferzellen stehen könnte. Studien mit murinen *in vivo*-Herzinsuffizienz-Modellen verweisen dabei auf die besondere Rolle von BDNF und *Sca1* bei der Wiederherstellung der Funktion beschädigtem Myokardgewebes<sup>[389]</sup>, wobei auch im Menschen ein funktionales Ortholog von *Sca1* zu existieren scheint<sup>[473]</sup>. Demzufolge wäre es sehr interessant diesen Mechanismus mit WS<sup>®</sup>1442 und den in dem Methanol Eluat angereicherten Inhaltsstoffen zu verifizieren und weiter zu untersuchen.



## 6. Zusammenfassung

Die Regenerative Medizin hat durch bahnbrechende Erkenntnisse in der Stammzellbiologie und ein zunehmendes Verständnis regenerativer Mechanismen *in vivo* in den vergangenen Jahren eine rasante Fortentwicklung erfahren<sup>[30]</sup>. Die Wiederherstellung funktionellen Gewebes umfasst in diesem Zusammenhang sowohl exogene Therapieansätze wie die Transplantation *in vitro*-generierter Zellen und Gewebe als auch die Aktivierung endogener Regenerationsprozesse durch Stimulation der Differenzierung und Proliferation verschiedener Vorläuferzellpopulationen *in vivo*. Für beide Applikationen sind spezifische, niedermolekulare Modulatoren von differenzierungsrelevanten Prozessen von großer Bedeutung. Der Wert solcher Substanzen wird aber auch bei der kostengünstigen und robusten biotechnologischen Produktion verschiedenster Stammzell-abgeleiteter Zellen für den Einsatz in der pharmakologischen und toxikologischen Diagnostik deutlich.

Nachdem bereits vielfältige niedermolekulare Alternativen zu diversen natürlichen Faktoren beschrieben wurden, die in der Stammzellbiologie eingesetzt werden, gibt es nur sehr wenige und teils zweifelhafte Substanzen mit mimetischer Wirkung, die *bone morphogenetic proteins* (BMPs) ersetzen. In diesem Zusammenhang konnten im Rahmen dieser Arbeit in einem Screening-basierten Ansatz einzigartige niedermolekulare Aktivator des BMP-Signalweges identifiziert werden, die medizinisch weiterentwickelt und zukünftig möglicherweise in der Stammzelltechnologie für die kosteneffiziente und effektive mesodermale Differenzierung von Stammzellen sowie der Therapie osteopenischer Erkrankungen eingesetzt werden können. Für diesen Zweck konnte erfolgreich ein Hochdurchsatz-kompatibler phänotypischer Assay mit murinen ES-Zellen entwickelt werden, wobei die Idee war, die Vorteile eines hohen Durchsatzes, wie er typischerweise in z.B. einfachen zellulären Reporterassays möglich ist, mit der physiologischen Relevanz komplexerer *in vivo*-Assays (z.B. in Zebrafisch-Embryos) zu fusionieren. Dafür wurde in einem chemisch-biologischen Ansatz systematisch mit verschiedenen kardiogenen Substanzen erstmalig eine zeitlich konzentrierte Selektivität und Sensitivität des BMP-Signalweges gegenüber anderen Signalwegen während der kardialen Entwicklung der Zellen in diesem Assay-System herausgearbeitet. Durch nachfolgende Optimierungen mechanistischer und technischer Aspekte des Assays war es möglich, einen Primärscreen mit 1408 Substanzen durchzuführen und zwölf Hits (Hit-Rate 0,9 %) zu identifizieren, die im Anschluss über IC<sub>50</sub>-Bestimmungen und orthogonale Assays zur Untersuchung der BMP-Aktivität (Synergismus und Mimesis) sowie der Selektivität gegenüber anderen Signalwegen validiert werden konnten.

Naturstoff-inspirierte Ansätze zur Entwicklung innovativer regenerativer Wirkstoffe finden in der Medikamentenforschung eine breite Anwendung und wurden auch im Rahmen dieser Arbeit als Ausgangspunkt verwendet. Nachdem bereits mehrere Studien positive Effekte auf Infarkt-geschädigtes Myokardgewebe sowie

vasoprotektive Eigenschaften von *Crataegus*-Extrakten postuliert hatten<sup>[147]</sup>, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch eine kardiogene und regenerative Wirkkomponente eine Rolle spielt. In diesem Zusammenhang wurde der Weißdorn-Spezialextrakt WS®1442 erstmalig in stammzellbasierten Assay-Systemen getestet, wobei sowohl in murinen als auch in humanen ES-Zellen eine dosisabhängige kardiogene Aktivität festgestellt werden konnte. Die Kardiogenese konnte in dem murinen Assay-System auf Protein- und mRNA-Ebene umfangreich validiert und mit Hilfe zur Verfügung gestellter Extrakt-Fractionen und Referenzsubstanzen (Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG) einer hochmolekularen Inhaltsstoffklasse zugeordnet werden. Die OPC-reichen Fraktionen Ultraretentat und Methanol Eluat wiesen dabei die höchste kardiogene Aktivität auf und konnten bemerkenswerterweise die Kardiogenese vergleichbar stark fördern (8 bis 9 % Kardiomyozyten) wie selektive niedermolekulare Inhibitoren bekannten kardiogenen Wirkprofils (DMH-1, ITD-1). Wie mechanistische Untersuchungen mittels qPCR ergaben, stimulierten die in diesen Fraktionen angereicherten Inhaltsstoffe (frühe) kardiale Vorläuferzellen (*Mesp1*<sup>+</sup>, *Mef2c*<sup>+</sup>), wobei die Förderung der kardialen Spezifizierung und damit der kardialen Entwicklung weder in einem proliferationsstimulierenden Effekt noch allein in einer Modulation der kardiogeneserelevanten Signalwege Activin A, TGF $\beta$ , BMP und Wnt begründet lag. Nachfolgende mechanistische Untersuchungen auf molekularer Ebene via zeitaufgelöster Transkriptomanalysen lassen aber eine indirekte Inhibierung des FGF- und TGF $\beta$ -Signalweges vermuten und bestätigten darüber hinaus den zuvor beobachteten Effekt einer Stressinduktion. Hierbei konnte eine unmittelbare Immunantwort Extrakt- und Methanol Eluat-behandelter kardialer Vorläuferzellen sowie apoptotische Prozesse anhand der Expressionsprofile (*Atf3*<sup>+</sup>, *Ptgds*<sup>+</sup>, *Ccl2*<sup>+</sup>, *IL2*<sup>+</sup>, *Bhlhe41*<sup>+</sup>) belegt werden. Ein sehr interessanter kardiogener Mechanismus könnte zudem die Stimulation des Retinsäure-Signalweges sein, wie die Extrakt- und Eluat-induzierte *Aldh1a2*-Überexpression vermuten ließ. Darüber hinaus wurde BDNF über eine bioinformatische Analyse der Expressionsdaten als möglicher Effektor vorhergesagt. Dieser Mechanismus erscheint plausibel, da gleichzeitig auch *Sca1*<sup>+</sup> kardiale Vorläuferzellen durch WS®1442- und Methanol Eluat-Behandlung stimuliert wurden. Die Bedeutung von BDNF und *Sca1*<sup>+</sup> Vorläuferzellen ist im Kontext von *in vivo*-Herzinsuffizienz-Modellen literaturbekannt<sup>[389]</sup> und wäre perspektivisch hochinteressant mit den hier untersuchten Extrakten zu verifizieren. Insgesamt wurden damit verschiedene mögliche Effektoren und Regulationsmechanismen für die beobachtete kardiomyogene Aktivität von WS®1442 ermittelt, die in künftigen Arbeiten tiefergehend charakterisiert werden müssen. Dafür sind insbesondere die hier identifizierten mit kardiogen wirksamen Inhaltsstoffen angereicherten Fraktionen aus WS®1442 geeignet. Die Translation einer regenerationsrelevanten Wirkkomponente auf die *in vivo*-Situation würde einen gänzlich neuen pharmakologischen Wirkmechanismus für die traditionell verwendeten Weißdorn-Extrakte bedeuten.

## 7. Abstract

The field of regenerative medicine has tremendously evolved in recent years owing to milestone discoveries in stem cell biology and regeneration. The impact of small molecules is particularly intriguing as they can be used both for regenerative therapies and stem cell-based technologies like safety pharmacology or disease modeling<sup>[30]</sup>.

Small molecule activators of the bone morphogenetic protein (BMP)-signaling pathway hold promise for many applications in stem cell research such as (cost-)efficient and robust mesodermal differentiation from ES and iPS cells or as regenerative therapeutics for degenerative bone diseases. In this context, a phenotypic assay in mESCs, designed to combine assets of a high-throughput format with physiological (morphogenetic) relevance, was developed to identify BMP-mimetics. A chemical biology approach employing known cardiogenic compounds enabled the characterization of BMP signaling selectivity compared to other developmental pathways for the first time in this assay system. Mechanistic as well as technical assay parameters were optimized and allowed screening of a 1408 compounds-comprising library. Twelve small molecule BMP mimetics were identified and validated via IC<sub>50</sub> determination and a set of orthogonal assays. Their utility as chemical tools for stem cell technologies and as regenerative therapeutics will have to be explored in future studies.

Natural products frequently serve as an inspiration and attractive starting point for the development of novel pharmacological agents. Based on many positive effects on the heart post-infarction and the overall cardiovascular protective activity of *Crataegus ssp.*<sup>[147]</sup>, this work aimed at studying whether also mechanisms of cardiac differentiation and regeneration could possibly play a role. In this regard, the standardized *Crataegus* extract WS<sup>®</sup>1442 was tested in stem cell-based assays for the first time, stimulating cardiac differentiation from murine and human ESCs in a dose-dependent manner after mesoderm was formed. Validation experiments confirmed cardiomyocyte formation in murine reporter and wild type cells on transcript and protein levels. Bioassay-guided fractionations of the extract suggested that the cardiogenic activity derived from rather high-molecular weight compound classes since OPC-rich fractions highly stimulated cardiogenesis (i.e., 8-9 % cardiomyocytes). Mechanistic studies indicated that the active ingredients of WS<sup>®</sup>1442 likely target early cardiac progenitors (*Mesp1*<sup>+</sup>, *Mef2c*<sup>+</sup>) and stimulate rather their differentiation than proliferation (expansion). However, modulation of canonical Wnt signaling and the TGF $\beta$  superfamily was inconclusive. Time-resolved gene expression profiling suggested inhibitory activities on TGF $\beta$ -, FGF- and EPHB4-pathways. Moreover, whole extract- and active fraction-treated cells showed upregulation of genes associated with cellular stress response and apoptosis (*Atf3*<sup>+</sup>, *Ptgds*<sup>+</sup>, *Ccl2*<sup>+</sup>, *IL2*<sup>+</sup>, *Bhlhe41*<sup>+</sup>). Upregulated *Aldh1a2*-expression indicated a *Crataegus*-induced stimulation of retinoic acid signaling. Analysis of upstream regulators further suggested the involvement of SMARCA4 and BDNF as a potential effectors. The latter is possibly

linked to the stimulation of Sca<sup>+</sup> cardiac progenitor cells, as reported for failing murine hearts<sup>[389]</sup>. Translation of a regenerative mode-of-action from *in vitro* to *in vivo* would imply a new pharmacology of the traditionally used *Crataegus* extract, but remains to be shown in the future.

## 8. Material und Methoden

### 8.1. Material

#### 8.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
APS	Sigma Aldrich
Beta-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
Bromphenolblau	Carl Roth
Cell Lysis Buffer (10x)	Cell Signaling
Chloroform	VWR
cOmplete™ Mini, EDTA-frei	Roche
DAPI	Carl Roth
DMEM, high glucose, pyruvate, no glutamine	Gibco
DMSO	Agros Organics
DPBS, w/o Ca/Mg	PAN Biotech
Ethanol	VWR
FBS	PAN Biotech
Formaldehyd-Lösung (37 %)	Carl Roth
Gelatine-Lösung 0,1 %	PAN Biotech
GlutaMAX™	Gibco
Glycin	Carl Roth
Isopropanol	VWR
Methanol	VWR
NaCl	Carl Roth
NEAA	Gibco
Odyssey® Blocking Buffer	LI-COR Biosciences
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/mL)	Gibco
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 / 3	Sigma Aldrich
Precision Plus Protein™ Standard Dual Color	Bio-Rad

Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth
Saponin	Carl Roth
SDS	Carl Roth
TEMED	Carl Roth
Tris Base	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
TRIsure™	Bioline
Triton® X-100	Serva
Trypanblau	Gibco
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Gibco
Tween® 20	Sigma Aldrich
Wasser, nukleasefrei	Carl Roth

### 8.1.2. Antikörper

Antigen	Wirt	Hersteller	Kat.-Nr.	Konzentration
<b>Primärantikörper</b>				
Gapdh	<i>rabbit</i>	Cell Signaling	2118	1:5000
$\alpha$ -Tubulin	<i>mouse</i>	Sigma Aldrich	T6793	1:5000
MHC eFluor® 660	<i>mouse</i>	eBioscience	50-6503	1:200
GFP	<i>rabbit</i>	AnaSpec	29779-500	1:100
Oct4	<i>rabbit</i>	Abcam	ab19857	1:100
cTnT	<i>mouse</i>	Thermo Scientific	13-11	1:100
$\alpha$ -Actinin	<i>mouse</i>	Sigma Aldrich	T7811	1:100
Ki67	<i>rabbit</i>	Santa Cruz	sc-15402	1:100
<b>Sekundärantikörper</b>				
<i>anti-rabbit</i> AF® 568	<i>goat</i>	Thermo Scientific	A11011	1:1000
<i>anti-rabbit</i> AF® 750	<i>donkey</i>	Abcam	ab175730	1:1000
<i>anti-mouse</i> IRDye® 680	<i>goat</i>	LI-COR	926-68070	1:10.000
<i>anti-rabbit</i> IRDye® 800	<i>goat</i>	LI-COR	926-32211	1:10.000

### 8.1.3. Assay-Kits

Assay-Kit	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
CytoScan™ WST-1 Cell Cytotoxicity Assay	G-Biosciences
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
qScript™ cDNA SuperMix	Quanta Biosciences
Takyon™ No Rox SYBR MasterMix dTTP Blue	Eurogentec

### 8.1.4. Proteine

Proteine	Kat.-Nr.	Lot-Nr.	Hersteller
Activin A	7014-8993-U500	E17939-102	eBioscience
BMP4	314-BP	BEM10214113	R&D Systems
FGF2	100-18B	071308-2	PeproTech
LIF	PMC4054	11802H	Gibco
LIF	-	20150621	DPF Dortmund
TGFβ1	14-8348-62	E05766-1633	eBioscience
TGFβ2	GF113	2151828	Merck Millipore
VEGF	100-20	081310	PeproTech

### 8.1.5. Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Analysenwaage CP225D	Sartorius
Aspirationskamm (8-Kanal)	Drummond Scientific Co.
Countess™ Zellzähler	Invitrogen
Durchflusszytometer LSRII	Becton Dickinson
Echo® 520 Liquid Handler	Labcyte
Elektrophorese-/Blotting-Apparatur, Mini-PROTEAN®	Bio-Rad
EVOS® XL Core Imaging System	Invitrogen
Gefrierbehälter, Mr. Frosty™	Thermo Scientific

---

Gelgieß-Apparatur	Bio-Rad
Horizontal-Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments
ImageXpress Micro XL	Molecular Devices
Inkubator Hera Cell 150i	Thermo Scientific
LightCycler® 480 Instrument II	Roche
Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic	IKA
Microplate Reader infinite M1000	Tecan
Microplate Washer ELx405 Select CW	Biotek
Multidrop™ Combi	Thermo Scientific
NanoDrop™ 2000c	Thermo Scientific
Neubauer Zählkammer	Brand
Odyssey® CLx Imaging System	LI-COR Biosciences
Pipette, Matrix®	Thermo Scientific
Pipette Research 10 / 100 / 200 / 1000 µL	Eppendorf
Pipette Research, Mehrkanal 10 µL	Eppendorf
Pipettierhilfe, accu-jet® pro	Brand
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments
Powerpack	Bio-Rad
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments
Sterilbank Clean Air EN 12469	Thermo Scientific
Thermo Shaker TS-100 (SC-18/SC-20)	Lab4you
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf
Wasserbad SW22	Julabo
Zentrifuge 5415R/5804R	Eppendorf



### 8.1.6. qPCR-Primer

Gen	Primer-Sequenz (5' – 3')	Marker
<i>Gapdh</i>	<i>forward:</i> AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	HK
	<i>reverse:</i> TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
<i>Actb</i>	<i>forward:</i> ACCCTAAGGCCAACCGTGA	HK
	<i>reverse:</i> ATGGCGTGAGGGAGAGCATA	
<i>Oct4</i>	<i>forward:</i> TAGGTGAGCCGTCTTTCCAC	P
	<i>reverse:</i> GCTTAGCCAGGTTTCGAGGAT	
<i>Nanog</i>	<i>forward:</i> TCACACTGACATGAGTGTGG	P
	<i>reverse:</i> AGGAGAGTTCTTGCATCTGC	
<i>Mesp1</i>	<i>forward:</i> CCATCGTTCCTGTACGCAGA	M
	<i>reverse:</i> CTAGAAGAGCCAGCATGTCTG	
<i>Mef2c</i>	<i>forward:</i> AGATCCCGATGCAGACGATT	KV
	<i>reverse:</i> AGACCGCCTGTGTTACCTG	
<i>Tnnt2</i>	<i>forward:</i> CAGAGGAGGCCAACGTAGAAG	KM
	<i>reverse:</i> TCGATCAGAGTCTGTAGCTCATT	
<i>Pecam</i>	<i>forward:</i> GAAGCCAACAGCCATTACGG	E
	<i>reverse:</i> GGAGCCTTCCGTTCTTAGGG	
<i>Acta2</i>	<i>forward:</i> ACTACTGCCGAGCGTGAG	SM
	<i>reverse:</i> TGCTGTTATAGGTGGTTTCGTG	

HK: *housekeeping gene* (Referenzgen), P: Pluripotenz, M: kardiales Mesoderm, KV: kardiale Vorläufer, KM: Kardiomyozyten, E: Endothelzellen, SM: *smooth muscle cells* (glatte Muskelzellen).

### 8.1.7. Zelllinien

Zelllinie	Reporter	Organismus	Quelle
CGR8	$\alpha$ MHC-eGFP	Maus	Sanford-Burnham Medical Research Institute Mercola Lab
CGR8		Maus	

### 8.1.8. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumklebefolie	Corning
Assayplatte, half-well, weiß (#3693)	Corning
Blotting-Filterpapier	Bio-Rad
Countess™ Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen
Einmalspritzen, 5 / 20 mL	Braun
Immobilon-FL PVDF-Membran	Merck Millipore
Kryoröhrchen	Sarstedt
Kultivierungsplatte, 384-Well, schwarz (#781091)	Greiner Bio-One
Kultivierungsplatte, 6-Well (#83.3920.005)	Sarstedt
MegaBlock® 96 Well, 1,1 / 2,2 mL	Sarstedt
Nitrilhandschuhe	VWR
Parafilm®	VWR
Pasteurpipetten, Glas	Brand
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 mL	Kisker Biotech
PCR-Reaktionsgefäß-Streifen, 0,2 mL	Kisker Biotech
Pipettenspitzen, 10 / 200 / 1000 µL	Biozym
Pipettenspitzen, Matrix®, 125 µL	Thermo Scientific
qPCR-Platte, 384 Well, weiß	Sarstedt
Reagenzreservoirs, 25 mL	VWR
Reaktionsgefäße, 0,5 / 1 / 2 mL	Sarstedt
Serologische Pipetten, 2 / 5 / 10 / 20 mL	Sarstedt
Spritzenfilter mit PVDF-Membran, 0,45 µm	VWR
Wasserbad-Schutzmittel	VWR
Zell-Sieb-System, Falcon®	Corning
Zentrifugenröhrchen, 15 / 50 mL	Sarstedt

## 8.1.9. Medien und Puffer

### 8.1.9.1. Medien

Kultivierungsmedium mESC:	86,7 %	DMEM
(Pluripotenzerhaltung)	10 %	FBS
	1 %	GlutaMAX
	1 %	NEAA
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	0,1 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	15 ng/mL	LIF

Kultivierungsmedium mESC:	86,7-95 %	DMEM
(Kardiogenese-Assay)	2-10 %	FBS
	1 %	GlutaMAX
	1 %	NEAA
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	0,1 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

Einfriermedium mESC:	66,7 %	DMEM
	20 %	FBS
	10 %	DMSO
	1 %	GlutaMAX
	1 %	NEAA
	1 %	Penicillin/Streptomycin
	0,1 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

### 8.1.9.2. Puffer

Elektrophoresepuffer (10x)	250 mM	Tris Base
	2 mM	Glycin
	35 mM	SDS

Elektrophoresepuffer (1x)	100 mL	Elektrophoresepuffer (10x)
	900 mL	H <sub>2</sub> O bidest
Transferpuffer (10x):	250 mM	Tris Base
	2 mM	Glycin
Transferpuffer (1x):	100 mL	Transferpuffer (10x)
	200 mL	Methanol
	700 mL	H <sub>2</sub> O bidest
TBS-Puffer (10x)	200 mM	Tris
	1,5 M	NaCl
	pH 7.6	
TBST-Puffer	100 mL	TBS-Puffer (10x)
	900 mL	H <sub>2</sub> O bidest
	1 mL	Tween <sup>®</sup> 20
SDS-Ladepuffer (5x):	0,6 mL	Tris-HCl (1 M, pH 6.8)
	5 mL	Glycerol (50 %)
	2 mL	SDS (10 %)
	0,5 mL	β-Mercaptoethanol
	1 mL	Bromphenolblau (1 %)
	0,9 mL	H <sub>2</sub> O bidest
Trenngel-Puffer (12 %)	3900 μL	Tris (1,5 M, pH 8.8)
	150 μL	SDS (10 % w/v)
	6000 μL	Acrylamid (30 % w/v)
	150 μL	APS (10 % w/v)
	15 μL	TEMED
	4800 μL	H <sub>2</sub> O bidest

Sammelgel-Puffer	1250 µL	Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)
	50 µL	SDS (10 % w/v)
	670 µL	Acrylamid (30 % w/v)
	50 µL	APS (10 % w/v)
	5 µL	TEMED
	2975 µL	H <sub>2</sub> O bidest
Zellyse-Puffer	1 mL	Cell Lysis Buffer (10x)
	9 mL	H <sub>2</sub> O bidest
	100 µL	Phosphatase Inhibitor Cocktail 2
	100 µL	Phosphatase Inhibitor Cocktail 3
	1 Tablette	cOmplete™ Mini, EDTA-frei

## 8.2. Methoden

### 8.2.1. Zellkultivierung

Die Arbeiten mit den murinen embryonalen Stammzellen (mESC) der Wildtyp- und Reporterzelllinie erfolgten unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank, wobei alle verwendeten Materialien zuvor autoklaviert bzw. desinfiziert wurden. Das Kultivierungsmedium wurde zudem vor dem Gebrauch zunächst im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte anschließend in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 8.2.1.1. Auftauen von pluripotenten Stammzellen (mESC)

Die bei -150 °C kryokonservierten Zellen wurden nach raschem Auftauen im Wasserbad vorsichtig in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Kultivierungsmedium überführt und anschließend zentrifugiert (25 °C, 3 min, 1200 rpm). Danach wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit LIF-haltigem Kultivierungsmedium resuspendiert. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war, wurden die Zellen schließlich in einer Konzentration von 15.000 bis 20.000 Zellen pro mL LIF-haltigem Kultivierungsmedium in zuvor Gelatine-beschichtete Wells einer 6-Well-Kultivierungsplatte ausplattiert und im Inkubator kultiviert.

### 8.2.1.2. Kultivierung von pluripotenten Stammzellen

Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage bis zu einer Konfluenz von etwa 60 bis 80 % passagiert. Dazu wurde zunächst die für die Weiterkultivierung gewünschte Anzahl an Wells einer 6-Well-Kultivierungsplatte mit einer 0,1%igen Gelatine-Lösung beschichtet und bei RT inkubiert. Nachdem das Kultivierungsmedium von den Zellen abgenommen worden war, wurden diese zunächst vorsichtig mit DPBS gewaschen, bevor sie mit der im Wasserbad vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und weitere 2 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe vorgewärmten Kultivierungsmediums gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (25 °C, 3 min, 1200 rpm). Nachdem der Überstand abgenommen worden war, wurde das Zellpellet mit LIF-haltigem Kultivierungsmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. In einem Zentrifugenröhrchen wurde daraufhin mit LIF-haltigem Kultivierungsmedium durch mehrmaliges Resuspendieren eine homogene Zellsuspension in einer Konzentration von 15.000 bis 20.000 Zellen pro mL hergestellt und diese in den zuvor Gelatine-beschichteten Wells ausplattiert. Abschließend wurde durch mehrmaliges Formen einer Acht (manuelle Bewegung der Zellkulturschale) die homogene Verteilung der Zellen in den Wells erzielt und diese unter dem Mikroskop verifiziert, bevor die Zellen im Inkubator weiterkultiviert wurden.

### 8.2.1.3. Einfrieren von pluripotenten Stammzellen

Um die Zellen zu kryokonservieren, wurde bei der jeweiligen Zellpassage das Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert. Dabei wurde für jedes Kryoröhrchen die Zellkonzentration auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro mL eingestellt und diese zunächst im Gefrierbehälter bei -80 °C schrittweise (1 °C pro min) heruntergekühlt, bevor sie am nächsten Tag bei -150 °C endgelagert wurden.

### 8.2.1.4. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde entweder mit einem automatischen Zellzähler oder mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung gemischt und 10 µL dieser Suspension auf eine Zählkammer gegeben und ausgezählt.

### 8.2.1.5. HT-Kardiogenese-Assay mit murinen ES-Zellen

Für den Kardiogenese-Assay wurden murine embryonale Stammzellen der Zelllinie CGR8 verwendet, die stabil mit dem Promoter-Reporter-Konstrukt  $\alpha$ MHC-GFP transfiziert worden waren. Diese wurden nach der jeweiligen Passage in LIF-freiem

Kultivierungsmedium und einer Konzentration von 500 Zellen pro 50  $\mu\text{L}$  pro Well in einer Gelatine-beschichteten 384-Well-Kultivierungsplatte ausgesät (= Tag 0) und über einen Zeitraum von elf Tagen im Inkubator (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ) kultiviert. In Abhängigkeit des Wirkprofils wurden die jeweils untersuchten kardiogenen Substanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Assays hinzugegeben, wobei das Assay-Volumen nach drei Tagen (= Tag 3) auf 75  $\mu\text{L}$  pro Well erhöht wurde und ein Mediumwechsel nach maximal 48 h erfolgte. Nach elf Tagen (= Tag 11) wurden die Zellen schließlich mittels 4%iger Formaldehydlösung fixiert, die Zellkerne mit DAPI (1:1000) angefärbt und nach mehrmaligem Waschen mit DPBS fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Analyse erfolgte anschließend mittels MetaXpress 5.3 unter Verwendung des *Multiwavelength Cell Scoring*-Algorithmus.

#### 8.2.1.6. BMP-Mimetika Screening-Assay mit murinen ES-Zellen

Für die Untersuchung neuer Aktivatoren des BMP-Signalweges wurde der mESC-basierte *HT*-Assay auf die Robotik übertragen. Dabei wurden an Tag 0 des Assays pro Well 500 Zellen der Reporterzelllinie CGR8  $\alpha\text{MHC-GFP}$  in 25  $\mu\text{L}$  Kultivierungsmedium (10 % FBS) auf einer zuvor Gelatine-beschichteten 384-Well-Kultivierungsplatte mit Hilfe des Multidrop™ Dispensers ausgesät und über elf Tage kultiviert (37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$ ). An Tag 3 wurden zunächst fokussierte Bibliotheken niedermolekularer Substanzen mit Hilfe des *Echo® Liquid Handlers* auf die Zellen transferiert und anschließend pro Well 50  $\mu\text{L}$  Kultivierungsmedium (4 % FBS), in dem der selektive BMP-Inhibitor DHM-1 in einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{M}$  gelöst war, mit Hilfe des Multidrop™ Dispensers hinzugegeben. Nach 24 h wurde an Tag 4 das Medium aspiriert und durch 75  $\mu\text{L}$  Kultivierungsmedium (10 % FBS) pro Well ersetzt. Dieser Schritt wurde an Tag 8 erneut wiederholt. An Tag 11 wurden die Zellen zunächst Formaldehyd-fixiert (16%ige Formaldehydlösung) und DAPI-gefärbt (1:250) und nach dreimaligem Waschen mit PBS fluoreszenzmikroskopisch in den Kanälen FITC (= GFP) und DAPI vermessen. Die Analyse erfolgte anschließend mittels MetaXpress 5.3 unter Verwendung des *Multiwavelength Cell Scoring*-Algorithmus.

## 8.2.2. Immunzytochemische Methoden

### 8.2.2.1. Antikörperfärbung

Die Formaldehyd-fixierten sowie DAPI-gefärbten Zellen in der 384-Well-Kultivierungsplatte wurden zunächst mit Hilfe einer 0,25%igen Triton X-100 Lösung über einen Zeitraum von mindestens 30 min bei RT permeabilisiert. Diese Reaktion wurde anschließend über denselben Zeitraum mittels einer 10%igen FBS-Lösung gestoppt. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurde der Primärantikörper in einer Konzentration von 1:100 bis 1:200 auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nachdem erneut mit DPBS gewaschen worden war, wurde anschließend der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 hinzugegeben (RT, 4 h,

dunkel). Abschließend wurden die Zellen erneut mehrere Male mit DPBS gewaschen und im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### 8.2.3. Molekularbiologische Methoden

#### 8.2.3.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte durch Zugabe des Lyse-Reagenzes TRIsure™ auf die Zellen, nachdem diese zuvor kurz mit DPBS gewaschen worden waren. Im Falle der Untersuchung der Proben von Tag 0 des Assays wurde die Zellsuspension nach dem Ausplattieren der Zellen zentrifugiert und das Zellpellet nach Aspirieren des Überstandes mit dem Lyse-Reagenz resuspendiert. Erfolgte hingegen die Isolierung der RNA aus den auf der 384-Well-Platte kultivierten Zellen nachfolgender Tage des Assays, so wurden 25 µL Lyse-Reagenz pro Well verwendet und für eine ausreichend große Zellmasse das Zellysate von mindestens 32 Wells gleicher Kultivierungsbedingung vereint und jeweils in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 200 µL Chloroform je verwendetem mL Lyse-Reagenz hinzugegeben, 3 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (4 °C, 15 min, 12.000 g). Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem zuvor die obere wässrige Phase, die sich nach dem Zentrifugieren ausgebildet hatte, vorsichtig in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt worden war. Die wässrige Phase wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 500 µL kaltem Isopropanol pro zu Beginn eingesetztem mL Lyse-Reagenz versetzt. Nach zehninütiger Inkubation wurde anschließend erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 12.000 g). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das erhaltene Pellet mit 1 mL 70%igem Ethanol pro anfangs eingesetztem mL Lyse-Reagenz gewaschen. Danach wurde erneut zentrifugiert (4 °C, 5 min, 8.000 g) und der Überstand vorsichtig entfernt. Das Pellet wurde bei offenem Deckel des Reaktionsgefäßes in einem Heizblock getrocknet (60 °C, 5 min) und anschließend in 20 µL nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Nach erneuter Inkubation in dem Heizblock bei diesmalig geschlossenem Deckel (60 °C, 3 min), konnte der RNA-Gehalt mittels NanoDrop™ ermittelt werden und/oder die isolierte RNA bei -80 °C weggefroren werden.

#### 8.2.3.2. cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese wurden 100 ng der zuvor isolierten RNA mit dem Reagenz qScript™ cDNA SuperMix im Verhältnis 1:5 versetzt und gemäß den Anweisungen des Herstellers mit dem Thermocycler amplifiziert. Anschließend wurde der ssDNA-Gehalt mit Hilfe des NanoDrops™ bestimmt und/oder die DNA bei -20 °C weggefroren.



### 8.2.3.3. RT-qPCR

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde mit Hilfe des LightCyclers® 480 in einem 384-Well-Format durchgeführt. Dabei wurden pro Well 300 nM Oligo-Mix mit dem Takyon™ SYBR Master Mix vorgelegt und anschließend je 100 ng *template* DNA hinzupipettiert. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten bei einem jeweiligen Volumenansatz von 10 µL. Das anschließende PCR-Programm wurde gemäß der Herstellerangabe des Assay-Kits durchlaufen, wobei lediglich die *annealing* Temperatur entsprechend der jeweils benutzen Primer angepasst wurde. Die Primer wurden dabei im Vorfeld mit Hilfe des Programms PrimerBLAST designt.

### 8.2.3.4. Durchflusszytometrie

Zellen, die auf die Kardiomyozytenmarker wie beispielsweise  $\alpha$ MHC untersucht werden sollten und dem Tag 11 des Kardiogenese-Assays entstammten, wurden zunächst fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Im Zuge dessen wurde das Medium aspiriert und die Zellen für den kurzen Moment der Fluoreszenzaufnahme auf DPBS gelagert ohne fixiert zu werden. Anschließend wurde die Pufferlösung aspiriert und die Zellen mit Trypsin-EDTA inkubiert (37 °C, 30 bis 60 min). Die Reaktion wurde danach mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Um für die spätere durchflusszytometrische Messung ausreichend Zellen zur Verfügung zu haben, wurden hierbei Zellen von 16 bis 48 Wells gleicher Kultivierungsbedingung vereint. Zellen, die hingegen auf den Pluripotenzmarker *Oct4* untersucht werden sollten, wurden aus der jeweiligen Passage bzw. an Tag 0 des Assays gewonnen, wobei die Zellsuspension direkt verwendet werden konnte. In beiden Fällen wurden die Zellen anschließend zentrifugiert (25 °C, 5 min, 8000 rpm) und nach Abnahme des Überstandes mit 4%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde erneut zentrifugiert (25 °C, 5 min, 8000 rpm) und der Überstand anschließend abgenommen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Primärantikörper verdünnt in serumhaltiger Saponin-Lösung (0,25 % Saponin, 2 % FBS) inkubiert (RT, 60 min, dunkel). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und der Sekundärantikörper verdünnt in serumhaltiger Saponin-Lösung hinzugegeben. Dabei wurde wieder für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend zentrifugiert. Für die Messung am Durchflusszytometer wurde das Zellpellet dann in 500 µL serumhaltiger Saponin-Lösung resuspendiert und durch ein Zellsieb in ein Röhrchen überführt. Wahlweise wurden die Zellen anschließend noch DAPI-gefärbt.

## 8.2.4. Biochemische Methoden

### 8.2.4.1. Zellyse

Vergleichbar der Methode der Durchflusszytometrie wurden die Zellen auch in diesem Fall am elften Tag des Kardiogenese-Assays zunächst fluoreszenzmikroskopisch vermessen. Nachdem die Zellen mit DPBS gewaschen worden waren, wurde hierbei die Kultivierungsplatte auf Eis gestellt und der kalte Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben. Nach einer mehrminütigen Inkubationszeit wurden die lysierten Zellen schließlich in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt, wobei jeweils das Zellysate von 32 bis 48 Wells derselben Kultivierungsbedingung vereint wurde und diese anschließend bei -80 °C eingefroren wurden.

### 8.2.4.2. Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt der lysierten Zellen wurde mit Hilfe der BCA-Methode unter Verwendung des Assay-Kits des Herstellers Thermo Scientific bestimmt. Die Proben wurden dabei gemäß dem Protokoll des Herstellers aufbereitet, wobei das Volumen des Probenansatzes bestehend aus Kit-Reagenz A und B sowie der Proteinprobe 250 µL betrug. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 60 °C auf dem Heizblock wurden sowohl die Referenz- als auch die Probenansätze zunächst auf RT abgekühlt, bevor sie mittels NanoDrop™ vermessen wurden. Hierbei wurde im ersten Schritt zunächst eine Kalibriergerade über einen Konzentrationsbereich von acht Konzentrationen mit Hilfe der Referenzen angefertigt, bevor anschließend die Proben vermessen wurden.

### 8.2.4.3. Gießen von SDS-Gelen

Sofern in einigen Fällen die SDS-Gele nicht kommerziell erworben wurden, wurden für die SDS-PAGE die Gele selbst angefertigt. Dabei wurde zunächst die Gelgieß-Apparatur vorschriftsmäßig zusammengesetzt und das Trenngel zwischen die Glasplatten bis zu 80 % der Höhe gegossen. Anschließend wurde mit Isopropanol bis zu der Gesamthöhe aufgefüllt und dem Gel Zeit zum Aushärten gegeben. Nachdem der Isopropanol restlos abgegossen war, wurde schließlich das Sammelgel bis zum oberen Rand der Glasplatten hinzugegossen und der jeweilige Kamm luftblasenfrei eingesetzt und gewartet bis das Gel polymerisiert war.

### 8.2.4.4. SDS-PAGE

Um einheitliche Proteinmengen auf das Gel aufzutragen, wurden die Probelösungen nach Bestimmung ihres Proteingehaltes zunächst mit dem Lyse-Puffer individuell verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:5 mit dem SDS-Ladepuffer versetzt.

Nachdem die Proben im Heizblock für 5 min bei 95 °C erhitzt worden waren, wurden diese noch kurz zentrifugiert (25 °C, 1 min, 8000 rpm), bevor sie schließlich auf das Gel aufgetragen wurden. Zudem wurde in ein bis zwei Taschen des jeweiligen Gels der Standard-Marker aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophorese-Apparatur vorschriftsgemäß zusammengesetzt und die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 100 V gestartet. Die Lauffront erreichte nach 60 bis 70 min die Unterseite des Gels, woraufhin die Elektrophorese beendet wurde.

#### 8.2.4.5. Western Blot

Auf die Gelelektrophorese folgte das Übertragen der im Gel gewanderten Proteine auf eine PVDF-Membran, der Western Blot. Dieser wurde im Tank-Blot-System durchgeführt. Dazu wurden zunächst pro gelaufenem Gel zwei Blotting-Filterpapiere sowie zwei Schwämme in eiskalten Transferpuffer eingelegt sowie die PVDF-Membran in Form (8,5 x 6 cm) geschnitten und anschließend in Methanol aktiviert. Das Gel wurde vorsichtig der Elektrophorese-Apparatur entnommen und der Blot-Ansatz anschließend in der schwarz-weißen Klemmapparatur beginnend auf der schwarzen Unterseite wie folgt luftblasenfrei zusammengebaut: Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm. Das Tank-Blot-System wurde daraufhin vorschriftsgemäß zusammengesetzt, wobei der Kammer sowohl ein Kühlakku als auch ein Magnetrührstäbchen beigefügt wurde. Auf einer Magnet-Rührplatte wurde anschließend unter Rühren bei konstant 100 V für 60 min geblottet. Nachdem der Blot beendet war, wurde die Membran aus der Klemmapparatur mit einer Pinzette entnommen und in eine schwarze Inkubationskammer mit Odyssey<sup>®</sup> Blocking Buffer gelegt. In der Folge wurde die Membran für 1 h unter Schütteln bei 4 °C inkubiert. Der Puffer wurde abgenommen und die Membran über Nacht unter Schütteln mit dem Primärantikörper inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung abgenommen und die Membran dreimal 10 min mit TBST-Puffer gewaschen (RT, Schütteln). Anschließend folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (RT, 2 h, Schütteln). Nachdem im Anschluss die Membran erneut dreimal für 10 min unter Schütteln mit TBST-Puffer gewaschen worden war, wurde die Membran schließlich mit Hilfe des Gerätes Odyssey<sup>®</sup> CLx Imaging System fotodokumentiert.

### 8.2.5. Zellviabilitätsbestimmungen

#### 8.2.5.1. CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Assay

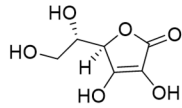
Der Assay zur Bestimmung der Zellviabilität wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurde zunächst das CellTiter-Glo<sup>®</sup>-Reagenz bestehend aus Puffer und Substrat entsprechend dem Protokoll hergestellt. Nachdem zuvor das Medium aspiriert worden war, wurde das Reagenz auf die Zellen gegeben (10 µL/Well) und die Zellsuspension anschließend mittels Mehrkanalpipette und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren unter kreisenden Bewegungen auf eine weiße *half-well*

Assayplatte überführt. Die abschließende Lumineszenz-Messung erfolgte nach 10-minütiger Inkubation am Tecan-Mikroplattenreader.

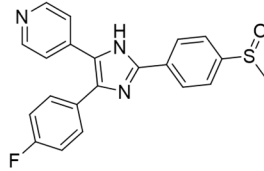
#### 8.2.5.2. WST-1-Assay

Bei der Zellviabilitätsbestimmung mit Hilfe des WST-1-Assays wurde das Reagenz den Zellen und dem Medium direkt zugegeben ohne nachfolgenden Transfer auf eine andere Assayplatte. Dabei wurde zunächst das Reagenz gemäß dem Protokoll des Herstellers durch Rekonstituieren des Substrates in Puffer hergestellt und anschließend auf das Kultivierungsmedium mit den Zellen gegeben (25 µL/Well). Es folgte eine drei- bis vierstündige Inkubation im Inkubator. Nachdem die Platte zuvor kurz geschüttelt worden war, wurde die Absorption bei 420-480 nm mit dem Tecan-Mikroplattenreader gemessen.

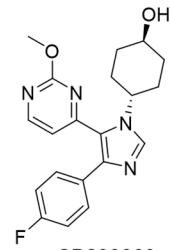
## 9. Strukturformelverzeichnis



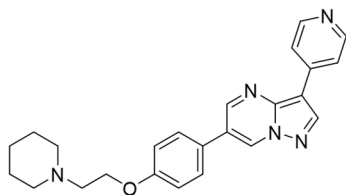
Ascorbinsäure  
(1)



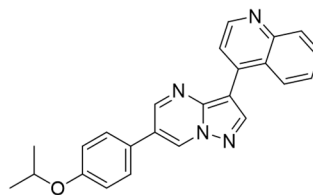
SB203580  
(2)



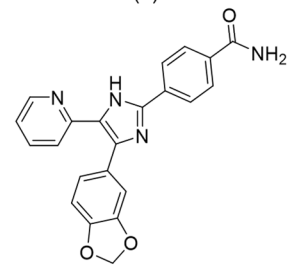
SB239063  
(3)



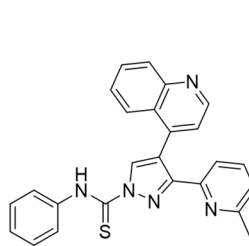
Dorsomorphin (DM)  
(4)



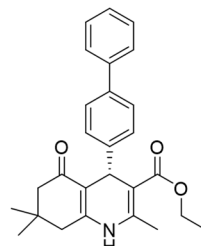
Dorsomorphin Homolog-1 (DMH-1)  
(5)



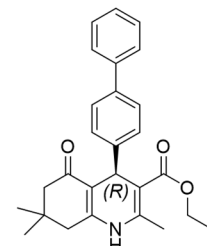
SB431542  
(6)



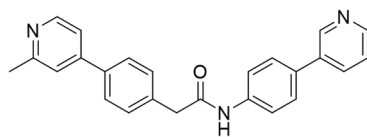
A-83-01  
(7)



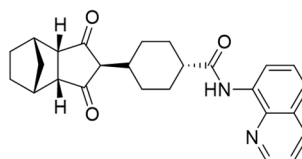
(-)-ITD-1  
(8)



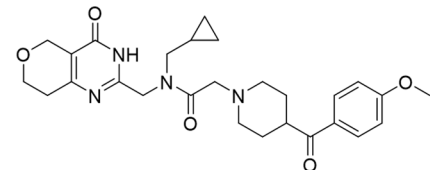
(+)-ITD-1  
(9)



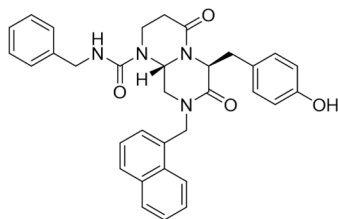
Wnt-C59  
(10)



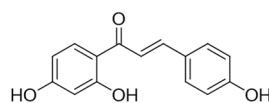
DS-I-6  
(11)



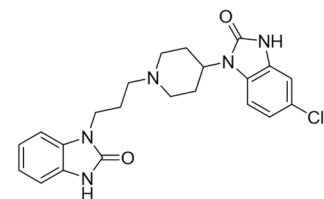
NVP-TNKS656  
(12)



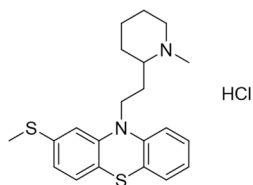
ICG-001  
(13)



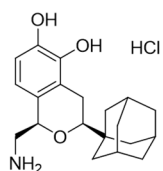
Isoliquiritigenin  
(14)



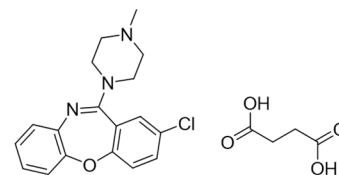
Domperidon  
(15)



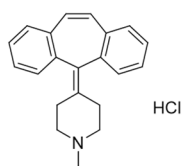
Thioridazin  
(16)



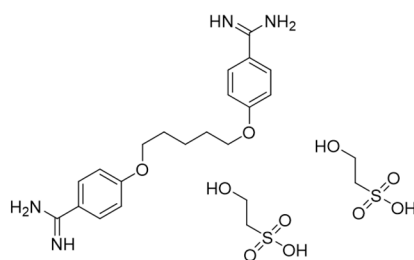
A-77636  
(17)



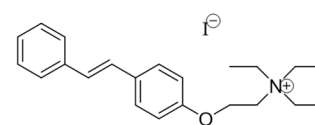
Loxapin  
(18)



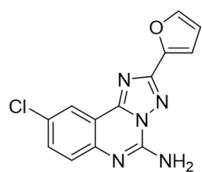
Cyproheptadin  
(19)



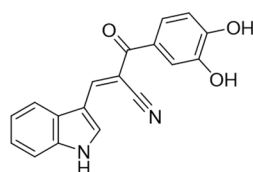
Pentamidin  
(20)



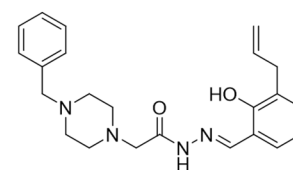
MG 624  
(21)



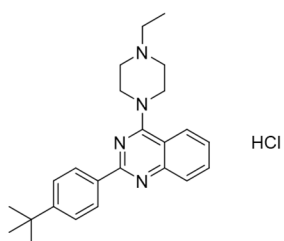
CGS-15943  
(22)



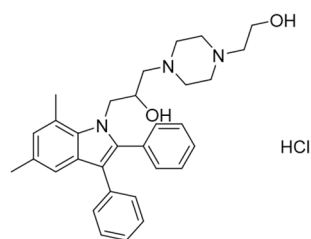
Tyrphostin AG 808  
(23)



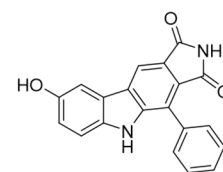
PAC-1  
(24)



ID 108137  
(25)



ID 108148  
(26)



PD407824  
(27)

## 10. Literaturverzeichnis

- [1] Benjamin, E. J.; Blaha, M. J.; Chiuve, S. E.; Cushman, M.; Das, S. R.; Deo, R.; Ferranti, S. D. de; Floyd, J.; Fornage, M.; Gillespie, C.; Isasi, C. R.; Jiménez, M. C.; Jordan, L. C.; Judd, S. E.; Lackland, D.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L.; Liu, S.; Longenecker, C. T.; Mackey, R. H.; Matsushita, K.; Mozaffarian, D.; Mussolino, M. E.; Nasir, K.; Neumar, R. W.; Palaniappan, L.; Pandey, D. K.; Thiagarajan, R. R.; Reeves, M. J.; Ritchey, M.; Rodriguez, C. J.; Roth, G. A.; Rosamond, W. D.; Sasson, C.; Towfighi, A.; Tsao, C. W.; Turner, M. B.; Virani, S. S.; Voeks, J. H.; Willey, J. Z.; Wilkins, J. T.; Wu, J. H.; Alger, H. M.; Wong, S. S.; Muntner, P. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update. *Circulation* **2017**, *135*, e146-e603.
- [2] Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. **2017**, *Fachserie 12 Reihe 4*, 1-44.
- [3] Wang, Y.-S.; Li, S.-H.; Guo, J.; Mihic, A.; Wu, J.; Sun, L.; Davis, K.; Weisel, R. D.; Li, R.-K. Role of miR-145 in cardiac myofibroblast differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *66*, 94–105.
- [4] Ertl, G. and Angermann, C. E. Therapie der chronischen Herzinsuffizienz: aktuelle Leitlinien und ihre Grenzen. *Pharmakon* **2017**, *5*, 194–200.
- [5] Lothar, A. and Hein, L. Pathophysiologie der chronischen Herzinsuffizienz. *Pharmakon* **2017**, *5*, 182–187.
- [6] Meibom, D.; Albrecht-Küpper, B.; Diedrichs, N.; Hübsch, W.; Kast, R.; Krämer, T.; Krenz, U.; Lerchen, H.-G.; Mittendorf, J.; Nell, P. G.; Süßmeier, F.; Vakalopoulos, A.; Zimmermann, K. Neladenoson Bialanate Hydrochloride: a Prodrug of a Partial Adenosine A1 Receptor Agonist for the Chronic Treatment of Heart Diseases. *ChemMedChem* **2017**, *12*, 728–737.
- [7] Dinh, W.; Albrecht-Küpper, B.; Gheorghide, M.; Voors, A. A.; van der Laan, M.; Sabbah, H. N. Partial Adenosine A1 Agonist in Heart Failure. *Handb Exp Pharmacol* **2017**, 177–203.
- [8] Follmann, M.; Ackerstaff, J.; Redlich, G.; Wunder, F.; Lang, D.; Kern, A.; Fey, P.; Griebenow, N.; Kroh, W.; Becker-Pelster, E.-M.; Kretschmer, A.; Geiss, V.; Li, V.; Straub, A.; Mittendorf, J.; Jautelat, R.; Schirok, H.; Schlemmer, K.-H.; Lustig, K.; Gerisch, M.; Knorr, A.; Tinel, H.; Mondritzki, T.; Trübel, H.; Sandner, P.; Stasch, J.-P. Discovery of the Soluble Guanylate Cyclase Stimulator Vericiguat (BAY 1021189) for the Treatment of Chronic Heart Failure. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 5146–5161.
- [9] Morgan, B. P.; Muci, A.; Lu, P.-P.; Qian, X.; Tochimoto, T.; Smith, W. W.; Garard, M.; Kraynack, E.; Collibee, S.; Suehiro, I.; Tomasi, A.; Valdez, S. C.; Wang, W.; Jiang, H.; Hartman, J.; Rodriguez, H. M.; Kawas, R.; Sylvester, S.; Elias, K. A.; Godinez, G.; Lee, K.; Anderson, R.; Sueoka, S.; Xu, D.; Wang, Z.; Djordjevic, N.; Malik, F. I.; Morgans, D. J. Discovery of omecamtiv mecarbil the first, selective, small molecule activator of cardiac Myosin. *ACS Med Chem Lett* **2010**, *1*, 472–477.

- [10] Cleland, J. G. F.; Teerlink, J. R.; Senior, R.; Nifontov, E. M.; Mc Murray, J. J. V.; Lang, C. C.; Tsyrlin, V. A.; Greenberg, B. H.; Mayet, J.; Francis, D. P.; Shaburishvili, T.; Monaghan, M.; Saltzberg, M.; Neyses, L.; Wasserman, S. M.; Lee, J. H.; Saikali, K. G.; Clarke, C. P.; Goldman, J. H.; Wolff, A. A.; Malik, F. I. The effects of the cardiac myosin activator, omecamtiv mecarbil, on cardiac function in systolic heart failure: a double-blind, placebo-controlled, crossover, dose-ranging phase 2 trial. *Lancet* **2011**, *378*, 676–683.
- [11] Bakkehaug, J. P.; Kildal, A. B.; Engstad, E. T.; Boardman, N.; Næsheim, T.; Rønning, L.; Aasum, E.; Larsen, T. S.; Myrmed, T.; How, O.-J. Myosin Activator Omecamtiv Mecarbil Increases Myocardial Oxygen Consumption and Impairs Cardiac Efficiency Mediated by Resting Myosin ATPase Activity. *Circ Heart Fail* **2015**, *8*, 766–775.
- [12] Utter, M. S.; Ryba, D. M.; Li, B. H.; Wolska, B. M.; Solaro, R. J. Omecamtiv Mecarbil, a Cardiac Myosin Activator, Increases Ca<sup>2+</sup> Sensitivity in Myofilaments With a Dilated Cardiomyopathy Mutant Tropomyosin E54K. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2015**, *66*, 347–353.
- [13] del Monte, F.; Williams, E.; Lebeche, D.; Schmidt, U.; Rosenzweig, A.; Gwathmey, J. K.; Lewandowski, E. D.; Hajjar, R. J. Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* **2001**, *104*, 1424–1429.
- [14] Miyamoto, M. I.; del Monte, F.; Schmidt, U.; DiSalvo, T. S.; Kang, Z. B.; Matsui, T.; Guerrero, J. L.; Gwathmey, J. K.; Rosenzweig, A.; Hajjar, R. J. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 793–798.
- [15] Kawase, Y.; Ly, H. Q.; Prunier, F.; Lebeche, D.; Shi, Y.; Jin, H.; Hadri, L.; Yoneyama, R.; Hoshino, K.; Takewa, Y.; Sakata, S.; Peluso, R.; Zsebo, K.; Gwathmey, J. K.; Tardif, J.-C.; Tanguay, J.-F.; Hajjar, R. J. Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *51*, 1112–1119.
- [16] Zsebo, K.; Yaroshinsky, A.; Rudy, J. J.; Wagner, K.; Greenberg, B.; Jessup, M.; Hajjar, R. J. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 101–108.
- [17] Schade, D. and Plowright, A. T. Medicinal Chemistry Approaches to Heart Regeneration. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 9451–9479.
- [18] Bergmann, O.; Bhardwaj, R. D.; Bernard, S.; Zdunek, S.; Barnabé-Heider, F.; Walsh, S.; Zupicich, J.; Alkass, K.; Buchholz, B. A.; Druid, H.; Jovinge, S.; Frisén, J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **2009**, *324*, 98–102.
- [19] Mollova, M.; Bersell, K.; Walsh, S.; Savla, J.; Das, L. T.; Park, S.-Y.; Silberstein, L. E.; Dos Remedios, C. G.; Graham, D.; Colan, S.; Kühn, B. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2013**, *110*, 1446–1451.



- [20] Chong, J. J. H. and Murry, C. E. Cardiac regeneration using pluripotent stem cells - progression to large animal models. *Stem Cell Res* **2014**, *13*, 654–665.
- [21] Szibor, M.; Pöling, J.; Warnecke, H.; Kubin, T.; Braun, T. Remodeling and dedifferentiation of adult cardiomyocytes during disease and regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 1907–1916.
- [22] Shinde, A. V. and Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2014**, *70*, 74–82.
- [23] Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* **1990**, *81*, 1161–1172.
- [24] Michelis, K. C.; Boehm, M.; Kovacic, J. C. New vessel formation in the context of cardiomyocyte regeneration - the role and importance of an adequate perfusing vasculature. *Stem Cell Res* **2014**, *13*, 666–682.
- [25] Takahashi, K. and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
- [26] Plowright, A. T.; Engkvist, O.; Gill, A.; Knerr, L.; Wang, Q.-D. Heart regeneration: Opportunities and challenges for drug discovery with novel chemical and therapeutic methods or agents. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 4056–4075.
- [27] Lui, K. O.; Zangi, L.; Chien, K. R. Cardiovascular regenerative therapeutics via synthetic paracrine factor modified mRNA. *Stem Cell Res* **2014**, *13*, 693–704.
- [28] Lyssiotis, C. A.; Lairson, L. L.; Boitano, A. E.; Wurdak, H.; Zhu, S.; Schultz, P. G. Chemical control of stem cell fate and developmental potential. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 200–242.
- [29] Li, W.; Jiang, K.; Wei, W.; Shi, Y.; Ding, S. Chemical approaches to studying stem cell biology. *Cell Res.* **2013**, *23*, 81–91.
- [30] Längle, D.; Halver, J.; Rathmer, B.; Willems, E.; Schade, D. Small molecules targeting in vivo tissue regeneration. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 57–71.
- [31] Russell, A. J. Regenerative medicinal chemistry: The in situ control of stem cells. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4*, 365–368.
- [32] Takahashi, T.; Lord, B.; Schulze, P. C.; Fryer, R. M.; Sarang, S. S.; Gullans, S. R.; Lee, R. T. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* **2003**, *107*, 1912–1916.
- [33] Yu, P. B.; Hong, C. C.; Sachidanandan, C.; Babbitt, J. L.; Deng, D. Y.; Hoyng, S. A.; Lin, H. Y.; Bloch, K. D.; Peterson, R. T. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 33–41.

- [34] Hao, J.; Daleo, M. A.; Murphy, C. K.; Yu, P. B.; Ho, J. N.; Hu, J.; Peterson, R. T.; Hatzopoulos, A. K.; Hong, C. C. Dorsomorphin, a selective small molecule inhibitor of BMP signaling, promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2904.
- [35] Cuny, G. D.; Yu, P. B.; Laha, J. K.; Xing, X.; Liu, J.-F.; Lai, C. S.; Deng, D. Y.; Sachidanandan, C.; Bloch, K. D.; Peterson, R. T. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4388–4392.
- [36] Ao, A.; Hao, J.; Hopkins, C. R.; Hong, C. C. DMH1, a novel BMP small molecule inhibitor, increases cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac differentiation in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e41627.
- [37] Engers, D. W.; Frist, A. Y.; Lindsley, C. W.; Hong, C. C.; Hopkins, C. R. Synthesis and structure-activity relationships of a novel and selective bone morphogenetic protein receptor (BMP) inhibitor derived from the pyrazolo1.5-apyrimidine scaffold of dorsomorphin: the discovery of ML347 as an ALK2 versus ALK3 selective MLPCN probe. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3248–3252.
- [38] Ueno, S.; Weidinger, G.; Osugi, T.; Kohn, A. D.; Golob, J. L.; Pabon, L.; Reinecke, H.; Moon, R. T.; Murry, C. E. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 9685–9690.
- [39] Lian, X.; Hsiao, C.; Wilson, G.; Zhu, K.; Hazeltine, L. B.; Azarin, S. M.; Raval, K. K.; Zhang, J.; Kamp, T. J.; Palecek, S. P. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, E1848-57.
- [40] Willems, E.; Spiering, S.; Davidovics, H.; Lanier, M.; Xia, Z.; Dawson, M.; Cashman, J.; Mercola, M. Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circ. Res.* **2011**, *109*, 360–364.
- [41] Ren, Y.; Lee, M. Y.; Schliffke, S.; Paavola, J.; Amos, P. J.; Ge, X.; Ye, M.; Zhu, S.; Senyei, G.; Lum, L.; Ehrlich, B. E.; Qyang, Y. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2011**, *51*, 280–287.
- [42] Gonzalez, R.; Lee, J. W.; Schultz, P. G. Stepwise Chemically Induced Cardiomyocyte Specification of Human Embryonic Stem Cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 11181–11185.
- [43] Burridge, P. W.; Matsa, E.; Shukla, P.; Lin, Z. C.; Churko, J. M.; Ebert, A. D.; Lan, F.; Diecke, S.; Huber, B.; Mordwinkin, N. M.; Plews, J. R.; Abilez, O. J.; Cui, B.; Gold, J. D.; Wu, J. C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods* **2014**, *11*, 855–860.
- [44] Dravid, G.; Ye, Z.; Hammond, H.; Chen, G.; Pyle, A.; Donovan, P.; Yu, X.; Cheng, L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **2005**, *23*, 1489–1501.

- [45] Qyang, Y.; Martin-Puig, S.; Chiravuri, M.; Chen, S.; Xu, H.; Bu, L.; Jiang, X.; Lin, L.; Granger, A.; Moretti, A.; Caron, L.; Wu, X.; Clarke, J.; Taketo, M. M.; Laugwitz, K.-L.; Moon, R. T.; Gruber, P.; Evans, S. M.; Ding, S.; Chien, K. R. The renewal and differentiation of Isl1+ cardiovascular progenitors are controlled by a Wnt/beta-catenin pathway. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 165–179.
- [46] Basu, S.; Ellinger, B.; Rizzo, S.; Deraeve, C.; Schürmann, M.; Preut, H.; Arndt, H.-D.; Waldmann, H. Biology-oriented synthesis of a natural-product inspired oxepane collection yields a small-molecule activator of the Wnt-pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 6805–6810.
- [47] Zhang, Q.; Major, M. B.; Takanashi, S.; Camp, N. D.; Nishiya, N.; Peters, E. C.; Ginsberg, M. H.; Jian, X.; Randazzo, P. A.; Schultz, P. G.; Moon, R. T.; Ding, S. Small-molecule synergist of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 7444–7448.
- [48] Singh, A. M.; Li, F.-Q.; Hamazaki, T.; Kasahara, H.; Takemaru, K.-i.; Terada, N. Chibby, an antagonist of the Wnt/beta-catenin pathway, facilitates cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells. *Circulation* **2007**, *115*, 617–626.
- [49] Singh, A. M. and Terada, N. Bypassing heterogeneity: The road to embryonic stem cell-derived cardiomyocyte specification. *Trends Cardiovasc. Med.* **2007**, *17*, 96–101.
- [50] Mirotsov, M.; Zhang, Z.; Deb, A.; Zhang, L.; Gneccchi, M.; Noiseux, N.; Mu, H.; Pachori, A.; Dzau, V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 1643–1648.
- [51] Bergmann, M. W. WNT signaling in adult cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ. Res.* **2010**, *107*, 1198–1208.
- [52] Laeremans, H.; Hackeng, T. M.; van Zandvoort, M. A. M. J.; Thijssen, V. L. J. L.; Janssen, B. J. A.; Ottenheijm, H. C. J.; Smits, J. F. M.; Blankesteyn, W. M. Blocking of frizzled signaling with a homologous peptide fragment of wnt3a/wnt5a reduces infarct expansion and prevents the development of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* **2011**, *124*, 1626–1635.
- [53] Chen, B.; Dodge, M. E.; Tang, W.; Lu, J.; Ma, Z.; Fan, C.-W.; Wei, S.; Hao, W.; Kilgore, J.; Williams, N. S.; Roth, M. G.; Amatruda, J. F.; Chen, C.; Lum, L. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 100–107.
- [54] Dodge, M. E.; Moon, J.; Tuladhar, R.; Lu, J.; Jacob, L. S.; Zhang, L.-s.; Shi, H.; Wang, X.; Moro, E.; Mongera, A.; Argenton, F.; Karner, C. M.; Carroll, T. J.; Chen, C.; Amatruda, J. F.; Lum, L. Diverse chemical scaffolds support direct inhibition of the membrane-bound O-acyltransferase porcupine. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 23246–23254.

- [55] Hahne, G. and Grossmann, T. N. Direct targeting of  $\beta$ -catenin: Inhibition of protein-protein interactions for the inactivation of Wnt signaling. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4020–4026.
- [56] Sasaki, T.; Hwang, H.; Nguyen, C.; Klöner, R. A.; Kahn, M. The small molecule Wnt signaling modulator ICG-001 improves contractile function in chronically infarcted rat myocardium. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e75010.
- [57] Colston, J. T.; La Rosa, S. D. de; Koehler, M.; Gonzales, K.; Mestril, R.; Freeman, G. L.; Bailey, S. R.; Chandrasekar, B. Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2007**, *293*, H1839-46.
- [58] Henderson, W. R.; Chi, E. Y.; Ye, X.; Nguyen, C.; Tien, Y.-t.; Zhou, B.; Borok, Z.; Knight, D. A.; Kahn, M. Inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 14309–14314.
- [59] Hao, S.; He, W.; Li, Y.; Ding, H.; Hou, Y.; Nie, J.; Hou, F. F.; Kahn, M.; Liu, Y. Targeted inhibition of  $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2011**, *22*, 1642–1653.
- [60] Daskalopoulos, E. P.; Hermans, K. C. M.; Janssen, B. J. A.; Matthijs Blankesteyn, W. Targeting the Wnt/frizzled signaling pathway after myocardial infarction: a new tool in the therapeutic toolbox? *Trends Cardiovasc. Med.* **2013**, *23*, 121–127.
- [61] Minami, I.; Yamada, K.; Otsuji, T. G.; Yamamoto, T.; Shen, Y.; Otsuka, S.; Kadota, S.; Morone, N.; Barve, M.; Asai, Y.; Tenkova-Heuser, T.; Heuser, J. E.; Uesugi, M.; Aiba, K.; Nakatsuji, N. A small molecule that promotes cardiac differentiation of human pluripotent stem cells under defined, cytokine- and xeno-free conditions. *Cell Rep* **2012**, *2*, 1448–1460.
- [62] Lanier, M.; Schade, D.; Willems, E.; Tsuda, M.; Spiering, S.; Kalisiak, J.; Mercola, M.; Cashman, J. R. Wnt inhibition correlates with human embryonic stem cell cardiomyogenesis: a structure-activity relationship study based on inhibitors for the Wnt response. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 697–708.
- [63] Schultheiss, T. M.; Burch, J. B.E.; Lassar, A. B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 451–462.
- [64] Vrijens, K.; Lin, W.; Cui, J.; Farmer, D.; Low, J.; Pronier, E.; Zeng, F.-Y.; Shelat, A. A.; Guy, K.; Taylor, M. R.; Chen, T.; Roussel, M. F. Identification of Small Molecule Activators of BMP Signaling. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e59045.
- [65] Yuasa, S.; Itabashi, Y.; Koshimizu, U.; Tanaka, T.; Sugimura, K.; Kinoshita, M.; Hattori, F.; Fukami, S.-i.; Shimazaki, T.; Ogawa, S.; Okano, H.; Fukuda, K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 607–611.
- [66] Boergermann, J. H.; Kopf, J.; Yu, P. B.; Knaus, P. Dorsomorphin and LDN-193189 inhibit BMP-mediated Smad, p38 and Akt signalling in C2C12 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 1802–1807.

- [67] Hao, J.; Ho, J. N.; Lewis, J. A.; Karim, K. A.; Daniels, R. N.; Gentry, P. R.; Hopkins, C. R.; Lindsley, C. W.; Hong, C. C. In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 245–253.
- [68] Burridge, P. W.; Thompson, S.; Millrod, M. A.; Weinberg, S.; Yuan, X.; Peters, A.; Mahairaki, V.; Koliatsos, V. E.; Tung, L.; Zambidis, E. T. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e18293.
- [69] Zhang, J.; Klos, M.; Wilson, G. F.; Herman, A. M.; Lian, X.; Raval, K. K.; Barron, M. R.; Hou, L.; Soerens, A. G.; Yu, J.; Palecek, S. P.; Lyons, G. E.; Thomson, J. A.; Herron, T. J.; Jalife, J.; Kamp, T. J. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: The matrix sandwich method. *Circ. Res.* **2012**, *111*, 1125–1136.
- [70] Kattman, S. J.; Witty, A. D.; Gagliardi, M.; Dubois, N. C.; Niapour, M.; Hotta, A.; Ellis, J.; Keller, G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 228–240.
- [71] Tojo, M.; Hamashima, Y.; Hanyu, A.; Kajimoto, T.; Saitoh, M.; Miyazono, K.; Node, M.; Imamura, T. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 791–800.
- [72] Willems, E.; Cabral-Teixeira, J.; Schade, D.; Cai, W.; Reeves, P.; Bushway, P. J.; Lanier, M.; Walsh, C.; Kirchhausen, T.; Izpisua Belmonte, J. C.; Cashman, J.; Mercola, M. Small molecule-mediated TGF- $\beta$  type II receptor degradation promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 242–252.
- [73] Bajorath, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 882–894.
- [74] MacRae, C. A. and Peterson, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 721–731.
- [75] Clader, J. W. The discovery of ezetimibe: a view from outside the receptor. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1–9.

- [76] Stitzel, N. O.; Won, H.-H.; Morrison, A. C.; Peloso, G. M.; Do, R.; Lange, L. A.; Fontanillas, P.; Gupta, N.; Duga, S.; Goel, A.; Farrall, M.; Saleheen, D.; Ferrario, P.; König, I.; Asselta, R.; Merlini, P. A.; Marziliano, N.; Notarangelo, M. F.; Schick, U.; Auer, P.; Assimes, T. L.; Reilly, M.; Wilensky, R.; Rader, D. J.; Hovingh, G. K.; Meitinger, T.; Kessler, T.; Kastrati, A.; Laugwitz, K.-L.; Siscovick, D.; Rotter, J. I.; Hazen, S. L.; Tracy, R.; Cresci, S.; Spertus, J.; Jackson, R.; Schwartz, S. M.; Natarajan, P.; Crosby, J.; Muzny, D.; Ballantyne, C.; Rich, S. S.; O'Donnell, C. J.; Abecasis, G.; Sunaev, S.; Nickerson, D. A.; Buring, J. E.; Ridker, P. M.; Chasman, D. I.; Austin, E.; Kullo, I. J.; Weeke, P. E.; Shaffer, C. M.; Bastarache, L. A.; Denny, J. C.; Roden, D. M.; Palmer, C.; Deloukas, P.; Lin, D.-Y.; Tang, Z.-z.; Erdmann, J.; Schunkert, H.; Danesh, J.; Marrugat, J.; Elosua, R.; Ardissino, D.; McPherson, R.; Watkins, H.; Reiner, A. P.; Wilson, J. G.; Altshuler, D.; Gibbs, R. A.; Lander, E. S.; Boerwinkle, E.; Gabriel, S.; Kathiresan, S. Inactivating mutations in NPC1L1 and protection from coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2072–2082.
- [77] Swinney, D. C. and Anthony, J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 507–519.
- [78] Mercola, M.; Colas, A.; Willems, E. Induced pluripotent stem cells in cardiovascular drug discovery. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 534–548.
- [79] Asimaki, A.; Kapoor, S.; Plovie, E.; Arndt, A. K.; Adams, E.; Liu, Z.; James, C. A.; Judge, D. P.; Calkins, H.; Churko, J.; Wu, J. C.; MacRae, C. A.; Kléber, A. G.; Saffitz, J. E. Identification of a New Modulator of the Intercalated Disc in a Zebrafish Model of Arrhythmogenic Cardiomyopathy. *Sci Transl Med* **2014**, *6*, 240ra74.
- [80] Bleicher, K. H.; Böhm, H.-J.; Müller, K.; Alanine, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 369–378.
- [81] Dahlin, J. L. and Walters, M. A. The essential roles of chemistry in high-throughput screening triage. *Future Med Chem* **2014**, *6*, 1265–1290.
- [82] Hughes, J. P.; Rees, S.; Kalindjian, S. B.; Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *162*, 1239–1249.
- [83] Leeson, P. D. and Springthorpe, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 881–890.
- [84] Peters, J.-U.; Schnider, P.; Mattei, P.; Kansy, M. Pharmacological promiscuity: Dependence on compound properties and target specificity in a set of recent Roche compounds. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 680–686.
- [85] Hughes, J. D.; Blagg, J.; Price, D. A.; Bailey, S.; Decrescenzo, G. A.; Devraj, R. V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y. M.; Gibbs, M. E.; Gilles, R. W.; Greene, N.; Huang, E.; Krieger-Burke, T.; Loesel, J.; Wager, T.; Whiteley, L.; Zhang, Y. Physicochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 4872–4875.

- [86] Luker, T.; Alcaraz, L.; Chohan, K. K.; Blomberg, N.; Brown, D. S.; Butlin, R. J.; Elebring, T.; Griffin, A. M.; Guile, S.; St-Gallay, S.; Swahn, B.-M.; Swallow, S.; Waring, M. J.; Wenlock, M. C.; Leeson, P. D. Strategies to improve in vivo toxicology outcomes for basic candidate drug molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 5673–5679.
- [87] Waring, M. J.; Arrowsmith, J.; Leach, A. R.; Leeson, P. D.; Mandrell, S.; Owen, R. M.; Pairedeau, G.; Pennie, W. D.; Pickett, S. D.; Wang, J.; Wallace, O.; Weir, A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 475–486.
- [88] Fellmann, C.; Gowen, B. G.; Lin, P.-C.; Doudna, J. A.; Corn, J. E. Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 89–100.
- [89] Esch, E. W.; Bahinski, A.; Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 248–260.
- [90] Esch, M. B.; King, T. L.; Shuler, M. L. The role of body-on-a-chip devices in drug and toxicity studies. *Annu Rev Biomed Eng* **2011**, *13*, 55–72.
- [91] Kramer, J. A.; Sagartz, J. E.; Morris, D. L. The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. *Nat Rev Drug Discov* **2007**, *6*, 636–649.
- [92] Ashburn, T. T. and Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3*, 673–683.
- [93] Yeh, J.-R. J.; Munson, K. M.; Elagib, K. E.; Goldfarb, A. N.; Sweetser, D. A.; Peterson, R. T. Discovering chemical modifiers of oncogene-regulated hematopoietic differentiation. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 236–243.
- [94] Klimek, V. M.; Dolezal, E. K.; Smith, L.; Soff, G.; Nimer, S. D. Phase I trial of sodium salicylate in patients with myelodysplastic syndromes and acute myelogenous leukemia. *Leuk. Res.* **2012**, *36*, 570–574.
- [95] Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872.
- [96] Yu, J.; Vodyanik, M. A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G. A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; Slukvin, I. I.; Thomson, J. A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920.
- [97] Shi, Y.; Inoue, H.; Wu, J. C.; Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16*, 115–130.
- [98] Grskovic, M.; Javaherian, A.; Strulovici, B.; Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells - opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 915–929.

- [99] Harris, K.; Aylott, M.; Cui, Y.; Louttit, J. B.; McMahon, N. C.; Sridhar, A. Comparison of electrophysiological data from human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes to functional preclinical safety assays. *Toxicol. Sci.* **2013**, *134*, 412–426.
- [100] Qu, Y. and Vargas, H. M. Proarrhythmia Risk Assessment in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using the Maestro MEA Platform. *Toxicol. Sci.* **2015**, *147*, 286–295.
- [101] Sayed, N.; Liu, C.; Wu, J. C. Translation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2016**, *67*, 2161–2176.
- [102] Kimbrel, E. A. and Lanza, R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14*, 681–692.
- [103] Scudellari, M. A decade of iPS cells. *Nature* **2016**, *534*, 310–312.
- [104] Menasché, P.; Vanneaux, V.; Hagège, A.; Bel, A.; Cholley, B.; Cacciapuoti, I.; Parouchev, A.; Benhamouda, N.; Tachdjian, G.; Tosca, L.; Trouvin, J.-H.; Fabreguettes, J.-R.; Bellamy, V.; Guillemain, R.; Suberbielle Boissel, C.; Tartour, E.; Desnos, M.; Larghero, J. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* **2015**, *36*, 2011–2017.
- [105] Neofytou, E.; O'Brien, C. G.; Couture, L. A.; Wu, J. C. Hurdles to clinical translation of human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* **2015**, *125*, 2551–2557.
- [106] Lee, A. S.; Tang, C.; Rao, M. S.; Weissman, I. L.; Wu, J. C. Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 998–1004.
- [107] Lund, R. J.; Närvä, E.; Lahesmaa, R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Genet.* **2012**, *13*, 732–744.
- [108] Pearl, J. I.; Kean, L. S.; Davis, M. M.; Wu, J. C. Pluripotent Stem Cells: Immune to the Immune System? *Sci Transl Med.* **2012**, *4*, 164ps25.
- [109] Hanna, J.; Wernig, M.; Markoulaki, S.; Sun, C.-W.; Meissner, A.; Cassady, J. P.; Beard, C.; Brambrink, T.; Wu, L.-C.; Townes, T. M.; Jaenisch, R. Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science* **2007**, *318*, 1920–1923.
- [110] Takebe, T.; Sekine, K.; Enomura, M.; Koike, H.; Kimura, M.; Ogaeri, T.; Zhang, R.-R.; Ueno, Y.; Zheng, Y.-W.; Koike, N.; Aoyama, S.; Adachi, Y.; Taniguchi, H. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **2013**, *499*, 481–484.
- [111] Evans, M. J. and Kaufmann, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154–156.
- [112] Martin, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1981**, *78*, 7634–7638.



- [113] Keller, G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 1129–1155.
- [114] Chen, C.-Y.; Cheng, Y.-Y.; Yen, C. Y. T.; Hsieh, P. C. H. Mechanisms of pluripotency maintenance in mouse embryonic stem cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 1805–1817.
- [115] Loh, K. M. and Lim, B. A precarious balance: Pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 363–369.
- [116] Thomson, M.; Liu, S. J.; Zou, L.-N.; Smith, Z.; Meissner, A.; Ramanathan, S. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **2011**, *145*, 875–889.
- [117] Tomioka, M.; Nishimoto, M.; Miyagi, S.; Katayanagi, T.; Fukui, N.; Niwa, H.; Muramatsu, M.; Okuda, A. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3202–3213.
- [118] Yuan, H.; Corbi, N.; Basilico, C.; Dailey, L. Developmental-Specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2635–2645.
- [119] Ambrosetti, D. C.; Schöler, H. R.; Dailey, L.; Basilico, C. Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 23387–23397.
- [120] Guo, Y.; Costa, R.; Ramsey, H.; Starnes, T.; Vance, G.; Robertson, K.; Kelley, M.; Reinbold, R.; Scholer, H.; Hromas, R. The embryonic stem cell transcription factors Oct-4 and FoxD3 interact to regulate endodermal-specific promoter expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 3663–3667.
- [121] Loh, Y.-H.; Wu, Q.; Chew, J.-L.; Vega, V. B.; Zhang, W.; Chen, X.; Bourque, G.; George, J.; Leong, B.; Liu, J.; Wong, K.-Y.; Sung, K. W.; Lee, C. W. H.; Zhao, X.-D.; Chiu, K.-P.; Lipovich, L.; Kuznetsov, V. A.; Robson, P.; Stanton, L. W.; Wei, C.-L.; Ruan, Y.; Lim, B.; Ng, H.-H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 431–440.
- [122] Navarro, P.; Festuccia, N.; Colby, D.; Gagliardi, A.; Mullin, N. P.; Zhang, W.; Karwacki-Neisius, V.; Osorno, R.; Kelly, D.; Robertson, M.; Chambers, I. OCT4/SOX2-independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells. *EMBO J.* **2012**, *31*, 4547–4562.
- [123] Lin, T.; Chao, C.; Saito, S.; Mazur, S. J.; Murphy, M. E.; Appella, E.; Xu, Y. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 165–171.
- [124] Bourillot, P.-Y. and Savatier, P. Krüppel-like transcription factors and control of pluripotency. *BMC Biol.* **2010**, *8*, 125.

- [125] Niwa, H.; Ogawa, K.; Shimosato, D.; Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **2009**, *460*, 118–122.
- [126] Jirmanova, L.; Afanassieff, M.; Gobert-Gosse, S.; Markossian, S.; Savatier, P. Differential contributions of ERK and PI3-kinase to the regulation of cyclin D1 expression and to the control of the G1/S transition in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* **2002**, *21*, 5515–5528.
- [127] Burdon, T.; Stracey, C.; Chambers, I.; Nichols, J.; Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev. Biol.* **1999**, *210*, 30–43.
- [128] Guan, K. L.; Figueroa, C.; Brtva, T. R.; Zhu, T.; Taylor, J.; Barber, T. D.; Vojtek, A. B. Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 27354–27359.
- [129] Basu, S.; Totty, N. F.; Irwin, M. S.; Sudol, M.; Downward, J. Akt Phosphorylates the Yes-Associated Protein, YAP, to Induce Interaction with 14-3-3 and Attenuation of p73-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* **2003**, *11*, 11–23.
- [130] Sears, R.; Nuckolls, F.; Haura, E.; Taya, Y.; Tamai, K.; Nevins, J. R. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 2501–2514.
- [131] Tamm, C.; Böwer, N.; Annerén, C. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J. Cell. Sci.* **2011**, *124*, 1136–1144.
- [132] Ying, Q.-L.; Nichols, J.; Chambers, I.; Smith, A. BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* **2003**, *115*, 281–292.
- [133] Qi, X.; Li, T.-G.; Hao, J.; Hu, J.; Wang, J.; Simmons, H.; Miura, S.; Mishina, Y.; Zhao, G.-Q. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 6027–6032.
- [134] Rajan, P.; Panchision, D. M.; Newell, L. F.; McKay, R. D. G. BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 911–921.
- [135] Sato, N.; Meijer, L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 55–63.
- [136] Wray, J.; Kalkan, T.; Gomez-Lopez, S.; Eckardt, D.; Cook, A.; Kemler, R.; Smith, A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 838–845.

- [137] Silva, J.; Barrandon, O.; Nichols, J.; Kawaguchi, J.; Theunissen, T. W.; Smith, A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* **2008**, *6*, e253.
- [138] Cao, N.; Huang, Y.; Zheng, J.; Spencer, C. I.; Zhang, Y.; Fu, J.-D.; Nie, B.; Xie, M.; Zhang, M.; Wang, H.; Ma, T.; Xu, T.; Shi, G.; Srivastava, D.; Ding, S. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* **2016**, *352*, 1216–1220.
- [139] Zhang, Y.; Cao, N.; Huang, Y.; Spencer, C. I.; Fu, J.-D.; Yu, C.; Liu, K.; Nie, B.; Xu, T.; Li, K.; Xu, S.; Bruneau, B. G.; Srivastava, D.; Ding, S. Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 368–381.
- [140] Cao, L.; McDonnell, A.; Nitzsche, A.; Alexandrou, A.; Saintot, P.-P.; Loucif, A. J.C.; Brown, A. R.; Young, G.; Mis, M.; Randall, A.; Waxman, S. G.; Stanley, P.; Kirby, S.; Tarabar, S.; Gutteridge, A.; Butt, R.; McKernan, R. M.; Whiting, P.; Ali, Z.; Bilsland, J.; Stevens, E. B. Pharmacological reversal of a pain phenotype in iPSC-derived sensory neurons and patients with inherited erythromelalgia. *Sci Transl Med.* **2016**, *8*, 335ra56.
- [141] Sugimura, R.; Jha, D. K.; Han, A.; Soria-Valles, C.; da Rocha, E. L.; Lu, Y.-F.; Goettel, J. A.; Serrao, E.; Rowe, R. G.; Malleshaiah, M.; Wong, I.; Sousa, P.; Zhu, T. N.; Ditadi, A.; Keller, G.; Engelman, A. N.; Snapper, S. B.; Doulatov, S.; Daley, G. Q. Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nature* **2017**, *545*, 432–438.
- [142] Burridge, P. W.; Li, Y. F.; Matsa, E.; Wu, H.; Ong, S.-G.; Sharma, A.; Holmström, A.; Chang, A. C.; Coronado, M. J.; Ebert, A. D.; Knowles, J. W.; Telli, M. L.; Witteles, R. M.; Blau, H. M.; Bernstein, D.; Altman, R. B.; Wu, J. C. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 547–556.
- [143] Zhang, M.; Schulte, J. S.; Heinick, A.; Piccini, I.; Rao, J.; Quaranta, R.; Zeuschner, D.; Malan, D.; Kim, K.-P.; Röpke, A.; Sasse, P.; Araújo-Bravo, M.; Seebohm, G.; Schöler, H.; Fabritz, L.; Kirchhof, P.; Müller, F. U.; Greber, B. Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: Implications for in vitro maturation. *Stem Cells* **2015**, *33*, 1456–1469.
- [144] Rao, J.; Pfeiffer, M. J.; Frank, S.; Adachi, K.; Piccini, I.; Quaranta, R.; Araújo-Bravo, M.; Schwarz, J.; Schade, D.; Leidel, S.; Schöler, H. R.; Seebohm, G.; Greber, B. Stepwise Clearance of Repressive Roadblocks Drives Cardiac Induction in Human ESCs. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 341–353.
- [145] Belian, E.; Nosedá, M.; Abreu Paiva, M. S.; Leja, T.; Sampson, R.; Schneider, M. D. Forward Programming of Cardiac Stem Cells by Homogeneous Transduction with MYOCD plus TBX5. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125384.

- [146] Mercola, M.; Ruiz-Lozano, P.; Schneider, M. D. Cardiac muscle regeneration: lessons from development. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 299–309.
- [147] Koch, E. and Malek, F. A. Standardized extracts from hawthorn leaves and flowers in the treatment of cardiovascular disorders--preclinical and clinical studies. *Planta Med.* **2011**, *77*, 1123–1128.
- [148] Wang, J.; Xiong, X.; Feng, B. Effect of crataegus usage in cardiovascular disease prevention: an evidence-based approach. *Evid Based Complement Alternat Med* **2013**, *2013*, 149363.
- [149] Bushway, P. J. The Development of a Chemical Biology Pipeline for the Identification of Small Molecules that Induce Cardiopoiesis in Murine Embryonic Stem Cells. Ph.D. Thesis, University of California, San Diego. 2012.
- [150] Cabral-Teixeira, J.; Martinez-Fernandez, A.; Cai, W.; Terzic, A.; Mercola, M.; Willems, E. Cholesterol-derived glucocorticoids control early fate specification in embryonic stem cells. *Stem Cell Res* **2015**, *15*, 88–95.
- [151] Wang, X. and Yang, P. In vitro differentiation of mouse embryonic stem (mES) cells using the hanging drop method. *J Vis Exp* **2008**, 825.
- [152] Fuegemann, C. J.; Samraj, A. K.; Walsh, S.; Fleischmann, B. K.; Jovinge, S.; Breitbach, M. Differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes via the hanging-drop and mass culture methods. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **2010**, *Chapter 1*, 1F.11.1-13.
- [153] Hescheler, J.; Fleischmann, B. K.; Lentini, S.; Maltsev, V. A.; Rohwedel, J.; Wobus, A. M.; Addicks, K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* **1997**, *36*, 149–162.
- [154] Willems, E.; Bushway, P. J.; Mercola, M. Natural and synthetic regulators of embryonic stem cell cardiogenesis. *Pediatr Cardiol* **2009**, *30*, 635–642.
- [155] Ventura, C. and Maioli, M. Opioid Peptide Gene Expression Primes Cardiogenesis in Embryonal Pluripotent Stem Cells. *Circ. Res.* **2000**, *87*, 189–194.
- [156] Skerjanc, I. S.; Petropoulos, H.; Ridgeway, A. G.; Wilton, S. Myocyte Enhancer Factor 2C and Nkx2–5 Up-regulate Each Other's Expression and Initiate Cardiomyogenesis in P19 Cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 34904–34910.
- [157] Skerjanc, I. Cardiac and Skeletal Muscle Development in P19 Embryonal Carcinoma Cells. *Trends Cardiovasc. Med.* **1999**, *9*, 139–143.
- [158] Monzen, K.; Shiojima, I.; Hiroi, Y.; Kudoh, S.; Oka, T.; Takimoto, E.; Hayashi, D.; Hosoda, T.; Habara-Ohkubo, A.; Nakaoka, T.; Fujita, T.; Yazaki, Y.; Komuro, I. Bone Morphogenetic Proteins Induce Cardiomyocyte Differentiation through the Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase TAK1 and Cardiac Transcription Factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 7096–7105.

- [159] McBurney, M. W.; Jones-Villeneuve, E. M. V.; Edwards, M. K. S.; Anderson, P. J. Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* **1982**, *299*, 165–167.
- [160] Sauer, H.; Rahimi, G.; Hescheler, J.; Wartenberg, M. Role of reactive oxygen species and phosphatidylinositol 3-kinase in cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *FEBS Lett.* **2000**, *476*, 218–223.
- [161] Sato, H.; Takahashi, M.; Ise, H.; Yamada, A.; Hirose, S.-i.; Tagawa, Y.-i.; Morimoto, H.; Izawa, A.; Ikeda, U. Collagen synthesis is required for ascorbic acid-enhanced differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *342*, 107–112.
- [162] Chan, S. S.-K.; Chen, J.-H.; Hwang, S.-M.; Wang, I.-J.; Li, H.-J.; Lee, R. T.; Hsieh, P. C. H. Salvianolic acid B-vitamin C synergy in cardiac differentiation from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *387*, 723–728.
- [163] Yang, L.; Soonpaa, M. H.; Adler, E. D.; Roepke, T. K.; Kattman, S. J.; Kennedy, M.; Henckaerts, E.; Bonham, K.; Abbott, G. W.; Linden, R. M.; Field, L. J.; Keller, G. M. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **2008**, *453*, 524–528.
- [164] Arrigoni, O. and Tullio, M. C. de Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1569*, 1–9.
- [165] Baharvand, H.; Azarnia, M.; Parivar, K.; Ashtiani, S. K. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2005**, *38*, 495–503.
- [166] Tsuneto, M.; Yamazaki, H.; Yoshino, M.; Yamada, T.; Hayashi, S.-I. Ascorbic acid promotes osteoclastogenesis from embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *335*, 1239–1246.
- [167] Cao, N.; Liu, Z.; Chen, Z.; Wang, J.; Chen, T.; Zhao, X.; Ma, Y.; Qin, L.; Kang, J.; Wei, B.; Wang, L.; Jin, Y.; Yang, H.-T. Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell Res.* **2012**, *22*, 219–236.
- [168] Burridge, P. W.; Keller, G.; Gold, J. D.; Wu, J. C. Production of de novo cardiomyocytes: Human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 16–28.
- [169] Kawai, T.; Takahashi, T.; Esaki, M.; Ushikoshi, H.; Nagano, S.; Fujiwara, H.; Kosai, K.-i. Efficient Cardiomyogenic Differentiation of Embryonic Stem Cell by Fibroblast Growth Factor 2 and Bone Morphogenetic Protein 2. *Circ. J.* **2004**, *68*, 691–702.
- [170] Behfar, A.; Zingman, L. V.; Hodgson, D. M.; Rauzier, J.-M.; Kane, G. C.; Terzic, A.; Pucéat, M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J.* **2002**, *16*, 1558–1566.

- [171] Hartman, M. E.; Librande, J. R.; Medvedev, I. O.; Ahmad, R. N.; Moussavi-Harami, F.; Gupta, P. P.; Chien, W.-M.; Chin, M. T. An optimized and simplified system of mouse embryonic stem cell cardiac differentiation for the assessment of differentiation modifiers. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93033.
- [172] Graichen, R.; Xu, X.; Braam, S. R.; Balakrishnan, T.; Norfiza, S.; Sieh, S.; Soo, S. Y.; Tham, S. C.; Mummery, C.; Colman, A.; Zweigerdt, R.; Davidson, B. P. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation* **2008**, *76*, 357–370.
- [173] Laco, F.; Low, J.-L.; Seow, J.; Woo, T. L.; Zhong, Q.; Seayad, J.; Liu, Z.; Wei, H.; Reuveny, S.; Elliott, D. A.; Chai, C. L. L.; Oh, S. K. W. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells with SB203580 analogues correlates with Wnt pathway CK1 inhibition independent of p38 MAPK signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *80*, 56–70.
- [174] Oeztuerk-Winder, F. and Ventura, J.-J. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation. *Biochem. J.* **2012**, *445*, 1–10.
- [175] Barruet, E.; Hadadeh, O.; Peiretti, F.; Renault, V. M.; Hadjal, Y.; Bernot, D.; Tournaire, R.; Negre, D.; Juhan-Vague, I.; Alessi, M.-C.; Binétruy, B. p38 mitogen activated protein kinase controls two successive-steps during the early mesodermal commitment of embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 1233–1246.
- [176] Tran, T. H.; Wang, X.; Browne, C.; Zhang, Y.; Schinke, M.; Izumo, S.; Burcin, M. Wnt3a-induced mesoderm formation and cardiomyogenesis in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **2009**, *27*, 1869–1878.
- [177] Shanware, N. P.; Williams, L. M.; Bowler, Michael J., Tibbetts, Randal S. Non-specific in vivo inhibition of CK1 by the pyridinyl imidazole p38 inhibitors SB 203580 and SB 202190. *BMB Rep* **2009**, *42*, 142–147.
- [178] Laping, N. J.; Grygielko, E.; Mathur, A.; Butter, S.; Bomberger, J.; Tweed, C.; Martin, W.; Fornwald, J.; Lehr, R.; Harling, J.; Gaster, L.; Callahan, J. F.; Olson, B. A. Inhibition of Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ 1-Induced Extracellular Matrix with a Novel Inhibitor of the TGF- $\beta$  Type I Receptor Kinase Activity: SB-431542. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 58–64.
- [179] Winnier, G.; Blessing, M.; Labosky, P. A.; Hogan, B. L. M. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 2105–2116.
- [180] Zhang, C. and Evans, T. BMP-like signals are required after the midblastula transition for blood cell development. *Dev. Genet.* **1996**, *18*, 267–278.
- [181] Barron, M.; Gao, M.; Lough, J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Dev. Dyn.* **2000**, *218*, 383–393.

- [182] Lough, J.; Barron, M.; Brogley, M.; Sugi, Y.; Bolender, D. L.; Zhu, X. Combined BMP-2 and FGF-4, but Neither Factor Alone, Induces Cardiogenesis in Non-Precardiac Embryonic Mesoderm. *Dev. Biol.* **1996**, *178*, 198–202.
- [183] Mine, N.; Anderson, R. M.; Klingensmith, J. BMP antagonism is required in both the node and lateral plate mesoderm for mammalian left-right axis establishment. *Development* **2008**, *135*, 2425–2434.
- [184] Liu, W. and Foley, A. C. Signaling pathways in early cardiac development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2011**, *3*, 191–205.
- [185] Gazzero, E. and Minetti, C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* **2007**, *7*, 325–333.
- [186] Billings, P. C.; Fiori, J. L.; Bentwood, J. L.; O'Connell, M. P.; Jiao, X.; Nussbaum, B.; Caron, R. J.; Shore, E. M.; Kaplan, F. S. Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *J. Bone Miner. Res.* **2008**, *23*, 305–313.
- [187] Vogt, J.; Traynor, R.; Sapkota, G. P. The specificities of small molecule inhibitors of the TGF $\beta$  and BMP pathways. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 1831–1842.
- [188] Cai, W.; Albin, S.; Wei, K.; Willems, E.; Guzzo, R. M.; Tsuda, M.; Giordani, L.; Spiering, S.; Kurian, L.; Yeo, G. W.; Puri, P. L.; Mercola, M. Coordinate Nodal and BMP inhibition directs Baf60c-dependent cardiomyocyte commitment. *Genes Dev.* **2013**, *27*, 2332–2344.
- [189] Inman, G. J.; Nicolás, F. J.; Callahan, J. F.; Harling, J. D.; Gaster, L. M.; Reith, A. D.; Laping, N. J.; Hill, C. S. SB-431542 Is a Potent and Specific Inhibitor of Transforming Growth Factor-beta Superfamily Type I Activin Receptor-Like Kinase (ALK) Receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 65–74.
- [190] Watabe, T.; Nishihara, A.; Mishima, K.; Yamashita, J.; Shimizu, K.; Miyazawa, K.; Nishikawa, S.-I.; Miyazono, K. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 1303–1311.
- [191] Callahan, J. F.; Burgess, J. L.; Fornwald, J. A.; Gaster, L. M.; Harling, J. D.; Harrington, F. P.; Heer, J.; Kwon, C.; Lehr, R.; Mathur, A.; Olson, B. A.; Weinstock, J.; Laping, N. J. Identification of Novel Inhibitors of the Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) Type 1 Receptor (ALK5). *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 999–1001.
- [192] Längle, D.; Marquardt, V.; Heider, E.; Vigante, B.; Duburs, G.; Luntena, I.; Flötgen, D.; Golz, C.; Strohmam, C.; Koch, O.; Schade, D. Design, synthesis and 3D-QSAR studies of novel 1,4-dihydropyridines as TGF $\beta$ /Smad inhibitors. *Eur J Med Chem* **2015**, *95*, 249–266.

- [193] Proffitt, K. D.; Madan, B.; Ke, Z.; Pendharkar, V.; Ding, L.; Lee, M. A.; Hannoush, R. N.; Virshup, D. M. Pharmacological inhibition of the Wnt acyltransferase PORCN prevents growth of WNT-driven mammary cancer. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 502–507.
- [194] Shultz, M. D.; Cheung, A. K.; Kirby, C. A.; Firestone, B.; Fan, J.; Chen, C. H.-T.; Chen, Z.; Chin, D. N.; Dipietro, L.; Fazal, A.; Feng, Y.; Fortin, P. D.; Gould, T.; Lagu, B.; Lei, H.; Lenoir, F.; Majumdar, D.; Ochala, E.; Palermo, M. G.; Pham, L.; Pu, M.; Smith, T.; Stams, T.; Tomlinson, R. C.; Touré, B. B.; Visser, M.; Wang, R. M.; Waters, N. J.; Shao, W. Identification of NVP-TNKS656: The use of structure-efficiency relationships to generate a highly potent, selective, and orally active tankyrase inhibitor. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6495–6511.
- [195] Wang, H.; Hao, J.; Hong, C. C. Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 192–197.
- [196] Di Chen; Zhao, M.; Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **2004**, *22*, 233–241.
- [197] Reddi, A. H. and Reddi, A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2009**, *20*, 341–342.
- [198] Bragdon, B.; Moseychuk, O.; Saldanha, S.; King, D.; Julian, J.; Nohe, A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell. Signal.* **2011**, *23*, 609–620.
- [199] Begam, H.; Nandi, S. K.; Kundu, B.; Chanda, A. Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2017**, *70*, 856–869.
- [200] Wagner, D. O.; Sieber, C.; Bhushan, R.; Börgermann, J. H.; Graf, D.; Knaus, P. BMPs: From Bone to Body Morphogenetic Proteins. *Sci Signal* **2010**, *3*, mr1.
- [201] Lowery, J. W.; Brookshire, B.; Rosen, V. A Survey of Strategies to Modulate the Bone Morphogenetic Protein Signaling Pathway: Current and Future Perspectives. *Stem Cells Int* **2016**, *2016*, 7290686.
- [202] Salazar, V. S.; Gamer, L. W.; Rosen, V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol* **2016**, *12*, 203–221.
- [203] Morrell, N. W.; Bloch, D. B.; Dijke, P. ten; Goumans, M.-J. T. H.; Hata, A.; Smith, J.; Yu, P. B.; Bloch, K. D. Targeting BMP signalling in cardiovascular disease and anaemia. *Nat Rev Cardiol* **2016**, *13*, 106–120.
- [204] Lowery, J. W. and Caestecker, M. P. de BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2010**, *21*, 287–298.
- [205] Li, Z. and Chen, Y.-G. Functions of BMP signaling in embryonic stem cell fate determination. *Exp. Cell Res.* **2013**, *319*, 113–119.
- [206] Günesdogan, U.; Magnúsdóttir, E.; Surani, M. A. Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event corrected. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2014**, *369*,



- [207] Derynck, R. SMAD proteins and mammalian anatomy. *Nature* **1998**, *393*, 737–739.
- [208] Massagué, J. and Wotton, D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* **2000**, *19*, 1745–1754.
- [209] Mishima, K.; Kitoh, H.; Ohkawara, B.; Okuno, T.; Ito, M.; Masuda, A.; Ishiguro, N.; Ohno, K. Lansoprazole Upregulates Polyubiquitination of the TNF Receptor-Associated Factor 6 and Facilitates Runx2-mediated Osteoblastogenesis. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 2046–2061.
- [210] Zhang, H. and Lin, C.-Y. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway. *Spine* **2008**, *33*, E525–31.
- [211] Maeda, T.; Matsunuma, A.; Kawane, T.; Horiuchi, N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 874–877.
- [212] Kanazawa, I.; Yamaguchi, T.; Yano, S.; Yamauchi, M.; Sugimoto, T. Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP-2 expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2009**, *296*, E139–46.
- [213] Kanazawa, I.; Yamaguchi, T.; Yano, S.; Yamauchi, M.; Sugimoto, T. Fasudil hydrochloride induces osteoblastic differentiation of stromal cell lines, C3H10T1/2 and ST2, via bone morphogenetic protein-2 expression. *Endocr. J.* **2010**, *57*, 415–421.
- [214] Horiuchi, H.; Saito, N.; Kinoshita, T.; Wakabayashi, S.; Tsutsumimoto, T.; Takaoka, K. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced new bone formation in mice by the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline. *Bone* **2001**, *28*, 290–294.
- [215] Tokuhara, Y.; Wakitani, S.; Imai, Y.; Nomura, C.; Hoshino, M.; Yano, K.; Taguchi, S.; Kim, M.; Kadoya, Y.; Takaoka, K. Local delivery of rolipram, a phosphodiesterase-4-specific inhibitor, augments bone morphogenetic protein-induced bone formation. *J. Bone Miner. Metab.* **2010**, *28*, 17–24.
- [216] Yang, J.; Li, X.; Al-Lamki, R. S.; Wu, C.; Weiss, A.; Berk, J.; Schermuly, R. T.; Morrell, N. W. Sildenafil potentiates bone morphogenetic protein signaling in pulmonary arterial smooth muscle cells and in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 34–42.
- [217] Feng, L.; Cook, B.; Tsai, S.-Y.; Zhou, T.; LaFlamme, B.; Evans, T.; Chen, S. Discovery of a Small-Molecule BMP Sensitizer for Human Embryonic Stem Cell Differentiation. *Cell Rep* **2016**, *15*, 2063–2075.
- [218] Genthe, J. R.; Min, J.; Farmer, D. M.; Shelat, A. A.; Grenet, J. A.; Lin, W.; Finkelstein, D.; Vrijens, K.; Chen, T.; Guy, R. K.; Clements, W. K.; Roussel, M. F. Ventromorphins: A New Class of Small Molecule Activators of the Canonical BMP Signaling Pathway. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 2436–2447.

- [219] Carreira, A. C.; Lojudice, F. H.; Halcsik, E.; Navarro, R. D.; Sogayar, M. C.; Granjeiro, J. M. Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 335–345.
- [220] Klaus, A.; Saga, Y.; Taketo, M. M.; Tzahor, E.; Birchmeier, W. Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 18531–18536.
- [221] Herrera, B. and Inman, G. J. A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol.* **2009**, *10*, 20.
- [222] Kano, Y.; Otsuka, F.; Takeda, M.; Suzuki, J.; Inagaki, K.; Miyoshi, T.; Miyamoto, M.; Otani, H.; Ogura, T.; Makino, H. Regulatory roles of bone morphogenetic proteins and glucocorticoids in catecholamine production by rat pheochromocytoma cells. *Endocrinology* **2005**, *146*, 5332–5340.
- [223] Komatsubara, M.; Hara, T.; Hosoya, T.; Toma, K.; Tsukamoto-Yamauchi, N.; Iwata, N.; Inagaki, K.; Wada, J.; Otsuka, F. Melatonin regulates catecholamine biosynthesis by modulating bone morphogenetic protein and glucocorticoid actions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *165*, 182–189.
- [224] Park, K.-H.; Kang, J. W.; Lee, E.-M.; Kim, J. S.; Rhee, Y. H.; Kim, M.; Jeong, S. J.; Park, Y. G.; Kim, S. H. Melatonin promotes osteoblastic differentiation through the BMP/ERK/Wnt signaling pathways. *J. Pineal Res.* **2011**, *51*, 187–194.
- [225] En-Nosse, M.; Hartmann, S.; Trinkaus, K.; Alt, V.; Stigler, B.; Heiss, C.; Kilian, O.; Schnettler, R.; Lips, K. S. Expression of non-neuronal cholinergic system in osteoblast-like cells and its involvement in osteogenesis. *Cell Tissue Res.* **2009**, *338*, 203–215.
- [226] Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - an update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1–34.
- [227] He, W. and Cronstein, B. N. Adenosine A1 receptor regulates osteoclast formation by altering TRAF6/TAK1 signaling. *Purinergic Signal.* **2012**, *8*, 327–337.
- [228] Mediero, A. and Cronstein, B. N. Adenosine and bone metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2013**, *24*, 290–300.
- [229] Mediero, A.; Wilder, T.; Perez-Aso, M.; Cronstein, B. N. Direct or indirect stimulation of adenosine A2A receptors enhances bone regeneration as well as bone morphogenetic protein-2. *FASEB J.* **2015**, *29*, 1577–1590.
- [230] Katebi, M.; Soleimani, M.; Cronstein, B. N. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *85*, 438–444.

- [231] Palcy, S. and Goltzman, D. Protein kinase signalling pathways involved in the up-regulation of the rat  $\alpha 1(I)$  collagen gene by transforming growth factor  $\beta 1$  and bone morphogenetic protein 2 in osteoblastic cells. *Biochem J.* **1999**, *343*, 21–27.
- [232] Meek, D. W. and Street, A. J. Nuclear protein phosphorylation and growth control. *Biochem. J.* **1992**, *287*, 1–15.
- [233] Nakayama, K.; Tamura, Y.; Suzawa, M.; Harada, S.-I.; Fukumoto, S.; Kato, M.; Miyazono, K.; Rodan, G. A.; Takeuchi, Y.; Fujita, T. Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* **2003**, *18*, 827–835.
- [234] Lee, Y.; Bae, K. J.; Chon, H. J.; Kim, S. H.; Kim, S. A.; Kim, J. A Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Dovitinib (TKI-258), Enhances BMP-2-Induced Osteoblast Differentiation In Vitro. *Mol. Cells* **2016**, *39*, 389–394.
- [235] Wolf, B. B. and Green, D. R. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20049–20052.
- [236] Mogi, M. and Togari, A. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47477–47482.
- [237] Zheng, Y.; Wang, X.; Wang, H.; Yan, W.; Zhang, Q.; Chang, X. Bone morphogenetic protein 2 inhibits hepatocellular carcinoma growth and migration through downregulation of the PI3K/AKT pathway. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 5189–5198.
- [238] Müller, P.; Doliva, R.; Busch, M.; Philippeit, C.; Stephan, H.; Dünker, N. Additive Effects of Retinoic Acid (RA) and Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP-4) Apoptosis Signaling in Retinoblastoma Cell Lines. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131467.
- [239] Chen, S.; Guttridge, D. C.; Tang, E.; Shi, S.; Guan, K.; Wang, C. Y. Suppression of tumor necrosis factor-mediated apoptosis by nuclear factor kappaB-independent bone morphogenetic protein/Smad signaling. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39259–39263.
- [240] Pittler, M. H.; Guo, R.; Ernst, E. Hawthorn extract for treating chronic heart failure. *Cochrane Database Syst Rev* **2008**, CD005312.
- [241] Holubarsch, C. J. F.; Colucci, W. S.; Meinertz, T.; Gaus, W.; Tendera, M. The efficacy and safety of Crataegus extract WS 1442 in patients with heart failure: The SPICE trial. *Eur. J. Heart Fail.* **2008**, *10*, 1255–1263.
- [242] Fürst, R. and Zündorf, I. Weißdornextrakte gegen Herzinsuffizienz? *Pharmakon* **2017**, *5*, 217–221.
- [243] Pöpping, S.; Rose, H.; Ionescu, I.; Fischer, Y.; Kammermeier, H. Effect of a hawthorn extract on contraction and energy turnover of isolated rat cardiomyocytes. *Arzneimittelforschung* **1995**, *45*, 1157–1161.

- [244] Siegel, G.; Casper, U.; Schnalke, F.; Hetzer, R. Molecular physiological effector mechanisms of hawthorn extract in cardiac papillary muscle and coronary vascular smooth muscle. *Phytother Res* **1996**, 195–198.
- [245] Müller, A.; Linke, W.; Klaus, W. Crataegus extract blocks potassium currents in guinea pig ventricular cardiac myocytes. *Planta Med.* **1999**, 65, 335–339.
- [246] Schmidt-Schweda, S.; Burstin, J. von; Möllmann, H.; Wollner, S.; Holubarsch, C. Der positiv inotrope Effekt des Crataegus Spezialextrakt WS-1442 in isolierten Myozyten aus menschlichem Vorhof- und Ventrikelmyokard wird vorwiegend durch oligomere Procyanidine vermittelt. *Z Kardiol* **2000**, 164.
- [247] Schwinger, R. H. G.; Pietsch, M.; Frank, K.; Brixius, K. Crataegus Special Extract WS 1442 Increases Force of Contraction in Human Myocardium cAMP-Independently. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2000**, 35, 700–707.
- [248] Krzeminski, T.; Koch, E.; Chatterjee, S. S. Ischemia and reperfusion induced arrhythmias: beneficial effects of an extract of Crataegus oxyacantha. *Pharm Pharmacol Lett* **1993**, 45–48.
- [249] Veveris, M.; Koch, E.; Chatterjee, S. S. Crataegus special extract WS 1442 improves cardiac function and reduces infarct size in a rat model of prolonged coronary ischemia and reperfusion. *Life Sci.* **2004**, 74, 1945–1955.
- [250] Chatterjee, S. S.; Koch, E.; Jaggy, H.; Krzeminski, T. In-vitro- und In-vivo-Untersuchungen zur kardioprotektiven Wirkung von oligomeren Procyanidinen in einem Crataegus-Extrakt aus Blättern mit Blüten. *Arzneimittelforschung* **1997**, 74, 1945–1955.
- [251] Jayachandran, K. S.; Khan, M.; Selvendiran, K.; Devaraj, S. N.; Kuppusamy, P. Crataegus oxyacantha extract attenuates apoptotic incidence in myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating Akt and HIF-1 signaling pathways. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2010**, 56, 526–531.
- [252] Koch, E. and Spörl-Aich, G. Oral treatment with the Crataegus special extract WS® 1442 inhibits cardiac hypertrophy in rats with DOCA-salt or aortic banding induced hypertension. *Planta Med.* **2006**, 72, 1061.
- [253] Koch, E. and Chatterjee, S. S. Crataegus extract WS®1442 enhances coronary flow in the isolated rat heart by endothelial release of nitric oxide. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, R48.
- [254] Brixius, K.; Willms, S.; Napp, A.; Tossios, P.; Ladage, D.; Bloch, W.; Mehlhorn, U.; Schwinger, R. H. G. Crataegus special extract WS 1442 induces an endothelium-dependent, NO-mediated vasorelaxation via eNOS-phosphorylation at serine 1177. *Cardiovasc Drugs Ther* **2006**, 20, 177–184.
- [255] Anselm, E.; Socorro, V. F. M.; Dal-Ros, S.; Schott, C.; Bronner, C.; Schini-Kerth, V. B. Crataegus special extract WS 1442 causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of endothelial NO synthase but not via activation of estrogen receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2009**, 53, 253–260.

- [256] Fürst, R.; Zirrgiebel, U.; Totzke, F.; Zahler, S.; Vollmar, A. M.; Koch, E. The Crataegus extract WS 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR-beta. *Atherosclerosis* **2010**, *211*, 409–417.
- [257] Rajendran, S.; Deepalakshmi, P. D.; Parasakthy, K.; Devaraj, H.; Devaraj, S.N. Effect of tincture of Crataegus on the LDL-receptor activity of hepatic plasma membrane of rats fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis* **1996**, *123*, 235–241.
- [258] Shanthi, R.; Parasakthy, K.; Deepalakshmi, P. D.; Niranjali, D. S. Protective Effect of Tincture of Crataegus on Oxidative Stress in Experimental Atherosclerosis in Rats. *J Clin. Biochem. Nutr.* **1996**, 211–223.
- [259] Zhang, Z.; Ho, W. K. K.; Huang, Y.; Chen, Z.-Y. Hypocholesterolemic activity of hawthorn fruit is mediated by regulation of cholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase and acyl CoA: cholesterol acyltransferase. *Food Res. Int.* **2002**, 885–891.
- [260] Lin, Y.; Vermeer, M. A.; Trautwein, E. A. Triterpenic Acids Present in Hawthorn Lower Plasma Cholesterol by Inhibiting Intestinal ACAT Activity in Hamsters. *Evid Based Complement Alternat Med* **2011**, *2011*, 801272.
- [261] Thomé, O. W. Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. **1885**, www.BioLib.de.
- [262] Liang, M.; Xu, W.; Zhang, W.; Zhang, C.; Liu, R.; Shen, Y.; Li, H.; Wang, X.; Wang, X.; Pan, Q.; Chen, C. Quantitative LC/MS/MS method and in vivo pharmacokinetic studies of vitexin rhamnoside, a bioactive constituent on cardiovascular system from hawthorn. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, *21*, 422–429.
- [263] Vennat, B.; Gross, D.; Pourrat, A.; Pourrat, H. Hamamelis virginiana: Identification and Assay of Proanthocyanidins, Phenolic Acids and Flavonoids in Leaf Extracts. *Pharm Acta Helv* **1992**, *67*, 11–14.
- [264] Paige, S. L.; Plonowska, K.; Xu, A.; Wu, S. M. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ. Res.* **2015**, *116*, 341–353.
- [265] Bondue, A.; Lapouge, G.; Paulissen, C.; Semeraro, C.; Iacovino, M.; Kyba, M.; Blanpain, C. Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* **2008**, *3*, 69–84.
- [266] Lian, X.; Hsiao, C.; Wilson, G.; Zhu, K.; Hazeltine, L. B.; Azarin, S. M.; Raval, K. K.; Zhang, J.; Kamp, T. J.; Palecek, S. P. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, E1848-57.
- [267] Bizy, A.; Guerrero-Serna, G.; Hu, B.; Ponce-Balbuena, D.; Willis, B. C.; Zarzoso, M.; Ramirez, R. J.; Sener, M. F.; Mundada, L. V.; Klos, M.; Devaney, E. J.; Vikstrom, K. L.; Herron, T. J.; Jalife, J. Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early ventricular cardiac myocytes. *Stem Cell Res* **2013**, *11*, 1335–1347.

- [268] Kubalak, S. W.; Miller-Hance, W. C.; O'Briens, T. X.; Dyson, E.; Chien, K. R. Chamber Specification of Atrial Myosin Light Chain-2 Expression Precedes Septation during Murine Cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16961–16970.
- [269] Bhattacharya, S.; Burridge, P. W.; Kropp, E. M.; Chuppa, S. L.; Kwok, W.-M.; Wu, J. C.; Boheler, K. R.; Gundry, R. L. High efficiency differentiation of human pluripotent stem cells to cardiomyocytes and characterization by flow cytometry. *J Vis Exp* **2014**, 52010.
- [270] Li, G.; Plonowska, K.; Kuppusamy, R.; Sturzu, A.; Wu, S. M. Identification of cardiovascular lineage descendants at single-cell resolution. *Development* **2015**, *142*, 846–857.
- [271] Gassanov, N.; Er, F.; Zagidullin, N.; Jankowski, M.; Gutkowska, J.; Hoppe, U. C. Retinoid acid-induced effects on atrial and pacemaker cell differentiation and expression of cardiac ion channels. *Differentiation* **2008**, *76*, 971–980.
- [272] Zhang, Q.; Jiang, J.; Han, P.; Yuan, Q.; Zhang, J.; Zhang, X.; Xu, Y.; Cao, H.; Meng, Q.; Chen, L.; Tian, T.; Wang, X.; Li, P.; Hescheler, J.; Ji, G.; Ma, Y. Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell Res.* **2011**, *21*, 579–587.
- [273] Lescroart, F.; Chabab, S.; Lin, X.; Rulands, S.; Paulissen, C.; Rodolosse, A.; Auer, H.; Achouri, Y.; Dubois, C.; Bondue, A.; Simons, B. D.; Blanpain, C. Early lineage restriction in temporally distinct populations of Mesp1 progenitors during mammalian heart development. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 829–840.
- [274] Devine, W. P.; Wythe, J. D.; George, M.; Koshiba-Takeuchi, K.; Bruneau, B. Early patterning and specification of cardiac progenitors in gastrulating mesoderm. *Elife* **2014**, e03848.
- [275] Schade, D.; Lanier, M.; Willems, E.; Okolotowicz, K.; Bushway, P.; Wahlquist, C.; Gilley, C.; Mercola, M.; Cashman, J. R. Synthesis and SAR of b-annulated 1,4-dihydropyridines define cardiomyogenic compounds as novel inhibitors of TGF $\beta$  signaling. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9946–9957.
- [276] Jonk, L. J. C.; Itoh, S.; Heldin, C.-H.; Dijke, P. ten; Kruijer, W. Identification and Functional Characterization of a Smad Binding Element (SBE) in the JunB Promoter That Acts as a Transforming Growth Factor- $\beta$ , Activin, and Bone Morphogenetic Protein-inducible Enhancer. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 21145–21152.
- [277] Lian, X.; Zhang, J.; Azarin, S. M.; Zhu, K.; Hazeltine, L. B.; Bao, X.; Hsiao, C.; Kamp, T. J.; Palecek, S. P. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* **2013**, *8*, 162–175.
- [278] Nakatake, Y.; Fukui, N.; Iwamatsu, Y.; Masui, S.; Takahashi, K.; Yagi, R.; Yagi, K.; Miyazaki, J.-I.; Matoba, R.; Ko, M. S. H.; Niwa, H. Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 7772–7782.

- [279] Park, K.-S.; Cha, Y.; Kim, C.-H.; Ahn, H.-J.; Kim, D.; Ko, S.; Kim, K.-H.; Chang, M.-Y.; Ko, J.-H.; Noh, Y.-S.; Han, Y.-M.; Kim, J.; Song, J.; Kim, J. Y.; Tesar, P. J.; Lanza, R.; Lee, K.-A.; Kim, K.-S. Transcription elongation factor Tcea3 regulates the pluripotent differentiation potential of mouse embryonic stem cells via the Lefty1-Nodal-Smad2 pathway. *Stem Cells* **2013**, *31*, 282–292.
- [280] Kim, D.-K.; Cha, Y.; Ahn, H.-J.; Kim, G.; Park, K.-S. Lefty1 and lefty2 control the balance between self-renewal and pluripotent differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **2014**, *23*, 457–466.
- [281] Teo, A. K. K.; Ali, Y.; Wong, K. Y.; Chipperfield, H.; Sadasivam, A.; Poobalan, Y.; Tan, E. K.; Wang, S. T.; Abraham, S.; Tsuneyoshi, N.; Stanton, L. W.; Dunn, N. R. Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 631–642.
- [282] Teo, A. K. K.; Arnold, S. J.; Trotter, M. W. B.; Brown, S.; Ang, L. T.; Chng, Z.; Robertson, E. J.; Dunn, N. R.; Vallier, L. Pluripotency factors regulate definitive endoderm specification through eomesodermin. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 238–250.
- [283] Arnold, S. J.; Hofmann, U. K.; Bikoff, E. K.; Robertson, E. J. Pivotal roles for eomesodermin during axis formation, epithelium-to-mesenchyme transition and endoderm specification in the mouse. *Development* **2008**, *135*, 501–511.
- [284] Benz, B. A.; Nandadasa, S.; Takeuchi, M.; Grady, R. C.; Takeuchi, H.; LoPilato, R. K.; Kakuda, S.; Somerville, R. P. T.; Apte, S. S.; Haltiwanger, R. S.; Holdener, B. C. Genetic and biochemical evidence that gastrulation defects in Pofut2 mutants result from defects in ADAMTS9 secretion. *Dev. Biol.* **2016**, *416*, 111–122.
- [285] Apte, S. S. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 31493–31497.
- [286] Kern, C. B.; Twal, W. O.; Mjaatvedt, C. H.; Fairey, S. E.; Toole, B. P.; Iruela-Arispe, M. L.; Argraves, W. S. Proteolytic Cleavage of Versican During Cardiac Cushion Morphogenesis. *Dev. Dyn.* **2006**, *235*, 2238–2247.
- [287] Kern, C. B.; Norris, R. A.; Thompson, R. P.; Argraves, W. S.; Fairey, S. E.; Reyes, L.; Hoffman, S.; Markwald, R. R.; Mjaatvedt, C. H. Versican proteolysis mediates myocardial regression during outflow tract development. *Dev. Dyn.* **2007**, *236*, 671–683.
- [288] Jungers, K. A.; Le Goff, C.; Somerville, R. P. T.; Apte, S. S. Adamts9 is widely expressed during mouse embryo development. *Gene Expr. Patterns* **2005**, *5*, 609–617.
- [289] Enomoto, H.; Nelson, C. M.; Somerville, R. P. T.; Mielke, K.; Dixon, L. J.; Powell, K.; Apte, S. S. Cooperation of two ADAMTS metalloproteases in closure of the mouse palate identifies a requirement for versican proteolysis in regulating palatal mesenchyme proliferation. *Development* **2010**, *137*, 4029–4038.

- [290] Kern, C. B.; Wessels, A.; McGarity, J.; Dixon, L. J.; Alston, E.; Argraves, W. S.; Geeting, D.; Nelson, C. M.; Menick, D. R.; Apte, S. S. Reduced versican cleavage due to Adamts9 haploinsufficiency is associated with cardiac and aortic anomalies. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 304–316.
- [291] Christian, L.; Bahudhanapati, H.; Wei, S. Extracellular metalloproteinases in neural crest development and craniofacial morphogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2013**, *48*, 544–560.
- [292] Koo, B.-H.; Coe, D. M.; Dixon, L. J.; Somerville, R. P. T.; Nelson, C. M.; Wang, L. W.; Young, M. E.; Lindner, D. J.; Apte, S. S. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 1494–1504.
- [293] Martinez-Ceballos, E.; Chambon, P.; Gudas, L. J. Differences in gene expression between wild type and Hoxa1 knockout embryonic stem cells after retinoic acid treatment or leukemia inhibitory factor (LIF) removal. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16484–16498.
- [294] Potter, C. S.; Peterson, R. L.; Barth, J. L.; Pruett, N. D.; Jacobs, D. F.; Kern, M. J.; Argraves, W. S.; Sundberg, J. P.; Awgulewitsch, A. Evidence that the satin hair mutant gene Foxq1 is among multiple and functionally diverse regulatory targets for Hoxc13 during hair follicle differentiation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 29245–29255.
- [295] Zhang, H.; Meng, F.; Liu, G.; Zhang, B.; Zhu, J.; Wu, F.; Ethier, S. P.; Miller, F.; Wu, G. Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1292–1301.
- [296] Feuerborn, A.; Srivastava, P. K.; Küffer, S.; Grandy, W. A.; Sijmonsma, T. P.; Gretz, N.; Brors, B.; Gröne, H.-J. The Forkhead factor FoxQ1 influences epithelial differentiation. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 710–719.
- [297] Mani, S. A.; Yang, J.; Brooks, M.; Schwaninger, G.; Zhou, A.; Miura, N.; Kutok, J. L.; Hartwell, K.; Richardson, A. L.; Weinberg, R. A. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 10069–10074.
- [298] Yeo, H. C.; Ting, S.; Brena, R. M.; Koh, G.; Chen, A.; Toh, S. Q.; Lim, Y. M.; Oh, S. K. W.; Lee, D.-Y. Genome-Wide Transcriptome and Binding Sites Analyses Identify Early FOX Expressions for Enhancing Cardiomyogenesis Efficiency of hESC Cultures. *Sci Rep* **2016**, *6*, 31068.
- [299] Kume, T.; Deng, K.; Hogan, B. L. M. Murine forkhead/winged helix genes Foxc1 (Mf1) and Foxc2 (Mfh1) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* **2000**, *127*, 1387–1395.



- [300] Iida, K.; Koseki, H.; Kakinuma, H.; Kato, N.; Mizutani-Koseki, Y.; Ohuchi, Hidefumi Yoshioka<sup>3</sup>, Sumihare Noji<sup>3</sup>, Koichi Kawamura<sup>4</sup>, Yuki Kataoka<sup>5</sup>, Fukuko Ueno<sup>5</sup>, Masaru Taniguchi<sup>2</sup>, Nobuaki Yoshida<sup>5</sup>, Toshihiro Sugiyama<sup>1</sup> and Naoyuki Miura<sup>1</sup> Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development* **1997**, *124*, 4627–4638.
- [301] Winnier, G. E.; Hargett, L.; Hogan, B. L. M. The winged helix transcription factor MFH1 is required for proliferation and patterning of paraxial mesoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 926–940.
- [302] Kanzaki-Kato, N.; Tamakoshi, T.; Fu, Y.; Chandra, A.; Itakura, T.; Uezato, T.; Tanaka, T.; Clouthier, D. E.; Sugiyama, T.; Yanagisawa, M.; Miura, N. Roles of forkhead transcription factor Foxc2 (MFH-1) and endothelin receptor A in cardiovascular morphogenesis. *Cardiovasc. Res.* **2005**, *65*, 711–718.
- [303] Seo, S. and Kume, T. Forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Dev. Biol.* **2006**, *296*, 421–436.
- [304] Amin, M. B.; Miura, N.; Uddin, M. K. M.; Islam, M. J.; Yoshida, N.; Iseki, S.; Kume, T.; Trainor, P. A.; Saito, H.; Aoto, K. Foxc2(CreERT2) knock-in mice mark stage-specific Foxc2-expressing cells during mouse organogenesis. *Congenit Anom (Kyoto)* **2017**, *57*, 24–31.
- [305] Park, E. J.; Watanabe, Y.; Smyth, G.; Miyagawa-Tomita, S.; Meyers, E.; Klingensmith, J.; Camenisch, T.; Buckingham, M.; Moon, A. M. An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart. *Development* **2008**, *135*, 3599–3610.
- [306] Cai, C.-L.; Martin, J. C.; Sun, Y.; Cui, L.; Wang, L.; Ouyang, K.; Yang, L.; Bu, L.; Liang, X.; Zhang, X.; Stallcup, W. B.; Denton, C. P.; McCulloch, A.; Chen, J.; Evans, S. M. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* **2008**, *454*, 104–108.
- [307] Zhou, B.; Ma, Q.; Rajagopal, S.; Wu, S. M.; Domian, I.; Rivera-Feliciano, J.; Jiang, D.; Giese, A. von; Ikeda, S.; Chien, K. R.; Pu, W. T. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **2008**, *454*, 109–113.
- [308] Battula, V. L.; Evans, K. W.; Hollier, B. G.; Shi, Y.; Marini, F. C.; Ayyanan, A.; Wang, R.-Y.; Brisken, C.; Guerra, R.; Andreeff, M.; Mani, S. A. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2010**, *28*, 1435–1445.
- [309] Vincentz, J. W.; McWhirter, J. R.; Murre, C.; Baldini, A.; Furuta, Y. Fgf15 is required for proper morphogenesis of the mouse cardiac outflow tract. *Genesis* **2005**, *41*, 192–201.

- [310] Kirby, M. L.; Gale, T. F.; Stewart, D. E. Neural Crest Cells Contribute to Normal Aorticopulmonary Septation. *Science* **1983**, *220*, 1059–1061.
- [311] Martinsen, B. J. Reference guide to the stages of chick heart embryology. *Dev. Dyn.* **2005**, *233*, 1217–1237.
- [312] Saitsu, H.; Shiota, K.; Ishibashi, M. Analysis of Fibroblast growth factor 15 cis-elements reveals two conserved enhancers which are closely related to cardiac outflow tract development. *Mech. Dev.* **2006**, *123*, 665–673.
- [313] Fischer, T.; Faus-Kessler, T.; Welzl, G.; Simeone, A.; Wurst, W.; Prakash, N. Fgf15-mediated control of neurogenic and proneural gene expression regulates dorsal midbrain neurogenesis. *Dev. Biol.* **2011**, *350*, 496–510.
- [314] Gaitan, Y. and Bouchard, M. Expression of the delta-protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo. *Gene Expr. Patterns* **2006**, *6*, 893–899.
- [315] Murakami, T.; Hijikata, T.; Matsukawa, M.; Ishikawa, H.; Yorifuji, H. Zebrafish protocadherin 10 is involved in paraxial mesoderm development and somitogenesis. *Dev. Dyn.* **2006**, *235*, 506–514.
- [316] Kuroda, H.; Inui, M.; Sugimoto, K.; Hayata, T.; Asashima, M. Axial protocadherin is a mediator of prenotochord cell sorting in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **2002**, *244*, 267–277.
- [317] Hukriede, N. A.; Tsang, T. E.; Habas, R.; Khoo, P.-L.; Steiner, K.; Weeks, D. L.; Tam, P. P. L.; Dawid, I. B. Conserved Requirement of *Lim1* Function for Cell Movements during Gastrulation. *Dev. Cell* **2003**, *4*, 83–94.
- [318] Wells, A. L.; Lin, A. W.; Chen, L.-Q.; Safer, D.; Cain, S. M.; Hasson, T.; Carragher, B. O.; Milligan, R. A.; Sweeney, H. L. Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* **1999**, *401*, 505–508.
- [319] Hasson, T. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *J. Cell. Sci.* **2003**, *116*, 3453–3461.
- [320] Tumbarello, D. A.; Kendrick-Jones, J.; Buss, F. Myosin VI and its cargo adaptors - linking endocytosis and autophagy. *J. Cell. Sci.* **2013**, *126*, 2561–2570.
- [321] Liu, K. C. and Cheney, R. E. Myosins in cell junctions. *Bioarchitecture* **2012**, *2*, 158–170.
- [322] Tamaki, K.; Kamakura, M.; Nakamichi, N.; Taniura, H.; Yoneda, Y. Upregulation of *Myo6* expression after traumatic stress in mouse hippocampus. *Neurosci. Lett.* **2008**, *433*, 183–187.
- [323] Takarada, T.; Tamaki, K.; Takumi, T.; Ogura, M.; Ito, Y.; Nakamichi, N.; Yoneda, Y. A protein-protein interaction of stress-responsive myosin VI endowed to inhibit neural progenitor self-replication with RNA binding protein, TLS, in murine hippocampus. *J. Neurochem.* **2009**, *110*, 1457–1468.

- [324] Hegan, P. S.; Lanahan, A. A.; Simons, M.; Mooseker, M. S. Myosin VI and cardiomyopathy: Left ventricular hypertrophy, fibrosis, and both cardiac and pulmonary vascular endothelial cell defects in the Snell's waltzer mouse. *Cytoskeleton (Hoboken)* **2015**, *72*, 373–387.
- [325] Burguière, A. C.; Nord, H.; Hofsten, J. von Alkali-like myosin light chain-1 (myl1) is an early marker for differentiating fast muscle cells in zebrafish. *Dev. Dyn.* **2011**, *240*, 1856–1863.
- [326] Kelly, R. G.; Zammit, P. S.; Schneider, A.; Alonso, S.; Biben, C.; Buckingham, M. E. Embryonic and fetal myogenic programs act through separate enhancers at the MLC1F/3F locus. *Dev. Biol.* **1997**, *187*, 183–199.
- [327] Franco, D.; Kelly, R.; Lamers, W. H.; Buckingham, M.; Moorman, A. F. M. Regionalized Transcriptional Domains of Myosin Light Chain 3f Transgenes in the Embryonic Mouse Heart: Morphogenetic Implications. *Dev. Biol.* **1997**, *188*, 17–33.
- [328] Zhi, Y.; Cao, Z.; Li, Q. H.; Li, X. L.; Sun, Y.; Zhang, T.; Zhang, Q. Transcriptional analysis of atrial and ventricular muscles from rats. *Genet. Mol. Res.* **2016**, *15*, gmr.15017330.
- [329] Bisping, E.; Ikeda, S.; Sedej, M.; Wakula, P.; McMullen, J. R.; Tarnavski, O.; Sedej, S.; Izumo, S.; Pu, W. T.; Pieske, B. Transcription factor GATA4 is activated but not required for insulin-like growth factor 1 (IGF1)-induced cardiac hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 9827–9834.
- [330] Rao, M. V.; Donoghue, M. J.; Merlie, J. P.; Sanes, J. R. Distinct regulatory elements control muscle-specific, fiber-type-selective, and axially graded expression of a myosin light-chain gene in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 3909–3922.
- [331] Koning, M.; Werker, P. M. N.; van Luyn, M. J. A.; Harmsen, M. C. Hypoxia promotes proliferation of human myogenic satellite cells: a potential benefactor in tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Eng Part A* **2011**, *17*, 1747–1758.
- [332] Zhang, S.-Z.; Xie, H.-Q.; Xu, Y.; Li, X.-Q.; Wei, R.-Q.; Zhi, W.; Deng, L.; Qiu, L.; Yang, Z.-M. Regulation of cell proliferation by fast Myosin light chain 1 in myoblasts derived from extraocular muscle, diaphragm and gastrocnemius. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **2008**, *233*, 1374–1384.
- [333] Azmi, S.; Ozog, A.; Taneja, R. Sharp-1/DEC2 inhibits skeletal muscle differentiation through repression of myogenic transcription factors. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52643–52652.
- [334] Lecomte, V.; Meugnier, E.; Euthine, V.; Durand, C.; Freyssenet, D.; Nemoz, G.; Rome, S.; Vidal, H.; Lefai, E. A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 1182–1198.

- [335] Sato, F.; Bhawal, U. K.; Kawamoto, T.; Fujimoto, K.; Imaizumi, T.; Imanaka, T.; Kondo, J.; Koyanagi, S.; Noshiro, M.; Yoshida, H.; Kusumi, T.; Kato, Y.; Kijima, H. Basic-helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates vascular endothelial growth factor expression. *Genes Cells* **2008**, *13*, 131–144.
- [336] Suzuki, M.; Sato, F.; Bhawal, U. K. The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor DEC2 negatively regulates Twist1 through an E-box element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *455*, 390–395.
- [337] Acharjee, S.; Chung, T.-K.; Gopinadhan, S.; Shankar, S. R.; Wang, Y.; Li, L.; Vercherat, C.; Gulbagci, N. T.; Rossner, M.; Taneja, R. Sharp-1 regulates TGF- $\beta$  signaling and skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Sci.* **2014**, *127*, 599–608.
- [338] Petrova, D. T.; Brehmer, F.; Schultze, F. C.; Asif, A. R.; Gross, O.; Oellerich, M.; Brandhorst, G. Differential kidney proteome profiling in a murine model of renal fibrosis under treatment with mycophenolate mofetil. *Pathobiology* **2011**, *78*, 162–170.
- [339] Koldehoff, M.; Zakrzewski, J. L.; Klein-Hitpass, L.; Beelen, D. W.; Elmaagacli, A. H. Gene profiling of growth factor independence 1B gene (Gfi-1B) in leukemic cells. *Int. J. Hematol.* **2008**, *87*, 39–47.
- [340] Jura, J.; Wegrzyn, P.; Korostyński, M.; Guzik, K.; Oczko-Wojciechowska, M.; Jarzab, M.; Kowalska, M.; Piechota, M.; Przewłocki, R.; Koj, A. Identification of interleukin-1 and interleukin-6-responsive genes in human monocyte-derived macrophages using microarrays. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1779*, 383–389.
- [341] Ronces, Melissa S., McLaughlin, Kelly A.; Raffin, M.; Mercola, M. Serrate and Notch specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis. *Development* **2000**, *127*, 3865–3876.
- [342] Nemir, M.; Croquelois, A.; Pedrazzini, T.; Radtke, F. Induction of cardiogenesis in embryonic stem cells via downregulation of Notch1 signaling. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1471–1478.
- [343] Reynaud, D.; Ravet, E.; Titeux, M.; Mazurier, F.; Rénia, L.; Dubart-Kupperschmitt, A.; Roméo, P.-H.; Pflumio, F. SCL/TAL1 expression level regulates human hematopoietic stem cell self-renewal and engraftment. *Blood* **2005**, *106*, 2318–2328.
- [344] Gerby, B.; Tremblay, C. S.; Tremblay, M.; Rojas-Sutterlin, S.; Herblot, S.; Hébert, J.; Sauvageau, G.; Lemieux, S.; Lécuyer, E.; Veiga, D. F. T.; Hoang, T. SCL, LMO1 and Notch1 reprogram thymocytes into self-renewing cells. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004768.
- [345] Mandoli, A.; Singh, A. A.; Jansen, P. W. T. C.; Wierenga, A. T. J.; Riahi, H.; Franci, G.; Prange, K.; Saeed, S.; Vellenga, E.; Vermeulen, M.; Stunnenberg, H. G.; Martens, J. H. A. CFBF-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia. *Leukemia* **2014**, *28*, 770–778.

- [346] Kinameri, E.; Inoue, T.; Aruga, J.; Imayoshi, I.; Kageyama, R.; Shimogori, T.; Moore, A. W. Prdm proto-oncogene transcription factor family expression and interaction with the Notch-Hes pathway in mouse neurogenesis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3859.
- [347] Ohtsuka, T.; Ishibashi, M.; Gradwohl, G.; Nakanishi, S.; Guillemot, F.; Kageyama, R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* **1999**, *18*, 2196–2207.
- [348] Davis, C. A.; Haberland, M.; Arnold, M. A.; Sutherland, L. B.; McDonald, O. G.; Richardson, J. A.; Childs, G.; Harris, S.; Owens, G. K.; Olson, E. N. PRISM/PRDM6, a transcriptional repressor that promotes the proliferative gene program in smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 2626–2636.
- [349] Wu, Y.; Ferguson, J. E.; Wang, H.; Kelley, R.; Ren, R.; McDonough, H.; Meeker, J.; Charles, P. C.; Wang, H.; Patterson, C. PRDM6 is enriched in vascular precursors during development and inhibits endothelial cell proliferation, survival, and differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2008**, *44*, 47–58.
- [350] Gewies, A.; Castineiras-Vilarino, M.; Ferch, U.; Jährling, N.; Heinrich, K.; Hoeckendorf, U.; Przemek, G. K. H.; Munding, M.; Groß, O.; Schroeder, T.; Horsch, M.; Karran, E. L.; Majid, A.; Antonowicz, S.; Beckers, J.; Hrabé de Angelis, M.; Dodt, H.-U.; Peschel, C.; Förster, I.; Dyer, M. J. S.; Ruland, J. Prdm6 is essential for cardiovascular development in vivo. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81833.
- [351] Bielenberg, D. R.; Seth, A.; Shimizu, A.; Pelton, K.; Cristofaro, V.; Ramachandran, A.; Zwaans, B. M. M.; Chen, C.; Krishnan, R.; Seth, M.; Huang, L.; Takashima, S.; Klagsbrun, M.; Sullivan, M. P.; Adam, R. M. Increased smooth muscle contractility in mice deficient for neuropilin 2. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 548–559.
- [352] Nakayama, H.; Bruneau, S.; Kochupurakkal, N.; Coma, S.; Briscoe, D. M.; Klagsbrun, M. Regulation of mTOR Signaling by Semaphorin 3F-Neuropilin 2 Interactions In Vitro and In Vivo. *Sci Rep* **2015**, *5*, 11789.
- [353] Bielenberg, D. R.; Hida, Y.; Shimizu, A.; Kaipainen, A.; Kreuter, M.; Kim, C. C.; Klagsbrun, M. Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 1260–1271.
- [354] Kessler, O.; Shraga-Heled, N.; Lange, T.; Gutmann-Raviv, N.; Sabo, E.; Baruch, L.; Machluf, M.; Neufeld, G. Semaphorin-3F Is an Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1008–1015.
- [355] Jin, Z.; Chau, M. D.; Bao, Z.-Z. Sema3D, Sema3F, and Sema5A are expressed in overlapping and distinct patterns in chick embryonic heart. *Dev. Dyn.* **2006**, *235*, 163–169.

- [356] Padang, R.; Bagnall, R. D.; Tsoutsman, T.; Bannon, P. G.; Semsarian, C. Comparative transcriptome profiling in human bicuspid aortic valve disease using RNA sequencing. *Physiol. Genomics* **2015**, *47*, 75–87.
- [357] Schmelzle, T. and Hall, M. N. TOR, a Central Controller of Cell Growth. *Cell* **2000**, *103*, 253–262.
- [358] Sonenberg, N. and Hinnebusch, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: Mechanisms and biological targets. *Cell* **2009**, *136*, 731–745.
- [359] Nicklin, P.; Bergman, P.; Zhang, B.; Triantafellow, E.; Wang, H.; Nyfeler, B.; Yang, H.; Hild, M.; Kung, C.; Wilson, C.; Myer, V. E.; MacKeigan, J. P.; Porter, J. A.; Wang, Y. K.; Cantley, L. C.; Finan, P. M.; Murphy, L. O. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* **2009**, *136*, 521–534.
- [360] Elorza, A.; Soro-Arnáiz, I.; Meléndez-Rodríguez, F.; Rodríguez-Vaello, V.; Marsboom, G.; Cárcer, G. de; Acosta-Iborra, B.; Albacete-Albacete, L.; Ordóñez, A.; Serrano-Oviedo, L.; Giménez-Bachs, J. M.; Vara-Vega, A.; Salinas, A.; Sánchez-Prieto, R.; Martín del Río, R.; Sánchez-Madrid, F.; Malumbres, M.; Landázuri, M. O.; Aragonés, J. HIF2 $\alpha$  acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol. Cell* **2012**, *48*, 681–691.
- [361] Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R. L.; Manning, B. D.; Reiling, J. H.; Hafen, E.; Witters, L. A.; Ellisen, L. W.; Kaelin, W. G. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2893–2904.
- [362] Liu, L.; Cash, T. P.; Jones, R. G.; Keith, B.; Thompson, C. B.; Simon, M. C. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 521–531.
- [363] Boado, R. J.; Li, J. Y.; Nagaya, M.; Zhang, C.; Pardridge, W. M. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 12079–12084.
- [364] Mudge, G. H.; Mills, R. M.; Taegtmeyer, H.; Gorlin, R.; Lesch, M. Alterations of myocardial amino acid metabolism in chronic ischemic heart disease. *J. Clin. Invest.* **1976**, *58*, 1185–1192.
- [365] Dyer, L. A. and Kirby, M. L. The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev. Biol.* **2009**, *336*, 137–144.
- [366] Rochais, F.; Mesbah, K.; Kelly, R. G. Signaling pathways controlling second heart field development. *Circ. Res.* **2009**, *104*, 933–942.
- [367] Ilagan, R.; Abu-Issa, R.; Brown, D.; Yang, Y.-P.; Jiao, K.; Schwartz, R. J.; Klingensmith, J.; Meyers, E. N. Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development* **2006**, *133*, 2435–2445.
- [368] Urness, L. D.; Bleyl, S. B.; Wright, T. J.; Moon, A. M.; Mansour, S. L. Redundant and dosage sensitive requirements for Fgf3 and Fgf10 in cardiovascular development. *Dev. Biol.* **2011**, *356*, 383–397.

- [369] Cohen, E. D.; Wang, Z.; Lepore, J. J.; Lu, M. M.; Taketo, M. M.; Epstein, D. J.; Morrisey, E. E. Wnt/beta-catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1794–1804.
- [370] Klaus, A.; Müller, M.; Schulz, H.; Saga, Y.; Martin, J. F.; Birchmeier, W. Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 10921–10926.
- [371] Francou, A.; Saint-Michel, E.; Mesbah, K.; Théveniau-Ruissy, M.; Rana, M. S.; Christoffels, V. M.; Kelly, R. G. Second heart field cardiac progenitor cells in the early mouse embryo. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 795–798.
- [372] Zaffran, S. and Kelly, R. G. New developments in the second heart field. *Differentiation* **2012**, *84*, 17–24.
- [373] Mesbah, K.; Rana, M. S.; Francou, A.; van Duijvenboden, K.; Papaioannou, V. E.; Moorman, A. F.; Kelly, R. G.; Christoffels, V. M. Identification of a Tbx1/Tbx2/Tbx3 genetic pathway governing pharyngeal and arterial pole morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1217–1229.
- [374] Gavrilov, S.; Harvey, R. P.; Papaioannou, V. E. Lack of genetic interaction between Tbx20 and Tbx3 in early mouse heart development. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70149.
- [375] Bakker, M. L.; Boukens, B. J.; Mommersteeg, M. T. M.; Brons, J. F.; Wakker, V.; Moorman, A. F. M.; Christoffels, V. M. Transcription factor Tbx3 is required for the specification of the atrioventricular conduction system. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 1340–1349.
- [376] Waldo, K. L.; Hutson, M. R.; Stadt, H. A.; Zdanowicz, M.; Zdanowicz, J.; Kirby, M. L. Cardiac neural crest is necessary for normal addition of the myocardium to the arterial pole from the secondary heart field. *Dev. Biol.* **2005**, *281*, 66–77.
- [377] Hoogaars, W. M. H.; Engel, A.; Brons, J. F.; Verkerk, A. O.; Lange, F. J. de; Wong, L. Y. E.; Bakker, M. L.; Clout, D. E.; Wakker, V.; Barnett, P.; Ravesloot, J. H.; Moorman, A. F. M.; Verheijck, E. E.; Christoffels, V. M. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 1098–1112.
- [378] Mommersteeg, M. T. M.; Hoogaars, W. M. H.; Prall, O. W. J.; Gier-de Vries, C. de; Wiese, C.; Clout, D. E. W.; Papaioannou, V. E.; Brown, N. A.; Harvey, R. P.; Moorman, A. F. M.; Christoffels, V. M. Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 354–362.
- [379] Li, Y.; Li, B.; Zhang, C.; Zhang, J.; Zeng, M.; Zheng, Z. Effect of NRG-1/ErbB Signaling Intervention on the Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells Into Sinus Node-like Cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2014**, *63*, 434–440.

- [380] Wang, D.-Z.; Chang, P. S.; Wang, Z.; Sutherland, L.; Richardson, J. A.; Small, E.; Krieg, P. A.; Olson, E. N. Activation of Cardiac Gene Expression by Myocardin, a Transcriptional Cofactor for Serum Response Factor. *Cell* **2001**, *105*, 851–862.
- [381] Li, S.; Wang, D.-Z.; Wang, Z.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 9366–9370.
- [382] Huang, J.; Min Lu, M.; Cheng, L.; Yuan, L.-J.; Zhu, X.; Stout, A. L.; Chen, M.; Li, J.; Parmacek, M. S. Myocardin is required for cardiomyocyte survival and maintenance of heart function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, *106*, 18734–18739.
- [383] Creemers, E. E.; Sutherland, L. B.; McAnally, J.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. Myocardin is a direct transcriptional target of Mef2, Tead and Foxo proteins during cardiovascular development. *Development* **2006**, *133*, 4245–4256.
- [384] Kwon, C.; Qian, L.; Cheng, P.; Nigam, V.; Arnold, J.; Srivastava, D. A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 951–957.
- [385] Protze, S.; Khattak, S.; Poulet, C.; Lindemann, D.; Tanaka, E. M.; Ravens, U. A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2012**, *53*, 323–332.
- [386] Christoforou, N.; Chellappan, M.; Adler, A. F.; Kirkton, R. D.; Wu, T.; Addis, R. C.; Bursac, N.; Leong, K. W. Transcription factors MYOCD, SRF, Mesp1 and SMARCD3 enhance the cardio-inducing effect of GATA4, TBX5, and MEF2C during direct cellular reprogramming. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e63577.
- [387] Christoforou, N.; Chakraborty, S.; Kirkton, R. D.; Adler, A. F.; Addis, R. C.; Leong, K. W. Core Transcription Factors, MicroRNAs, and Small Molecules Drive Transdifferentiation of Human Fibroblasts Towards The Cardiac Cell Lineage. *Sci Rep* **2017**, *7*, 40285.
- [388] Wang, X.; Karamariti, E.; Simpson, R.; Wang, W.; Xu, Q. Dickkopf Homolog 3 Induces Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Lineage via ATF6 Signalling. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 19844–19852.
- [389] Samal, R.; Ameling, S.; Dhople, V.; Sappa, P. K.; Wenzel, K.; Völker, U.; Felix, S. B.; Hammer, E.; Könemann, S. Brain derived neurotrophic factor contributes to the cardiogenic potential of adult resident progenitor cells in failing murine heart. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120360.
- [390] Oh, H.; Bradfute, S. B.; Gallardo, T. D.; Nakamura, T.; Gaussin, V.; Mishina, Y.; Pocius, J.; Michael, L. H.; Behringer, R. R.; Garry, D. J.; Entman, M. L.; Schneider, M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 12313–12318.



- [391] Tamura, K.; Hua, B.; Adachi, S.; Guney, I.; Kawauchi, J.; Morioka, M.; Tamamori-Adachi, M.; Tanaka, Y.; Nakabeppu, Y.; Sunamori, M.; Sedivy, J. M.; Kitajima, S. Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J.* **2005**, *24*, 2590–2601.
- [392] Giraldo, A.; Barrett, O. P. T.; Tindall, M. J.; Fuller, S. J.; Amirak, E.; Bhattacharya, B. S.; Sugden, P. H.; Clerk, A. Feedback regulation by Atf3 in the endothelin-1-responsive transcriptome of cardiomyocytes: Egr1 is a principal Atf3 target. *Biochem. J.* **2012**, *444*, 343–355.
- [393] Aung, H. H.; Lame, M. W.; Gohil, K.; An, C.-I.; Wilson, D. W.; Rutledge, J. C. Induction of ATF3 gene network by triglyceride-rich lipoprotein lipolysis products increases vascular apoptosis and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2088–2096.
- [394] Lu, D.; Chen, J.; Hai, T. The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem. J.* **2007**, *401*, 559–567.
- [395] Yang, C.-J.; Yang, J.; Fan, Z.-X.; Yang, J. Activating transcription factor 3 - an endogenous inhibitor of myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *Mol Med Rep* **2016**, *13*, 9–12.
- [396] Broun, M. J.; Wambolt, R.; Luciani, D. S.; Kulpa, J. E.; Rodrigues, B.; Brownsey, R. W.; Allard, M. F.; Johnson, J. D. Cardiomyocyte ATP production, metabolic flexibility, and survival require calcium flux through cardiac ryanodine receptors in vivo. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18975–18986.
- [397] Ashton, K. J.; Tupicoff, A.; Williams-Pritchard, G.; Kiessling, C. J.; See Hoe, L. E.; Headrick, J. P.; Peart, J. N. Unique transcriptional profile of sustained ligand-activated preconditioning in pre- and post-ischemic myocardium. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72278.
- [398] Hirawa, N.; Uehara, Y.; Yamakado, M.; Toya, Y.; Gomi, T.; Ikeda, T.; Eguchi, Y.; Takagi, M.; Oda, H.; Seiki, K.; Urade, Y.; Umemura, S. Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase in Essential Hypertension. *Hypertension* **2002**, *39*, 449–454.
- [399] Ragolia, L.; Palaia, T.; Paric, E.; Maesaka, J. K. Prostaglandin D2 synthase inhibits the exaggerated growth phenotype of spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22175–22181.
- [400] Liang, J.; Wang, J.; Azfer, A.; Song, W.; Tromp, G.; Kolattukudy, P. E.; Fu, M. A novel CCCH-zinc finger protein family regulates proinflammatory activation of macrophages. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6337–6346.
- [401] Jura, J.; Skalniak, L.; Koj, A. Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCP-1) is a novel multifunctional modulator of inflammatory reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 1905–1913.
- [402] Liang, J.; Saad, Y.; Lei, T.; Wang, J.; Qi, D.; Yang, Q.; Kolattukudy, P. E.; Fu, M. MCP-1-induced protein 1 deubiquitinates TRAF proteins and negatively regulates JNK and NF- $\kappa$ B signaling. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 2959–2973.

- [403] Niu, J.; Jin, Z.; Kim, H.; Kolattukudy, P. E. MCP-1-induced protein attenuates post-infarct cardiac remodeling and dysfunction through mitigating NF- $\kappa$ B activation and suppressing inflammation-associated microRNA expression. *Basic Res. Cardiol.* **2015**, *110*, 26.
- [404] Zhou, L.; Azfer, A.; Niu, J.; Graham, S.; Choudhury, M.; Adamski, F. M.; Younce, C.; Binkley, P. F.; Kolattukudy, P. E. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ. Res.* **2006**, *98*, 1177–1185.
- [405] Niu, J.; Azfer, A.; Zhelyabovska, O.; Fatma, S.; Kolattukudy, P. E. Monocyte chemotactic protein (MCP)-1 promotes angiogenesis via a novel transcription factor, MCP-1-induced protein (MCPIP). *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14542–14551.
- [406] Labeledz-Maslowska, A.; Lipert, B.; Berdecka, D.; Kedracka-Krok, S.; Jankowska, U.; Kamycka, E.; Sekula, M.; Madeja, Z.; Dawn, B.; Jura, J.; Zuba-Surma, E. K. Monocyte Chemoattractant Protein-Induced Protein 1 (MCPIP1) Enhances Angiogenic and Cardiomyogenic Potential of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0133746.
- [407] Laity, J. H.; Lee, B. M.; Wright, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2001**, *11*, 39–46.
- [408] Clarke, E.; Rahman, N.; Page, N.; Rolph, M. S.; Stewart, G. J.; Jones, G. J. Functional characterization of the atopy-associated gene PHF11. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2008**, *121*, 1148-1154.e3.
- [409] Cynis, H.; Hoffmann, T.; Friedrich, D.; Kehlen, A.; Gans, K.; Kleinschmidt, M.; Rahfeld, J.-U.; Wolf, R.; Wermann, M.; Stephan, A.; Haegele, M.; Sedlmeier, R.; Graubner, S.; Jagla, W.; Müller, A.; Eichertopf, R.; Heiser, U.; Seifert, F.; Quax, P. H. A.; Vries, M. R. de; Hesse, I.; Trautwein, D.; Wollert, U.; Berg, S.; Freyse, E.-J.; Schilling, S.; Demuth, H.-U. The isoenzyme of glutaminyl cyclase is an important regulator of monocyte infiltration under inflammatory conditions. *EMBO Mol Med* **2011**, *3*, 545–558.
- [410] Volkmer, H.; Hassel, B.; Wolff, J. M.; Frank, R.; Rathjen, F. G. Structure of the Axonal Surface Recognition Molecule Neurofascin and Its Relationship to a Neural Subgroup of the Immunoglobulin Superfamily. *J. Cell Biol.* **1992**, *118*, 149–161.
- [411] Kirschbaum, K.; Kriebel, M.; Kranz, E. U.; Pötz, O.; Volkmer, H. Analysis of non-canonical fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) interaction reveals regulatory and activating domains of neurofascin. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28533–28542.
- [412] Rodríguez-Manzaneque, J. C.; Westling, J.; Thai, S. N.-M.; Luque, A.; Knauper, V.; Murphy, G.; Sandy, J. D.; Iruela-Arispe, M.L. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 501–508.

- [413] Zhao, D.; McCaffery, P.; Ivins, K. J.; Neve, R. L.; Hogan, P.; Chin, W. W.; Dräger, U. C. Molecular Identification of a Major Retinoic-Acid-Synthesizing Enzyme, a Retinaldehyde-Specific Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 15–22.
- [414] Niederreither, K.; McCaffery, P.; Dräger, U. C.; Chambon, P.; Dollé, P. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech. Dev.* **1997**, *62*, 67–78.
- [415] Moss, J. B.; Xavier-Neto, J.; Shapiro, M. D.; Nayeem, S. M.; McCaffery, P.; Dräger, U. C.; Rosenthal, N. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev. Biol.* **1998**, *199*, 55–71.
- [416] Xavier-Neto, J.; Neville, C. M.; Shapiro, M. D.; Houghton, L.; Wang, G. F.; Nikovits Jr, W.; Stockdale, F. E.; Rosenthal, N. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development* **1999**, *126*, 2677–2687.
- [417] Ross, S. A.; McCaffery, P. J.; Dräger, U. C.; Luca, L. M. de Retinoids in Embryonal Development. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 1021–1054.
- [418] Rosenthal, N. and Xavier-Neto, J. From the bottom of the heart: Anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 742–746.
- [419] Protze, S. I.; Liu, J.; Nussinovitch, U.; Ohana, L.; Backx, P. H.; Gepstein, L.; Keller, G. M. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 56–68.
- [420] Wobus, A. M.; Kaomei, G.; Shan, J.; Wellner, M.-C.; Rohwedel, J.; Guanju, J.; Fleischmann, B.; Katus, H. A.; Hescheler, J.; Franz, W.-M. Retinoic Acid Accelerates Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Differentiation and Enhances Development of Ventricular Cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1997**, *29*, 1525–1539.
- [421] Bilbija, D.; Haugen, F.; Sagave, J.; Baysa, A.; Bastani, N.; Levy, F. O.; Sirsjö, A.; Blomhoff, R.; Valen, G. Retinoic acid signalling is activated in the postischemic heart and may influence remodelling. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44740.
- [422] Yano, H.; Ninan, I.; Zhang, H.; Milner, T. A.; Arancio, O.; Chao, M. V. BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex. *Nat. Neurosci.* **2006**, *9*, 1009–1018.
- [423] Kim, H.; Li, Q.; Hempstead, B. L.; Madri, J. A. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33538–33546.
- [424] Chen, B.-Y.; Wang, X.; Wang, Z.-Y.; Wang, Y.-Z.; Chen, L.-W.; Luo, Z.-J. Brain-derived neurotrophic factor stimulates proliferation and differentiation of neural stem cells, possibly by triggering the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* **2013**, *91*, 30–41.

- [425] Caporali, A. and Emanuelli, C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiol. Rev.* **2009**, *89*, 279–308.
- [426] Pius-Sadowska, E. and Machaliński, B. BDNF - A key player in cardiovascular system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *110*, 54–60.
- [427] Lorgis, L.; Amoureux, S.; Maistre, E. de; Sicard, P.; Bejot, Y.; Zeller, M.; Vergely, C.; Sequeira-Le Grand, A.; Lagrost, A.-C.; Berchoud, J.; Cottin, Y.; Rochette, L. Serum brain-derived neurotrophic factor and platelet activation evaluated by soluble P-selectin and soluble CD-40-ligand in patients with acute myocardial infarction. *Fundam Clin Pharmacol* **2010**, *24*, 525–530.
- [428] Jiang, H.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Chen, Z.-Y. Association of plasma brain-derived neurotrophic factor and cardiovascular risk factors and prognosis in angina pectoris. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *415*, 99–103.
- [429] Kaess, B. M.; Preis, S. R.; Lieb, W.; Beiser, A. S.; Yang, Q.; Chen, T. C.; Hengstenberg, C.; Erdmann, J.; Schunkert, H.; Seshadri, S.; Vasan, R. S.; Assimes, T. L.; Deloukas, P.; Holm, H.; Kathiresan, S.; König, I. R.; McPherson, R.; Reilly, M. P.; Roberts, R.; Samani, N. J.; Stewart, A. F. R. Circulating brain-derived neurotrophic factor concentrations and the risk of cardiovascular disease in the community. *J Am Heart Assoc* **2015**, *4*, e001544.
- [430] Takashio, S.; Sugiyama, S.; Yamamuro, M.; Takahama, H.; Hayashi, T.; Sugano, Y.; Izumiya, Y.; Hokimoto, S.; Minamino, N.; Yasuda, S.; Anzai, T.; Ogawa, H. Significance of low plasma levels of brain-derived neurotrophic factor in patients with heart failure. *Am. J. Cardiol.* **2015**, *116*, 243–249.
- [431] Hang, P.; Zhao, J.; Cai, B.; Tian, S.; Huang, W.; Guo, J.; Sun, C.; Li, Y.; Du, Z. Brain-derived neurotrophic factor regulates TRPC3/6 channels and protects against myocardial infarction in rodents. *Int. J. Biol. Sci.* **2015**, *11*, 536–545.
- [432] Kermani, P.; Rafii, D.; Jin, D. K.; Whitlock, P.; Schaffer, W.; Chiang, A.; Vincent, L.; Friedrich, M.; Shido, K.; Hackett, N. R.; Crystal, R. G.; Rafii, S.; Hempstead, B. L. Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB+ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 653–663.
- [433] Cheng, M.; Wu, G.; Song, Y.; Wang, L.; Tu, L.; Zhang, L.; Zhang, C. Celastrol-Induced Suppression of the MiR-21/ERK Signalling Pathway Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction. *Cell. Physiol. Biochem.* **2016**, *38*, 1928–1938.
- [434] Meng, F.; Henson, R.; Wehbe-Janek, H.; Ghoshal, K.; Jacob, S. T.; Patel, T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 647–658.
- [435] Sayed, D.; He, M.; Hong, C.; Gao, S.; Rane, S.; Yang, Z.; Abdellatif, M. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20281–20290.
- [436] Wang, G.; Wang, J. J.; Tang, H. M.; To, S. S. T. Targeting strategies on miRNA-21 and PDCD4 for glioblastoma. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *580*, 64–74.

- [437] van Rooij, E.; Sutherland, L. B.; Liu, N.; Williams, A. H.; McAnally, J.; Gerard, R. D.; Richardson, J. A.; Olson, E. N. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 18255–18260.
- [438] Tatsuguchi, M.; Seok, H. Y.; Callis, T. E.; Thomson, J. M.; Chen, J.-F.; Newman, M.; Rojas, M.; Hammond, S. M.; Wang, D.-Z. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2007**, *42*, 1137–1141.
- [439] Li, P. MicroRNAs in cardiac apoptosis. *J Cardiovasc Transl Res* **2010**, *3*, 219–224.
- [440] Thum, T.; Gross, C.; Fiedler, J.; Fischer, T.; Kissler, S.; Bussen, M.; Galuppo, P.; Just, S.; Rottbauer, W.; Frantz, S.; Castoldi, M.; Soutschek, J.; Koteliansky, V.; Rosenwald, A.; Basson, M. A.; Licht, J. D.; Pena, J. T. R.; Rouhanifard, S. H.; Muckenthaler, M. U.; Tuschl, T.; Martin, G. R.; Bauersachs, J.; Engelhardt, S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* **2008**, *456*, 980–984.
- [441] Salloum, F. N.; Yin, C.; Kukreja, R. C. Role of microRNAs in cardiac preconditioning. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2010**, *56*, 581–588.
- [442] Zeng, Y.-L.; Zheng, H.; Chen, Q.-R.; Yuan, X.-H.; Ren, J.-H.; Luo, X.-F.; Chen, P.; Lin, Z.-Y.; Chen, S.-Z.; Wu, X.-Q.; Xiao, M.; Chen, Y.-Q.; Chen, Z.-Z.; Hu, J.-D.; Yang, T. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing MiR-21 efficiently repair myocardial damage in rats. *Oncotarget* **2017**, *8*, 29161–29173.
- [443] Zhou, Q.; Sun, Q.; Zhang, Y.; Teng, F.; Sun, J. Up-Regulation of miRNA-21 Expression Promotes Migration and Proliferation of Sca-1+ Cardiac Stem Cells in Mice. *Med. Sci. Monit.* **2016**, *22*, 1724–1732.
- [444] Shi, B.; Deng, W.; Long, X.; Zhao, R.; Wang, Y.; Chen, W.; Xu, G.; Sheng, J.; Wang, D.; Cao, S. miR-21 increases c-kit(+) cardiac stem cell proliferation in vitro through PTEN/PI3K/Akt signaling. *PeerJ* **2017**, *5*, e2859.
- [445] Campagnolo, P.; Hong, X.; Di Bernardini, E.; Smyrniak, I.; Hu, Y.; Xu, Q. Resveratrol-Induced Vascular Progenitor Differentiation towards Endothelial Lineage via MiR-21/Akt/ $\beta$ -Catenin Is Protective in Vessel Graft Models. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125122.
- [446] Meganathan, K.; Sotiriadou, I.; Natarajan, K.; Hescheler, J.; Sachinidis, A. Signaling molecules, transcription growth factors and other regulators revealed from in-vivo and in-vitro models for the regulation of cardiac development. *Int. J. Cardiol.* **2015**, *183*, 117–128.
- [447] Itoh, N.; Ohta, H.; Nakayama, Y.; Konishi, M. Roles of FGF Signals in Heart Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 110.

- [448] Virag, J. A. I.; Rolle, M. L.; Reece, J.; Hardouin, S.; Feigl, E. O.; Murry, C. E. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair. *Am. J. Pathol.* **2007**, *171*, 1431–1440.
- [449] House, S. L.; Wang, J.; Castro, A. M.; Weinheimer, C.; Kovacs, A.; Ornitz, D. M. Fibroblast growth factor 2 is an essential cardioprotective factor in a closed-chest model of cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rep* **2015**, *3*, e12278.
- [450] Wang, Z.-G.; Wang, Y.; Huang, Y.; Lu, Q.; Zheng, L.; Hu, D.; Feng, W.-K.; Liu, Y.-L.; Ji, K.-T.; Zhang, H.-Y.; Fu, X.-B.; Li, X.-K.; Chu, M.-P.; Xiao, J. bFGF regulates autophagy and ubiquitinated protein accumulation induced by myocardial ischemia/reperfusion via the activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Sci Rep* **2015**, *5*, 9287.
- [451] Wang, Z.; Wang, Y.; Ye, J.; Lu, X.; Cheng, Y.; Xiang, L.; Chen, L.; Feng, W.; Shi, H.; Yu, X.; Lin, L.; Zhang, H.; Xiao, J.; Li, X. bFGF attenuates endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury on myocardial ischaemia/reperfusion via activation of PI3K/Akt/ERK1/2 pathway. *J. Cell. Mol. Med.* **2015**, *19*, 595–607.
- [452] Svystonyuk, D. A.; Ngu, J. M. C.; Mewhort, H. E. M.; Lipon, B. D.; Teng, G.; Guzzardi, D. G.; Malik, G.; Belke, D. D.; Fedak, P. W. M. Fibroblast growth factor-2 regulates human cardiac myofibroblast-mediated extracellular matrix remodeling. *J Transl Med* **2015**, *13*, 147.
- [453] Wang, Q.; Oka, T.; Yamagami, K.; Lee, J.-K.; Akazawa, H.; Naito, A. T.; Yasui, T.; Ishizu, T.; Nakaoka, Y.; Sakata, Y.; Komuro, I. An EP4 Receptor Agonist Inhibits Cardiac Fibrosis Through Activation of PKA Signaling in Hypertrophied Heart. *Int Heart J* **2017**, *58*, 107–114.
- [454] Row, S.; Liu, Y.; Alimperti, S.; Agarwal, S. K.; Andreadis, S. T. Cadherin-11 is a novel regulator of extracellular matrix synthesis and tissue mechanics. *J. Cell. Sci.* **2016**, *129*, 2950–2961.
- [455] Beetz, N.; Rommel, C.; Schnick, T.; Neumann, E.; Lothar, A.; Monroy-Ordóñez, E. B.; Zeeb, M.; Preissl, S.; Gilsbach, R.; Melchior-Becker, A.; Rylski, B.; Stoll, M.; Schaefer, L.; Beyersdorf, F.; Stiller, B.; Hein, L. Ablation of biglycan attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis after left ventricular pressure overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *101*, 145–155.
- [456] Yao, Y.; Lu, Q.; Hu, Z.; Yu, Y.; Chen, Q.; Wang, Q. K. A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nat Commun* **2017**, *8*, 133.
- [457] Wellner, U.; Schubert, J.; Burk, U. C.; Schmalhofer, O.; Zhu, F.; Sonntag, A.; Waldvogel, B.; Vannier, C.; Darling, D.; Zur Hausen, A.; Brunton, V. G.; Morton, J.; Sansom, O.; Schüler, J.; Stemmler, M. P.; Herzberger, C.; Hopt, U.; Keck, T.; Brabletz, S.; Brabletz, T. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **2009**, *11*, 1487–1495.

- [458] Noberini, R.; Mitra, S.; Salvucci, O.; Valencia, F.; Duggineni, S.; Prigozhina, N.; Wei, K.; Tosato, G.; Huang, Z.; Pasquale, E. B. PEGylation potentiates the effectiveness of an antagonistic peptide that targets the EphB4 receptor with nanomolar affinity. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e28611.
- [459] Wang, H. U.; Chen, Z.-F.; Anderson, D. J. Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4. *Cell* **1998**, *93*, 741–753.
- [460] Adams, R. H.; Wilkinson, G. A.; Weiss, C.; Diella, F.; Gale, N. W.; Deutsch, U.; Risau, W.; Klein, R. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* **1999**, *1*, 295–306.
- [461] Gerety, S. S.; Wang, H. U.; Chen, Z.-F.; Anderson, D. J. Symmetrical Mutant Phenotypes of the Receptor EphB4 and Its Specific Transmembrane Ligand ephrin-B2 in Cardiovascular Development. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 403–414.
- [462] Wang, Y.; Thorin, E.; Luo, H.; Tremblay, J.; Lavoie, J. L.; Wu, Z.; Peng, J.; Qi, S.; Wu, J. EPHB4 Protein Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Regulates Their Contractility, and EPHB4 Deletion Leads to Hypotension in Mice. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 14235–14244.
- [463] Ishii, M.; Mueller, I.; Nakajima, T.; Pasquale, E. B.; Ogawa, K. EphB signaling inhibits gap junctional intercellular communication and synchronized contraction in cultured cardiomyocytes. *Basic Res. Cardiol.* **2011**, *106*, 1057–1068.
- [464] Steinle, J. J.; Meininger, C. J.; Forough, R.; Wu, G.; Wu, M. H.; Granger, H. J. Eph B4 receptor signaling mediates endothelial cell migration and proliferation via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 43830–43835.
- [465] Steinle, J. J.; Meininger, C. J.; Chowdhury, U.; Wu, G.; Granger, H. J. Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cell. Signal.* **2003**, *15*, 1011–1017.
- [466] Månsson-Broberg, A.; Siddiqui, A. J.; Genander, M.; Grinnemo, K.-H.; Hao, X.; Andersson, A. B.; Wårdell, E.; Sylvén, C.; Corbascio, M. Modulation of ephrinB2 leads to increased angiogenesis in ischemic myocardium and endothelial cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 355–359.
- [467] Du Yang; Jin, C.; Hong, M.; Huang, M.; Shi, G.-P.; Wang, J.; Xiang, M. EphrinB2/EphB4 pathway in postnatal angiogenesis: a potential therapeutic target for ischemic cardiovascular disease. *Angiogenesis* **2016**, *19*, 297–309.
- [468] Wang, Z.; Cohen, K.; Shao, Y.; Mole, P.; Dombkowski, D.; Scadden, D. T. Ephrin receptor, EphB4, regulates ES cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes, and blood vessels. *Blood* **2004**, *103*, 100–109.

- [469] Telang, S.; Clem, A. L.; Eaton, J. W.; Chesney, J. Depletion of Ascorbic Acid Restricts Angiogenesis and Retards Tumor Growth in a Mouse Model. *Neoplasia* **2007**, *9*, 47–56.
- [470] Chen, K.; Bai, H.; Arzigian, M.; Gao, Y.-X.; Bao, J.; Wu, W.-S.; Shen, W.-F.; Wu, L.; Wang, Z. Z. Endothelial cells regulate cardiomyocyte development from embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *111*, 29–39.
- [471] Chen, K.; Bai, H.; Liu, Y.; Hoyle, D. L.; Shen, W.-F.; Wu, L.-Q.; Wang, Z. Z. EphB4 forward-signaling regulates cardiac progenitor development in mouse ES cells. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 467–475.
- [472] Blancas, A. A.; Shih, A. J.; Lauer, N. E.; McCloskey, K. E. Endothelial cells from embryonic stem cells in a chemically defined medium. *Stem Cells Dev.* **2011**, *20*, 2153–2161.
- [473] Bradfute, S. B.; Graubert, T. A.; Goodell, M. A. Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function. *Exp. Hematol.* **2005**, *33*, 836–843.



## 11. Anhang

### 11.1. p38 MAP-Kinase-Inhibitoren

**Tab. 3:** p38 MAP-Kinase-Inhibitoren (Prof. Dr. Stefan Laufer, Tübingen)

Bezeichnung	IC <sub>50</sub> Enzym	IC <sub>50</sub> Vollblut	Besonderheiten
<b>AD599/LN1137</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,339 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 1,073 μm	Type 1 p38α, Benzosuberone
<b>AD696/LN1211</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0026 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 1,809 μm	Type 2 p38α, Dibenzosuberone mit BIRB796 Rest
<b>BB400/LN1287</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,021 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,429 μm	Type 1 p38α, Dibenzosuberone
<b>BB594/LN1480</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0017 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,148 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>BIRB796</b>			Type 2
<b>FMu-001-231</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,085 μm IC <sub>50</sub> (JNK3) = 0,05 μm	n.d.	Dualer Inhibitor p38α/JNK3
<b>FMu-001-234</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,299 μm IC <sub>50</sub> (JNK3) = 0,172 μm	n.d.	Faktor 2 selektiv für p38α gegenüber JNK3
<b>FMu-001-249</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,153 μm IC <sub>50</sub> (JNK3) = 0,137 μm	n.d.	Dualer Inhibitor p38α/JNK3
<b>FMu-001-250</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,048 μm IC <sub>50</sub> (JNK3) = 0,226 μm	n.d.	Faktor 5 selektiv für JNK3 gegenüber p38α
<b>FS198/LN1292</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,26 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS198/LN1292</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,26 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS199/LN1291</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,002 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 2,4 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS199/LN1291</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,002 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 2,4 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS365/LN1354</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,003 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,029 μm	Type 1 p38α, Dibenzosuberone
<b>FS490/LN1386</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,004 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,07 μm	Type 1 p38α, Dibenzosuberone
<b>FS623/LN1495</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,032 μm	Selektivitätsdaten, Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS623/LN1495</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,032 μm	Selektivitätsdaten, Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS694/LN1639</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0002 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,031 μm	Selektivitätsdaten, Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>FS694/LN1639</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0002 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,031 μm	Selektivitätsdaten, Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>HW004/LN1494</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,002 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,029 μm	Type 1 p38α, Selektivitätsdaten
<b>HW141/LN2015</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,005 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,268 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>HW201/LN2183</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,021 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone
<b>HW225/LN2263</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0006 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,038 μm	Type I <sup>1</sup> / <sub>2</sub> p38α, Dibenzosuberone

Bezeichnung	IC <sub>50</sub> Enzym	IC <sub>50</sub> Vollblut	Besonderheiten
<b>HW239/LN2260</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,005 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,079 μm	Type I½ p38α, Dibenzosuberone
<b>HW247/LN2282</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,004 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,013 μm	Type I½ p38α, Dibenzosuberone
<b>KM048/LN1203</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,035 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 36 μm	Type I½ p38α, Benzosuberone
<b>KM064/LN1206</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,004 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 15 μm	Type 2, p38α Benzosuberone mit BIRB796 Rest
<b>LN941/PK02070</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,015 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,183 μm	Tear drop binder p38α
<b>ML3403/RN2711</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,04 μm	4330 nM	Tear drop binder p38α
<b>MO413/LN1029</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 1,56 μm IC <sub>50</sub> (CDK1d) = low μM range		CdK1d Hemmung
<b>MO421/LN1030</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,89 μm IC <sub>50</sub> (CDK1d) = low μM range		CdK1d Hemmung
<b>NW140/ LN2000</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,023 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,259 μm	Type 1 p38α, Dibenzooxepinone
<b>NW211/LN2128</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,03 μm	Type I½ p38α, Dibenzooxepinone, beste Inhibitorische Aktivität der Oxepinone im Vollblut der Typ I½
<b>NW252/LN2137</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,021 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,046 μm	Type 1 p38α, Dibenzooxepinone, beste Inhibitorische Aktivität der Oxepinone im Vollblut der Typ I
<b>NW274/ LN2146</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,004 μm	n.d.	Type 1 p38α, Dibenzooxepinone
<b>NW275/ LN2160</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,015 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,069 μm	Type 1 p38α, Dibenzooxepinone
<b>NW281/ LN2162</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,0013 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,158 μm	Type I½ p38α, Dibenzooxepinone
<b>NW305/ LN2202</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,001 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,322 μm	Type I½ p38α, Dibenzooxepinone
<b>SK510/LN799</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,02 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 6,1 μm	Type 1 p38α, Dibenzosuberone
<b>SK539/LN801</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 2,53 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 52,6 μm	Type 1 p38α, Dibenzosuberone
<b>Skep-L (SK694), LN807</b>	IC <sub>50</sub> (p38α) = 0,02 μm	IC <sub>50</sub> (TNFα) = 0,04 μm	Selektivitätsdaten, Type 1 p38α, Dibenzosuberone

## 11.2. Genexpressionsdaten (Transkriptomanalyse)

**Tab. 4:** Ausgewählte Expressionsprofile nach 6- u. 24-stündiger Exposition mit WS<sup>®</sup>1442 und dem Methanol Eluat

	Gen	Accession	<i>log<sub>2</sub> fold change</i> (6 h) WS <sup>®</sup> 1442	<i>log<sub>2</sub> fold change</i> (6 h) MeOH Eluat	<i>log<sub>2</sub> fold change</i> (24 h) WS <sup>®</sup> 1442	<i>log<sub>2</sub> fold change</i> (24 h) MeOH Eluat
FHF/SHF	Mesp1	NM_008588.2	0,16	0,14	- 0,68	- 0,49
	Isl1	NM_021459.4	0,41	0,54	0,35	- 0,58
	Nkx2.5	NM_008700.2	- 0,23	- 0,14	- 0,17	- 0,34
	Mef2c	NM_001170537.1	0,10	0,14	0,50	0,16
	Hand1	NM_008213.2	- 0,05	0,43	0,23	0,05
	Hand2	NM_010402.4	0,08	- 0,01	- 0,49	- 0,70
	Hcn4	NM_001081192.1	- 0,20	- 0,03	0,20	0,10
	Tbx1	NM_001285472.1	- 0,08	0,06	- 0,08	0,02
	Tbx5	NM_011537.3	- 0,56	- 0,81	0,03	- 0,21
	Fgf3	NM_008007.2	0,55	0,54	- 1,30	- 1,61
	Fgf8	NM_001166361.1	- 0,19	- 0,54	- 0,11	- 0,01
	Fgf10	NM_008002.4	- 0,26	- 1,22	- 0,11	- 1,21
	Wnt5a	NM_001256224.1	- 0,26	- 0,89	- 0,86	- 0,69
	Wnt11	NM_001285792.1	- 0,37	- 0,55	- 0,22	- 0,66
Tbox	T	NM_009309.2	- 0,28	- 1,22	- 0,18	- 0,05
	Eomes	NM_001164789.1	- 0,38	- 0,85	- 0,21	- 0,77
	Tbx1	NM_001285472.1	- 0,08	0,06	- 0,08	0,02
	Tbx2	NM_009324.2	- 0,71	- 1,34	- 1,62	- 2,39
	Tbx3	NM_011535.3	- 0,04	- 0,57	- 1,04	- 1,67
	Tbx5	NM_011537.3	- 0,56	- 0,81	0,03	- 0,21
	Tbx18	NM_023814.4	0,02	0,29	0,01	0,04
	Tbx20	NM_001205085.1	0,21	0,05	- 0,14	- 0,52
Fgf	Fgf3	NM_008007.2	0,55	0,54	- 1,30	- 1,61
	Fgf8	NM_00116636	- 0,19	- 0,54	- 0,11	- 0,01
	Fgf10	NM_008002.4	- 0,26	- 1,22	- 0,11	- 1,21
	Fgf15	NM_008003.2	1,02	1,30	- 0,13	- 0,33
	Fgf16	NM_030614.2	0,26	0,69	- 0,05	- 0,62
	Fgf20	NM_030610.2	- 0,06	0,32	0,23	0,08
Fox	Foxc1	NM_008592.2	0,99	1,50	0,83	0,79
	Foxc2	NM_013519.2	1,82	3,10	0,82	1,50
	Foxd1	NM_008242.2	1,46	1,55	- 0,54	- 0,18
	Foxf1	NM_010426.2	1,18	1,25	- 0,81	- 0,42
	Foxh1	NM_007989.4	- 0,30	- 0,23	0,28	0,01
	Foxo4	NM_018789.2	- 0,10	- 0,29	- 0,24	- 0,13
	Foxq1	NM_008239.2	- 1,14	- 1,87	- 0,74	- 0,91
Hox	Hoxa1	NM_010449.4	0,42	- 0,72	0,08	0,05
	Hoxa3	NM_010452.3	- 0,21	- 0,62	0,29	0,18
	Hoxa13	NM_008264.1	0,06	0,12	- 0,43	- 0,35
	Hoxb1	NM_008266.5	- 0,09	0,16	0,41	0,21

	Gen	Accession	<i>log2 fold change (6 h)</i> WS®1442	<i>log2 fold change (6 h)</i> MeOH Eluat	<i>log2 fold change (24 h)</i> WS®1442	<i>log2 fold change (24 h)</i> MeOH Eluat
Notch	Notch1	NM_008714.3	0,63	0,61	0,04	0,24
	Hey1	NM_010423.2	- 0,60	- 0,90	- 0,57	- 1,20
	Hey2	NM_013904.1	- 0,49	- 0,27	- 1,18	- 1,40
	Hes1	NM_008235.2	- 0,08	- 0,36	- 0,27	- 0,35
	Hes5	NM_010419.4	- 0,24	- 1,22	- 0,51	- 0,49
	Myc	NM_001177352.1	- 0,13	- 0,38	- 0,57	- 1,03
Hh	Gli1	NM_010296.2	0,06	0,32	0,18	0,06
	Ptch1 (v x3)	XM_006517159.1	0,26	0,02	- 0,58	- 0,71
	Smo	NM_176996.4	0,13	0,02	- 0,12	- 0,09
Wnt	Wnt2a	NM_023653.5	- 0,17	- 0,02	- 0,17	- 0,02
	Wnt3	NM_009521.2	- 0,41	- 0,91	- 0,47	- 0,55
	Wnt5a	NM_001256224.1	- 0,86	- 0,69	- 0,86	- 0,69
	Wnt9a	NM_139298.2	- 0,10	0,14	- 0,10	- 0,14
	Wnt11	NM_001285792.1	- 0,22	- 0,66	- 0,22	- 0,66
EMT	Twist	NM_011658.2	0,33	0,87	0,35	0,49
	Zeb1	NM_011546.3	- 1,71	- 0,12	0,09	- 0,17
	Ets1	NM_001038642.1	0,41	0,75	0,01	- 0,08
Sema	Sema3c	NM_013657.5	0,73	1,43	0,22	0,89
	Sema3d	NM_028882.4	0,05	- 0,03	- 0,23	0,93
	Sema3f	NM_011349.3	- 1,07	- 1,70	- 0,48	- 1,18
	Sema5a	NM_009154.2	0,03	- 0,36	0,05	- 0,18
Cdh	Cdh5	NM_009868.4	1,13	- 0,41	- 0,81	- 2,08
	Cdh12	NM_001008420.2	- 1,02	- 0,91	0,05	0,00
	Cdh19	NM_001081386.1	0,17	0,31	- 0,61	- 0,54
Angi	Angpt1	NM_001286062.1	0,49	- 0,02	- 0,46	- 0,45
	Eng	NM_001146348.1	0,10	0,01	- 0,13	- 0,26
	Gata2	NM_008090.5	- 0,20	- 0,01	0,36	- 0,02
	Vwf	NM_009868.4	1,13	- 0,41	- 0,81	- 2,08
Sonstige	Shh	NM_009170.3	- 0,59	- 0,63	- 0,29	- 0,06
	Mixl1	NM_013729.3	- 1,00	- 2,31	- 0,47	- 1,23
	MyoD	NM_010866.2	- 0,44	- 0,25	0,45	0,14
	Kdr	NM_010612.2	- 0,06	0,08	- 0,03	- 0,15
	Sca1	NM_001199304.1	0,51	0,57	0,85	0,96
	c-kit	NM_001122733.1	- 0,19	- 0,20	0,42	0,42
	BDNF	NM_001048139.1	0,04	0,25	0,56	0,94
	Nrg1	NM_178591.2	0,08	0,51	0,71	0,72
	Nrg2	NM_001167891.1	- 0,08	0,38	0,25	0,20
	Srf	NM_020493.2	- 0,01	0,29	0,51	0,34
	Gata6	NM_010258.3	- 0,59	- 1,70	- 0,35	- 1,52
	Smyd1	NM_001160127.1	0,41	0,23	0,41	0,35
	Smad6	NM_008542.3	- 0,11	0,10	- 0,10	- 0,63
	Hif1a	NM_010431.2	0,09	- 0,07	- 0,01	0,02
	Hif2a	NM_010137.3	- 0,12	0,09	0,25	- 0,03

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dennis Schade für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die vertrauensvolle Übergabe des sehr interessanten Forschungsthemas bedanken, welches mir während meiner Promotionszeit die Anwendung einer großen Anzahl verschiedenster wissenschaftlicher Methoden ermöglichte und mich immer wieder forderte. Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Daniel Rauh für die Übernahme des Koreferats sowie die Möglichkeit Ressourcen seines Arbeitskreises nutzen zu dürfen bedanken.

Ebenso gilt mein großer Dank der Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG und hierbei insbesondere Dr. Egon Koch und Dr. Clemens Erdelmeier, die meine Forschung großzügig unterstützt und mir die Möglichkeit gegeben haben an der *9<sup>th</sup> Joint Natural Products Conference* in Kopenhagen im Jahr 2016 teilzunehmen. Darüber hinaus danke ich ihnen und ihren Mitarbeitern der Abteilung für Präklinische Forschung für den eindrucksvollen Forschungsaufenthalt in Karlsruhe im Frühjahr 2014 und die Unterstützung bei analytischen Fragestellungen.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Dr. Sonja Sievers vom *Compound Management and Screening Center (COMAS)* am Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Physiologie in Dortmund für die Möglichkeit Labore und technische Geräte vor Ort nutzen zu dürfen bedanken. Ihr und ihren Mitarbeiterinnen Christiane Pfaff und Carina Birke gilt zudem großer Dank für ihre Hilfe bei der Umsetzung des Screening-basierten Ansatzes meiner Forschungsarbeit. In diesem Zusammenhang danke ich auch Dr. Claude Ostermann für die technische Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Philippe Bastiaens des MPIs für molekulare Physiologie in Dortmund bedanken, wobei mein besonderer Dank Dr. Sven Müller für die Unterstützung bei der Konfokalmikroskopie und Dr. Michael Schulz für die bei der Durchflusszytometrie gilt, sowie Hendrike Schütz für ihre Hilfe bei der biochemischen Analytik. Danken möchte ich an dieser Stelle auch der Dortmund Protein Facility und Dr. Tim Bergbrede sowie Astrid Sander für die Bereitstellung des rekombinanten LIFs für die mESC-Kultivierung.

So gilt mein allumfassender Dank dem herausragenden Forschungs- und Wissenschaftsstandort Dortmund, wobei ich allen voran den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Daniel Rauh, Prof. Dr. Susanne Brakmann und PD Dr. Leif Dehmelt an der TU Dortmund sowie den Arbeitskreisen von Prof. Dr. Herbert Waldmann und Prof. Dr. Philippe Bastiaens am MPI für molekulare Physiologie danken möchte. Allorts wurde ich stets offen empfangen und durfte in hohem Maße von der Bereitschaft zum wissenschaftlichen Diskurs sowie der Möglichkeit Ressourcen mit nutzen zu dürfen

profitieren. Diese produktive Zusammenarbeit hat mich nicht nur fachlich, sondern insbesondere persönlich sehr stark bereichert.

Dass ich während meiner Promotion den Fokus auf wissenschaftliche und weniger administrative Aufgaben legen konnte, habe ich zudem Petra Alhorn und Martina Reibner zu verdanken, denen diesbezüglich mein herzlichster Dank gilt.

Mein innigster Dank gilt freilich der Arbeitsgruppe. Dr. Carmen Carrillo García möchte ich hierbei insbesondere für die wissenschaftliche Zusammenarbeit und ihren internationalen Beitrag in der Arbeitsgruppe danken. Meinen Kollegen Daniel Längle und Bernd Rathmer, die mich als 1. Doktoranden-Generation des Arbeitskreises während der unvergesslichen Zeit der Promotion begleitet haben, danke ich für ihre Unterstützung, die über den wissenschaftlichen Austausch hinausging, sowie für die bleibenden positiven Erinnerungen an diese gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors. Fabian Weßeler danke ich darüber hinaus für die gute Zusammenarbeit in den verschiedenen wissenschaftlichen Projekten und das Weiterführen meiner Forschungsarbeit in der nachfolgenden Doktoranden-Generation. Meinen Dank für die Hilfe und Unterstützung im Labor möchte ich hierbei auch Kirujan Jeyakumar aussprechen. Zudem bedanke ich mich recht herzlich bei meinen ehemaligen Bachelor-Studentinnen Hannah Lea Tumbrink und Katharina Meller für ihre Mitarbeit an meinem Promotionsthema.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinen Geschwistern von ganzem Herzen dafür danken, dass sie mir diesen Weg ermöglicht und mich auf diesem stets begleitet haben. Vielen Dank für die liebevolle Unterstützung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

## Eidesstattliche Erklärung

Halver, Jonas

Name, Vorname

163967

Matrikel-Nr.

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuchens kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen.

Dortmund, 10.10.2017

Ort, Datum

Unterschrift

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung neuer Stimulatoren der kardialen Differenzierung pluripotenter Stammzellen“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

Dortmund, 10.10.2017

Ort, Datum

Unterschrift