

Untersuchung des Einflusses von Doxorubicin auf Differenzierungsprozesse von murinen und humanen Progenitorzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Kim Jahn
aus Duisburg

Düsseldorf, Juli 2022

aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Herr Prof. Dr. Gerhard Fritz
2. Herr Prof. Dr. Hermann Aberle

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Das kardiovaskuläre System.....	1
1.1.1 Funktion und Aufbau des kardiovaskulären Systems.....	2
1.1.2 Zelltypen des kardiovaskulären Systems.....	5
1.1.2.1 Endothelzellen	5
1.1.2.2 Kardiomyozyten	6
1.1.3 Regeneration.....	7
1.2 Stamm- und Progenitorzellen.....	9
1.2.1 Embryonale Stammzellen.....	11
1.2.2 Progenitorzellen	12
1.2.3 Adulte Stammzellen	13
1.2.4 <i>In vitro</i> Differenzierung embryonaler und pluripotenter Stammzellen	13
1.2.5 Induzierte pluripotente Stammzellen.....	15
1.3 Genotoxin-Suszeptibilität kardiovaskulärer Zellen und deren Vorläufer.....	16
1.3.1 Suszeptibilität gegenüber verschiedenen genotoxischen Noxen	18
1.3.2 Anthrazyklin-induzierte kardiovaskuläre Schäden.....	19
1.3.2.1 Doxorubicin.....	19
1.4 Zelluläre Stressantwort	20
1.4.1 DNA-Schadensantwort	21
1.4.2 DNA-Reparatur.....	23
1.4.3 Apoptose und Seneszenz.....	26
1.4.4 Zelluläre Stressantwort in Stammzellen.....	28
1.5 Zielsetzung der Arbeit	29
2 Material und Methoden	31
2.1 Material.....	31
2.1.1 Herstellernachweise	31
2.1.2 Geräte	33
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.4 Kits.....	36

2.1.5 Chemikalien	36
2.1.6 Lösungen und Puffer	38
2.1.7 Verwendete Zelllinien	40
2.1.8 Medien und Medienzusätze	40
2.1.8.1 Zellkultur- und Differenzierungsmedien	41
2.1.9 <i>Real-time</i> PCR-Primer	43
2.1.10 <i>Real-time</i> PCR-Array-Primer	46
2.1.11 Antikörper	56
2.1.11.1 Primärantikörper	56
2.1.11.2 Sekundärantikörper	57
2.1.12 Sonstige Substanzen	57
2.1.13 Software	58
2.2 Methoden	59
2.2.1 Zellkultur	59
2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen	59
2.2.1.1.1 Embryonale Stammzellen der Maus (mESC)	59
2.2.1.1.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)	59
2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen	61
2.2.1.2.1 Embryonale Stammzellen der Maus (mESC)	61
2.2.1.2.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)	61
2.2.2 Differenzierungen	62
2.2.2.1 mESC Endothelzellendifferenzierung	62
2.2.2.2 mESC Kardiomyozytendifferenzierung	63
2.2.2.3 hiPSC Endothelzellendifferenzierung	63
2.2.3 Behandlung der Zellen mit Genotoxinen	64
2.2.4 Vorbereitung von Deckgläsern	64
2.2.5 Analysen zur Charakterisierung differenzierter Zellen	64
2.2.5.1 Immunzytochemie	64
2.2.5.2 Aufnahme von Dil-ac-LDL	65
2.2.5.3 Calcium-Assay	66
2.2.5.4 ATP-Luciferase Assay	67
2.2.5.5 Metabolische Analysen mittels <i>Seahorse</i> XFe Analyzer	68
2.2.5.5.1 Messprinzip des <i>Seahorse</i> XFe96 Extracellular Flux Analyzers für die mitochondriale Respiration mittels Mito Stress Test Kit	68

2.2.5.5.2 Etablierung von <i>Seahorse</i> -Messungen einer neuen Zelllinie	69
2.2.5.5.3 Bestimmung der mitochondrialen Respiration	70
2.2.6 Molekularbiologie	70
2.2.6.1 DNA-Isolierung.....	70
2.2.6.2 RNA-Isolierung.....	71
2.2.6.3 cDNA-Synthese	71
2.2.6.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR	72
2.2.6.4.1 Bestimmung des mitochondrialen DNA-Gehalts durch qRT-PCR.....	72
2.2.6.5 Microarray Analysen zur Erfassung der mRNA Expression.....	73
2.2.7 Analyse der Zellviabilität.....	73
2.2.7.1 Alamar Blue-Assay	73
2.2.8 Analyse der Zellzyklusverteilung	74
2.2.8.1 Durchflusszytometrie.....	74
2.2.8.2 EdU-Inkorporations-Assay	75
2.2.9 Proteinbiochemie.....	76
2.2.9.1 Proteinisolierung	76
2.2.9.2 Proteinbestimmung	77
2.2.9.3 SDS-Page.....	77
2.2.9.4 Western Blot	78
2.2.10 Analyse von DNA-Schäden	78
2.2.10.1 γ H2AX- und 53BP1-Foci.....	78
2.2.11 Statistische Auswertung	79
3 Ergebnisse.....	80
3.1 Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	80
3.1.1 Endothelzellendifferenzierung	80
3.1.1.1 Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen	81
3.1.2 Kardiomyozytendifferenzierung	84
3.1.2.1 Charakterisierung der differenzierten Kardiomyozyten	85
3.1.3 Genexpressionsvergleich basaler differenziell exprimierter Suszeptibilitäts- faktoren in kardiovaskulären Zelltypen	88
3.2 Einfluss von Doxorubicin auf mESC und aus mESC differenzierte kardiovaskuläre Zellen.....	94
3.2.1 Analyse molekularer Mechanismen, die zur erhöhten Sensitivität von Endothel- ähnlichen Progenitorzellen gegenüber Doxorubicin beitragen	100

3.2.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen.....	106
3.2.2.1 Charakterisierung des Differenzierungspotentials aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.....	107
3.2.2.2 Funktionelle Analysen der aus Endothel-ähnlichen Progenitorzellen differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung	110
3.2.2.3 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mitochondriale Funktionen	115
3.2.2.4 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren.....	120
3.2.2.5 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in mESC, Progenitor EC und EC	121
3.3 Endothelzelldifferenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen	129
3.3.1 Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen.....	130
3.3.2 Basale Expression von Suszeptibilitätsfaktoren in humanen Endothel-ähnlichen Zellen	132
3.3.3 Einfluss von Doxorubicin auf hiPSC und aus hiPSC differenzierte Endothel-ähnliche Zellen.....	138
4 Diskussion.....	143
4.1 Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen	144
4.1.1 Vergleichende basale Expressionsanalysen von Suszeptibilitätsfaktoren in kardiovaskulären Zelltypen.....	150
4.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen	159
4.2.1 Funktionelle Analysen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen.....	163
4.2.2 Charakterisierung mitochondrialer Funktionen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen	167
4.2.3 Expressionsanalyse ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Progenitor EC	170
4.2.4 Reparaturfähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen in mESC, Progenitor EC und differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.....	172
4.3 Endothelzelldifferenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen	175
4.3.1 Basale Expressionsanalyse von Suszeptibilitätsfaktoren in differenzierten hEC	177
4.3.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf hiPSC und das Differenzierungspotential von Progenitor hEC.....	182
5 Ausblick.....	184

6 Zusammenfassung	187
6.1 Summary	189
7 Literaturverzeichnis	191
8 Anhang	217
8.1 Publikationen	217
Danksagung	218
Eidesstattliche Erklärung	219

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Anatomie des menschlichen Herzens.	3
Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes am Beispiel einer Arterie.	4
Abbildung 1.3: Prozess der Endothelregeneration und Gefäßreparatur.	9
Abbildung 1.4: Eigenschaften einer Stammzelle.	10
Abbildung 1.5: Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen.	11
Abbildung 1.6: Reprogrammierung somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) und deren Anwendungsmöglichkeiten.	16
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.	22
Abbildung 1.8: Mechanismus der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen End-Verknüpfung (NHEJ).	26
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des <i>Seahorse</i> XF Cell Mito Stress Tests mit den verschiedenen Parametern der mitochondrialen Respiration.	69
Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue-Assays.	74
Abbildung 3.1: Protokoll zur Differenzierung von mESC in Endothel-ähnliche Zellen (EC).	81
Abbildung 3.2: Morphologische Veränderungen während der Endothelzeldifferenzierung von mESC.	82
Abbildung 3.3: Charakterisierung der Endothel-ähnlichen Zellen auf mRNA- und Protein-Ebene.	83
Abbildung 3.4: Protokoll zur Differenzierung von mESC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM).	85
Abbildung 3.5: Morphologische Veränderungen während der Kardiomyozytendifferenzierung von mESC.	86
Abbildung 3.6: Charakterisierung der differenzierten Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (CM) auf mRNA- und Protein-Ebene.	87
Abbildung 3.7: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.	89
Abbildung 3.8: Behandlungs- und Analysezeitpunkte während den kardiovaskulären Differenzierungen.	96
Abbildung 3.9: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Morphologie von mESC und aus mESC differenzierte kardiovaskuläre Zelltypen.	98
Abbildung 3.10: Viabilität von mESC und aus mESC differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.	99

Abbildung 3.11: Viabilität von mESC und aus mESC differenzierten CM nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.	100
Abbildung 3.12: Stimulation von Zelltodmechanismen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von mESC und aus mESC differenzierten EC.	102
Abbildung 3.13: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Proliferation.	104
Abbildung 3.14: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Aktivierung Seneszenz-assoziiertes Mechanismen.	106
Abbildung 3.15: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA- und Proteinexpression von prototypischen Endothelzellmarkern.	108
Abbildung 3.16: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Proteinexpression von prototypischen Endothelzellmarkern auf Einzelzellebene.	109
Abbildung 3.17: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Zellmorphologie von mESC und aus EC d4 differenzierten EC.	111
Abbildung 3.18: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf Endothelzell-spezifische Funktionen.	114
Abbildung 3.19: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mitochondriale Funktionen.	117
Abbildung 3.20: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf den zellulären ATP-Gehalt und mitochondriale Funktionen.	119
Abbildung 3.21: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitäts-zugehöriger Markergene.	121
Abbildung 3.22: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in mESC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.	123
Abbildung 3.23: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in Progenitor EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.	125
Abbildung 3.24: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in differenzierten EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.	126
Abbildung 3.25: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Bildung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in mESC und aus mESC differenzierten EC.	128
Abbildung 3.26: Verwendetes Protokoll zur Differenzierung von hiPSC zu hEC.	129
Abbildung 3.27: Morphologie während der Endothelzelldifferenzierung von hiPSC.	130
Abbildung 3.28: Charakterisierung der humanen differenzierten Endothel-ähnlichen Zellen auf mRNA-Ebene.	131
Abbildung 3.29: Charakterisierung der differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen auf Proteinebene.	132

Abbildung 3.30: Mikroarray Analyse von HUVEC, hiPSC und hEC.	134
Abbildung 3.31: Differenzierungsabhängige Veränderung in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.....	135
Abbildung 3.32: Behandlungs- und Analysezeitpunkt während der humanen Endothelzeldifferenzierung.	139
Abbildung 3.33: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Morphologie von hiPSC und aus hiPSC differenzierten hEC.	140
Abbildung 3.34: Viabilität von hiPSC und aus hiPSC differenzierten hEC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.	141
Abbildung 3.35: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression von prototypischen Stamm- und Endothelzellmarkern.	142

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2.1: Auflistung der Herstellerhauptstandorte.	31
Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.	33
Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.	35
Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.	36
Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.	36
Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.	38
Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.	40
Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Medien und Zusätze.	40
Tabelle 2.9: Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur- und Differenzierungsmedien.	41
Tabelle 2.10: Auflistung der murinen Primersequenzen für die <i>real-time</i> PCR.	43
Tabelle 2.11: Auflistung der humanen Primersequenzen für die <i>real-time</i> PCR.	46
Tabelle 2.12: Auflistung der murinen Primersequenzen des <i>real-time</i> PCR-Arrays.	47
Tabelle 2.13: Auflistung der humanen Primersequenzen des <i>real-time</i> PCR-Arrays.	51
Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.	56
Tabelle 2.15: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.	57
Tabelle 2.16: Auflistung der verwendeten sonstigen Substanzen.	57
Tabelle 2.17 Auflistung der verwendeten Software.	58
Tabelle 2.18: Auflistung der etablierten Zellzahlen und FCCP-Konzentrationen für Messungen mit dem <i>Seahorse</i> XFe Analyzer.	70
Tabelle 3.1: Differenzierungsabhängige Änderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.	90
Tabelle 3.2: Zuordnung der in beiden Differenzierungen (EC + CM) einheitlich hoch- und herunterregulierten Gene zu Signalwegen.	91
Tabelle 3.3: Zuordnung der lediglich in EC oder CM hochregulierten Gene zu Signalwegen.	93
Tabelle 3.4: Zuordnung der lediglich in EC oder CM herunterregulierten Gene zu Signalwegen.	94
Tabelle 3.5: Verdopplungszeit von mESC und aus mESC differenzierten EC.	105
Tabelle 3.6: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.	136
Tabelle 3.7: Zuordnung der in der Differenzierung hoch- und herunterregulierten Gene zu Signalwegen.	137

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM-Azid	6-Carboxyfluorescein-Azid
ac-	acetyliert
ACTA2	<i>Actin Alpha 2, Smooth Muscle</i>
Actn1	Aktinin-alpha 1, <i>actinin alpha 1</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Akt1	<i>Thymoma viral proto-oncogene 1</i>
ALKi	<i>Activin receptor-like kinase receptor inhibitor</i>
AM	Acetoxymethylester
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK α	5' Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase
ANKRD1	<i>Ankyrin Repeat Domain 1</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ANXA1	<i>Annexin A1</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
Apex1	<i>Apurinic/aprimidinic endonuclease 1</i>
APLNR	<i>Apelin receptor</i>
Arhgdia	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha</i>
ATF6	Aktivierender Transkriptionsfaktor 6
Atg7	Autophagie-zugehöriges 7 Homolog, <i>autophagy related 7 homolog</i>
Atm/ATM	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Serin/Threonin-Kinase <i>ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraethansäure
BAPTTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraethansäure
Bax	Bcl2-assoziiertes X Protein, <i>Bcl2-associated X protein</i>
Bcl2	B-Zell Lymphom 2, <i>B-cell lymphoma 2</i>
Becn1	Beclin 1, <i>Beclin 1, autophagy related</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BiP	Bindendes Immunglobulinprotein, <i>binding immunoglobulin protein</i>
BMP4/BMP-4	<i>Bone morphogenic protein 4</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CA3	<i>Carbonic Anhydrase 3</i>
Cacna1 α	Spannungsabhängigen Calciumkanals Typ P/Q der alpha 1A Untereinheit, <i>calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit</i>
cAMP	Zyklisches Monoadenosinphosphat, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
Casp2	Caspase 2
CCL2	Cystein-Cystein Chemokinligand 2, <i>Cysteine-Cysteine chemokine ligand 2</i>
Ccna1	Cyclin A1
Ccnb1	Cyclin B1
Ccne1	Cyclin E1
CD	<i>Cluster of differentiation</i>

CD44	CD44 Antigen
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDH1	Cadherin 1
Cdkn1a	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1A, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
Cdkn1b	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 1B, <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27)</i>
CDKN2B	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2B</i>
Chk1	Checkpointkinase 1
Chk2	Checkpointkinase 2
C-IAP1	<i>Baculoviral IAP repeat-containing 3</i>
C-Jun	Jun Onkogen
CM	Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, <i>cardiomyocyte-like cells</i>
c-Myc	<i>Proto-Oncogene c-Myc</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COL3A1	Kollagen Typ III, alpha 1
Cox2	Cytochrom Oxidase Untereinheit II
CRABP1	<i>Cellular Retinoic Acid-Binding Protein 1</i>
CSA	<i>Cockayne syndrome type A protein</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome type B protein</i>
CtIP	<i>C-terminal binding protein-interacting protein</i>
CUZD1	<i>CUB And Zona Pellucida Like Domains 1</i>
Cx40	Connexin40
Cxcr4	Chemokine (C-X-C Motiv) Rezeptor 4, <i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Cyp1a1	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1</i>
d	Tag, day
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DCF	2',7'-Dichlorfluorescein
Ddb2	Schadens-spezifische DNA-bindende Protein 2, <i>damage-specific DNA binding protein 2</i>
Ddit3	DNA-Schaden induzierbares Transkript 3, <i>DNA-damage inducible transcript 3</i>
DDR	DNA-Schadensantwort, <i>DNA damage response</i>
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
Dil	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DKK2	<i>Dickkopf-Related Protein 2</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMEM/F12	DMEM Ham's F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAJC15	<i>Dna J Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C15</i>
DNA-PKc	Katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase
Doxo	Doxorubicin
DSB	Doppelstrangbruch, <i>double-strand break</i>
DSBs	Doppelstrangbrüche, <i>double-strand breaks</i>
DTT	Dithiothreitol
EACR	Ansäuerungsrate, <i>extracellular acidification rate</i>
EB	<i>Embryoid bodies</i>
EC	Endothel-ähnliche Zellen, <i>endothelial-like cells</i>
ECBM	Basalmedium für Endothelzellen, <i>Endothelial cell basal medium</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EdU	5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin
Efnb2	Ephrin B2
eIF2 α	<i>Eukaryotic initiation factor-2α</i>
eNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase 3/endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, <i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>
EPC	Endotheliale Progenitorzellen, <i>endothelial progenitor cells</i>
Ephb4	Ephrin Typ-B Rezeptor 4
Eppi-Gefäß	Eppendorf-Reaktionsgefäß
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erccl1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ESM1	Endothelzell-spezifisches Molekül 1
ESRP1	<i>Epithelial Splicing Regulatory Protein 1</i>
EST	Embryonaler Stammzelltest
ES-Zellen	Embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	und andere, <i>et alii</i>
EZ	Endothelzelle
FAM198B	<i>Family With Sequence Similarity 198 Member B</i>
Fancc	<i>Fanconi anemia, complementation group C</i>
Fas-L	Fas-Ligand, <i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
Fas-R	Fas-Rezeptor, <i>Fas receptor (TNF receptor superfamily member 6)</i>
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazon
Fen1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flk1	Fetale Leber Kinase 1, <i>fetal liver kinase 1</i>
Fos	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
g	Erdbeschleunigung, 9,81 m/s ²
Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GFR	Wachstumsfaktor-reduziert, <i>growth factor reduced</i>
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein
Gpx	Glutathionperoxidase
Gpx1	<i>Glutathione peroxidase 1</i>
GREM1	<i>Gremlin 1</i>
GRP78	Glukose-regulierendes Protein
GSK-3 α	Glykogensynthase-Kinase 3 α
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GSKi	Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor
Gsta3	Glutathion-S-Transferase 3
Gstm1	<i>Glutathione S-transferase, mu 1</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphat-bindende Proteine
Gy	Gray
h	Stunde, <i>hour</i>
H5V	Immortalisierte Maus Endothelzelllinie
HAND1	<i>Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 1</i>
HAND2	<i>Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2</i>
HAPLN1	<i>Hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HCB	Hexachlorbenzol
HCl	Salzsäure
hEC	Humane endothel-ähnliche Zellen, <i>human endothelial-like cells</i>

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hESC	Humane embryonale Stammzellen, <i>human embryonic stem cells</i>
Hif1a	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α , <i>Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit</i>
hiPSC	Humane induzierte pluripotente Stammzellen, <i>human induced pluripotent stem cells</i>
hiPSC-CM	Humane aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
Hmox1	Hämoxygenase 1, <i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>
HOXA10-HOXA9	Homöobox Protein A10-Homöobox Protein A9
HOXB2	Homöobox Protein B2
HOXB3	Homöobox Protein B3
HOXC6	Homöobox Protein C6
HOXC8	Homöobox Protein C8
hPSC-CM	Humane aus pluripotenten Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
HR	Homologe Rekombination
Hspa1b	Hitzeschockprotein 1B, <i>Heat shock protein 1B (Hsp70)</i>
Hus1	Hus1 Homolog
HUVEC	Humane Nabelschnurvenenendothelzellen, <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
H2AX	<i>H2A histone family, member X</i>
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration 50 %, <i>inhibitory concentration 50 %</i>
Icam-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IL-8	Interleukin-8
incl.	Inklusive, <i>inclusive</i>
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IR	Ionisierende Strahlung, <i>ionizing irradiation</i>
IRE1	Inositol-benötigendes Enzym 1, <i>inositol-requiring enzyme 1</i>
Itgb1	Integrin beta 1, <i>Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)</i>
JAK-STAT3	<i>Janus kinase signal transducer and activator of transcription 3</i>
Kap1	<i>KRAB-associated protein 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
KHP	Krebs-HEPES-Puffer
Klf4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
KRAB	<i>Krüppel associated box</i>
Lamp1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDL	Lipoprotein geringer Dichte, <i>low-density lipoprotein</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LIF	Leukämieinhibitionsfaktor, <i>leukemia inhibitory factor</i>
Lig4	DNA-Ligase IV, ATP-abhängig
LOC100506013	<i>Apelin receptor early endogenous ligand</i>
LRAT	<i>Lecithin Retinol Acyltransferase</i>
LUM	<i>Lumican</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase, <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK/ERK	Mitogen-aktivierende Proteinkinase/Extrazellulärer Signal-regulierte Kinase

Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
mESC	Embryonale Stammzellen der Maus, <i>mouse embryonic stem cells</i>
MFN2	Mitofusin-2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mgmt	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
min	Minute
mind.	Mindestens
MMR	Fehlpaarungsreparatur, <i>mismatch repair</i>
Mpg	<i>N-methylpurine-DNA glycosylase</i>
Mre11	<i>Double-strand break repair protein MRE11</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Msh2	MutS Homolog 2
Msh6	MutS Homolog 6
MW	Molekulargewicht
Myh6	Schwere Kette Myosin 6, <i>myosin heavy chain 6</i>
Myl2	Leichte Kette Myosin 2, <i>myosin light chain 2</i>
n	Anzahl der biologischen Replikate
N	Anzahl der technischen Replikate
N2B27	Präinkubationsmedium Endothelzelldifferenzierung
N2B27-Insulin	Präinkubationsmedium Kardiomyozytendifferenzierung
N2B27-Insulin-1	Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1
N2B27-Insulin-2	Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2
N2B27-Insulin-MI	Mesoderm-Induktionsmedium Kardiomyozytendifferenzierung
N2B27-MI	Mesoderm-Induktionsmedium Endothelzelldifferenzierung
N2B27-VM	Endothel-Induktionsmedium
Na	Natrium
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumphosphat-Dihydrat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NaOH	Natriumhydroxid
Nbs1	Nibrin
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe End-Verknüpfung, <i>non-homologous end-joining</i>
Nkx2-5	NK2 Homöobox 5, <i>NK2 homeobox 5</i>
nM	Nanomol
NNMT	<i>Nicotinamide N-Methyltransferase</i>
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nox1	NADPH Oxidase 1
Noxa	<i>Bcl2-homology 3</i>
NP-40	<i>Nonoxinol 40</i>
NPTX1	<i>Neuronal Pentraxin 1</i>
OCR	Sauerstoffverbrauchsrate, <i>oxygen consumption rate</i>
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4, <i>octamer binding transcription factor 3/4</i>

Oct4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4
Ogg1	<i>8-oxoguanine DNA-glycosylase 1</i>
p-	Phosphoryliert
P70S6	Ribosomale Protein S6 Kinase beta-1
Parp1	Poly (ADP-Ribose) -Polymerase 1, <i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
PBS (-/-)	PBS ohne Calcium und Magnesium
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,3 % Triton X-100
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDL	Poly-D-Lysin Hydrobromid
Pecam1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PERK	Proteinkinase RNA-ähnliche Endoplasmatische Reticulum Kinase, <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PGC1 α	Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1 α , <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PI	Propidiumiodid
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol-3 Kinase/Proteinkinase B
PITX2	<i>Paired-like homeodomain transcription factor 2</i>
PK	DNA-abhängige Proteinkinase
PKcs	katalytischen Untereinheit der PK
PMP22	<i>Peripheral myelin protein 22</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POU5F1	<i>Octamer-Binding Transcription Factor 4, Oct4</i>
POU5F1P3	<i>POU Class 5 Homeobox 1 Pseudogene 3</i>
PP _i	Diphosphat
PSC	Pluripotente Stammzellen, <i>pluripotent stem cells</i>
P-Selektin	Thrombozyten-Selektin, <i>platelet selectin</i>
Pten	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTPRZ1	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor-Type, Z Polypeptide 1</i>
Puma	<i>Bcl2-binding component 3</i>
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion
RAB17	<i>Ras-Related Protein Rab-17</i>
Rac1	<i>RAS-related C3 botulinum substrate 1</i>
Rad50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
Rad51	RAD51 Homolog
Resazurin	7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid
Resorufin	7-Hydroxyphenoxazin-3-on
Rev1	REV1 Homolog
Rev3	<i>REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta</i>
RGS4	<i>Regulator Of G-Protein Signaling 4</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RhoB	<i>Ras homolog gene family, member B</i>
Rn18S	18S ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, <i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>

RPL32	Ribosomales Protein L32
rpm	Umdrehungen pro Minute, <i>rotations per minute</i>
RSPO2	<i>R-Spondin 2</i>
RSPO3	<i>R-Spondin 3</i>
RT	Raumtemperatur
Ryr2	Ryanodinrezeptors 2, <i>ryanodine receptor 2</i>
SD	Standardabweichung, <i>standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sele	Endotheliales Selektin (E-Selektin)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, <i>standard error of the mean</i>
Sirt4	Sirtuin 4
SMC	Glatte Muskelzellen, <i>smooth muscle cells</i>
Smc1	<i>Structural maintenance of chromosomes protein 1</i>
SNAI2	<i>Zinc Finger Protein SNAI2</i>
Sod1	Superoxid-Dismutase 1, <i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>
Sod2	Superoxid-Dismutase 2
SOX17	<i>SRY (Sex Determining Region Y)-Box 17</i>
Sox2	<i>Sex Determining Region Y-Box 2</i>
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SSBs	Einzelstrangbrüche, <i>single-strand breaks</i>
SST	<i>R-Spondin 3</i>
SYTL5	<i>Synaptotagmin-Like Protein 5</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzsäure, <i>tris buffered saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor, <i>transforming growth factor</i>
TGF β	Transformierender Wachstumsfaktor β , <i>transforming growth factor β</i>
Tiam1	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
Tie1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
Timp2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tnnt2	Kardiales Troponin T2, <i>troponin T2, cardiac</i>
TopBP1	(DNA) Topoisomerase II-bindendes Protein 1
Topoll	(DNA) Topoisomerase II
Topoll α	(DNA) Topoisomerase II- α
Topoll β	(DNA) Topoisomerase II- β
Trex	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
Trp63	<i>Transformation related protein 63</i>
Trp73	<i>Transformation related protein 73</i>
Txnrd1	Thioredoxin Reduktase 1, <i>thioredoxin reductase 1</i>
u.a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
UPR	ungefaltete Proteinantwort, <i>unfolded protein response</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
USP44	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 44</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
v.a.	vor allem

Vcam-1/VCAM-1	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-Cadherin	Vaskulär-endotheliales Cadherin, <i>vascular endothelial cadherin</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	VEGF-Rezeptor
vWF	von Willebrand Faktor
Wee1	WEE 1 Homolog 1
Wnt	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family</i>
Wnt3	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3</i>
WNT-C59	<i>Wingless inhibitor</i>
Wrn	Werner-Syndrom Homolog
Wrnip1	<i>Werner helicase interacting protein 1</i>
Xpa	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>
Xpb	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group B</i>
Xpc	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group C</i>
Xpd	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group D</i>
Xpf	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F</i>
Xpg	<i>Xeroderma pigmentosum, complementation group G</i>
Xrcc1	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>
Xrcc3	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>
Xrcc4	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNF503	<i>Zinc Finger Protein 503</i>
β-Gal	β-Galaktosidase
% (v/v)	Volumenprozent, <i>volume-volume percentage</i>
% (w/v)	Gewichtsprozent, <i>weight-volume percentage</i>
μM	Mikromol
γH2AX	H2AX phosphoryliert an seinem Serin 139

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und auch in Deutschland (World Health Organization, 2020; Statistisches Bundesamt, 2021). Sie umfassen Erkrankungen des Herzens sowie des Blutgefäßsystems. In Deutschland gingen 2019 22,2 % der Todesfälle auf eine chronische ischämische Herzkrankheit und 13,4 % auf einen akuten Myokardinfarkt (Schlaganfall) zurück. Eine Herzinsuffizienz führte zu 10,7 % der Todesfälle und 3,6 % starben in Folge einer zerebrovaskulären Krankheit (Statistisches Bundesamt, 2021).

Die zweithäufigste Todesursache stellen in Deutschland Krebserkrankungen dar (Statistisches Bundesamt, 2021). Viele der in der Tumorthherapie eingesetzten Medikamente haben Nebenwirkungen. Diese erstrecken sich von Übelkeit und Erbrechen über Schleimhautschäden, bis zu zytotoxischen Effekten in Organen (Nurgali *et al.*, 2018). Zu den dosislimitierenden Nebenwirkungen zählen u.a. Knochenmarksdepression (Wang *et al.*, 2006), Hepatotoxizität (Saad *et al.*, 2001; Deepa and Varalakshmi, 2003), Nephrotoxizität (Yao *et al.*, 2007; Injac and Strukelj, 2008) und Kardiotoxizität (Yeh *et al.*, 2004). Das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin (Adriamycin) wird als Tumorthapeutikum für ein weites Spektrum an Krebserkrankungen, wie u.a. Bronchial- und Mamakarzinomen, Sarkomen, Lymphome und Leukämien, eingesetzt (Wang *et al.*, 1971; Blum and Carter, 1974). Doxorubicin weist als Nebenwirkung u.a. eine irreversible Kardiotoxizität auf (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014). Die Details der hierbei beteiligten molekularen Mechanismen sind noch weitgehend ungeklärt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten und Endothelzellen die Reaktion des Herzens auf Anthrazykline beeinflussen (Wolf and Baynes, 2006; Wilkinson *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2016; Gambardella *et al.*, 2017). Es wird vermutet, dass auch die in geringer Anzahl im Herzen vorkommenden kardialen Progenitorzellen die Reaktion des Herzens beeinflussen (De Angelis *et al.*, 2010; Choi and Poss, 2012; Piegari *et al.*, 2013). Bereits in den frühen 2000-er Jahren wurden im adulten Herzen Zellen mit Eigenschaften von kardialen Stammzellen beobachtet, die sich zu Myozyten, glatten Muskelzellen und Endothelzellen differenzieren (Beltrami *et al.*, 2003).

1.1 Das kardiovaskuläre System

Das kardiovaskuläre System ist das erste funktionale Organ, welches sich im Vertebratenembryo während der Ontogenese entwickelt (Risau and Flamme, 1995). Es

umfasst das Herz, ein Netz aus Blutgefäßen und das Blut. Diese Bestandteile entstehen aus Vorläuferzellen des lateralen Mesoderms (Descamps and Emanuelli, 2012). Das Differenzierungspotential von mesodermalen Vorläuferzellen ist in Abbildung 1.5 (Abschnitt 1.2.1) dargestellt.

1.1.1 Funktion und Aufbau des kardiovaskulären Systems

Die Hauptaufgabe des kardiovaskulären Systems ist die Versorgung jeder einzelnen Körperzelle über die Blutgefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen, wie Zucker, Fette oder Eiweiße. Dabei pumpt das Herz mit rhythmischen Kontraktionen das Blut durch den Körper, um die Organe zu versorgen (Katz, 2011). Zudem werden Stoffwechselabfallprodukte wie Harnsäure und Kohlenstoffdioxid über das kardiovaskuläre System abtransportiert (Risau and Flamme, 1995). Bei der Wärmeregulation sowie der Verteilung von Hormonen und dem Transport von Abwehrzellen des Immunsystems, wie Leukozyten, spielt das kardiovaskuläre System ebenfalls eine wichtige Rolle. Folglich hängt die Homöostase des Organismus u.a. entscheidend von der Funktion und dem Aufbau des Blutgefäßsystems ab. Funktionseinschränkungen bzw. Dysfunktionen einzelner Zellbestandteile der Blutgefäße resultieren in kardiovaskulären Erkrankungen, wie Schlaganfällen, Herzkrankheiten, Bluthochdruck oder Arteriosklerose (Munzel *et al.*, 2008; Rajendran *et al.*, 2013). Neben bekannten Risikofaktoren wie Bluthochdruck, erhöhte Cholesterinwerte, Nikotin- und übermäßiger Alkoholkonsum sowie Bewegungsmangel und Stress (Munzel *et al.*, 2008; Erhardt, 2009) können bestimmte Umweltgifte ebenfalls das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Dazu gehören bspw. über die Atemluft aufgenommene Schwermetalle, wie Blei, Kupfer oder Cadmium, oder über den Fischverzehr aufgenommenes Methylquecksilber (Raymond *et al.*, 2016; Shakir *et al.*, 2017). Auch können im Rahmen der Tumortherapie eingesetzte Medikamente, wie z.B. Doxorubicin, Cisplatin, Taxol und Trastuzumab (Yeh *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014), oder Bestrahlungen (Hildebrandt, 2010; Lee *et al.*, 2012b) als unerwünschte Nebenwirkungen zu kardiovaskulären Erkrankungen oder Kardiotoxizität führen.

Anatomisch kann das Herz in eine rechte und eine linke Herzhälfte unterteilt werden. Sauerstoffarmes Blut fließt über die rechte Herzhälfte in die Lunge. Dort wird das Blut oxygeniert. Sauerstoffreiches Blut gelangt in die linke Herzhälfte und wird von dort in den Organismus verteilt. Jede Herzhälfte besteht aus einem Vorhof (Atrium) und einer Kammer (Ventrikel). Durch die Herzscheidewand (Septum) werden die beiden Herzhälften voneinander getrennt (Abbildung 1.1). Herzklappen trennen die jeweiligen Kammern und

Vorhöfe (Trikuspidal- und Mitralklappe) voneinander, sowie die Kammern von den sich anschließenden Gefäßen (Pulmonal- und Aortenklappe). Somit wird ein unidirektionaler Blutstrom gewährleistet. Das Endokard ist eine dünne Gewebsschicht, die das Lumen des Herzens auskleidet und somit die vier Herzklappen bildet. Außen liegt das Perikard, das sogenannte äußere Blatt des Herzbeutels. Dazwischen liegt die Herzmuskelschicht, das Myokard, welches den größten Teil der Herzwand bildet. Trotz ihres großen Volumenanteils und ihrer, für den Herzschlag wichtigen Kontraktionsfunktion, stellen Kardiomyozyten nur ca. 25-35 % der Zellen des Herzens dar (Nag, 1980; Bergmann *et al.*, 2015). Pinto und Kollegen untersuchten die zelluläre Zusammensetzung des Herzens. Nach ihren Untersuchungen machen Endothelzellen mit 64 % den größten Anteil der Nicht-Kardiomyozyten des Herzens aus, gefolgt von Fibroblasten mit 15 % (Pinto *et al.*, 2016). Den restlichen Anteil stellen glatte Muskelzellen, Perizyten und Leukozyten dar.

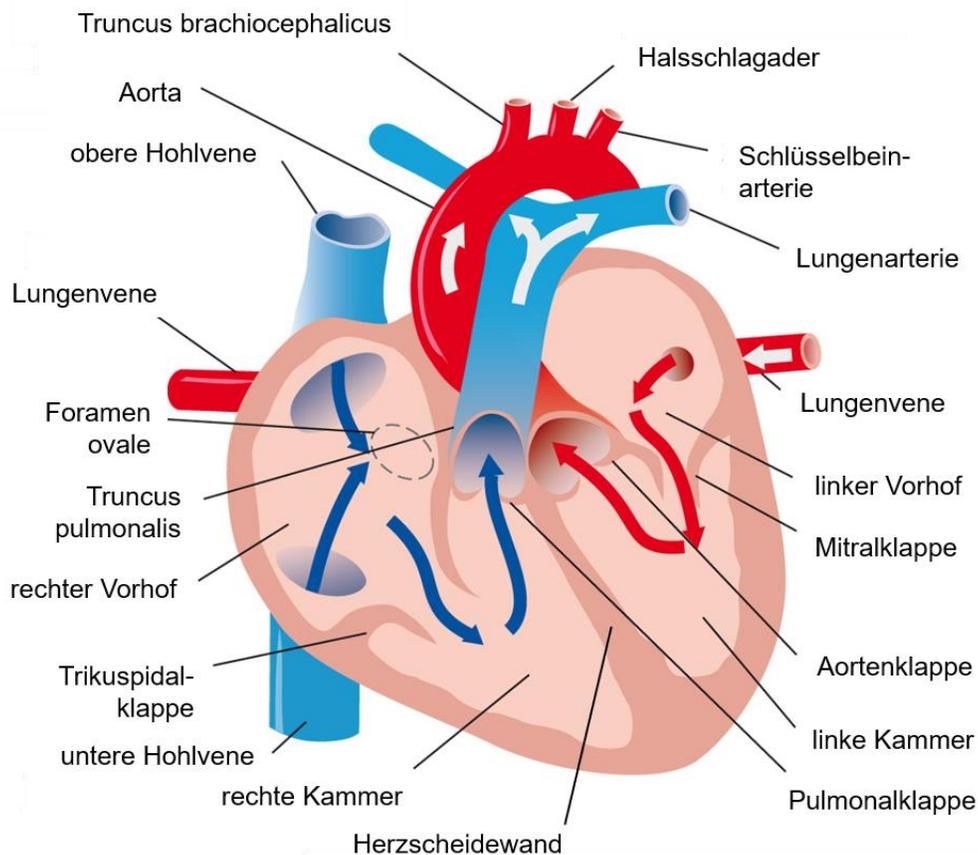


Abbildung 1.1: Schematische Anatomie des menschlichen Herzens.

Pfeile zeigen die Fließrichtung des Blutes an. Sauerstoffarmes Blut ist in blau und sauerstoffreiches Blut ist in rot dargestellt. Abbildung modifiziert nach Bommas-Ebert *et al.* (Bommas-Ebert *et al.*, 2011).

Endothelzellen bilden die dem Lumen zugewandte innere Schicht der Blutgefäße. Die großen Blutgefäße, wie Arterien und Venen, haben einen nahezu identischen Aufbau (Abbildung 1.2). Die innerste Schicht ist die Tunica intima, welche aus einem einschichtigen Endothel (aus Endothelzellen) besteht, welches der Basallamina aufsitzt und im direkten Kontakt zum Blutkreislauf steht. Es folgt eine subendotheliale Schicht, eine Extrazellulärmatrix, mit wenigen Zellen. Die innere elastische Membran ist arterienspezifisch und besteht aus elastischen Fasern. Sie trennt die Tunica intima von der Tunica media ab. Diese mittlere Gefäßschicht besteht aus mehrschichtigen glatten Muskelzellen und der Extrazellulärmatrix. Bei arteriellen Gefäßen trennt die äußere elastische Membran diese Gefäßschicht von der äußeren Tunica adventitia ab. Fibroblasten stellen den Hauptbestandteil dieser äußeren Bindegewebsschicht dar. Die Tunica adventitia ist außerdem mit Nerven, Lymph- und Blutgefäßen durchsetzt. Zusätzlich beherbergt sie residente Stamm- und Progenitorzellen (Hu *et al.*, 2004; Hoshino *et al.*, 2008), deren differenzierte Zelltypen bei der Regeneration der Blutgefäße und der postnatalen Angiogenese beteiligt sind (Hu *et al.*, 2004; Zengin *et al.*, 2006; Pasquinelli *et al.*, 2007; Hoshino *et al.*, 2008; Passman *et al.*, 2008; Campagnolo *et al.*, 2010; Majesky *et al.*, 2011; Majesky *et al.*, 2012). Zudem sind dort immunmodulierende Zellen, wie Dendriten und Makrophagen vertreten (Zhou *et al.*, 2010; Stenmark *et al.*, 2013).

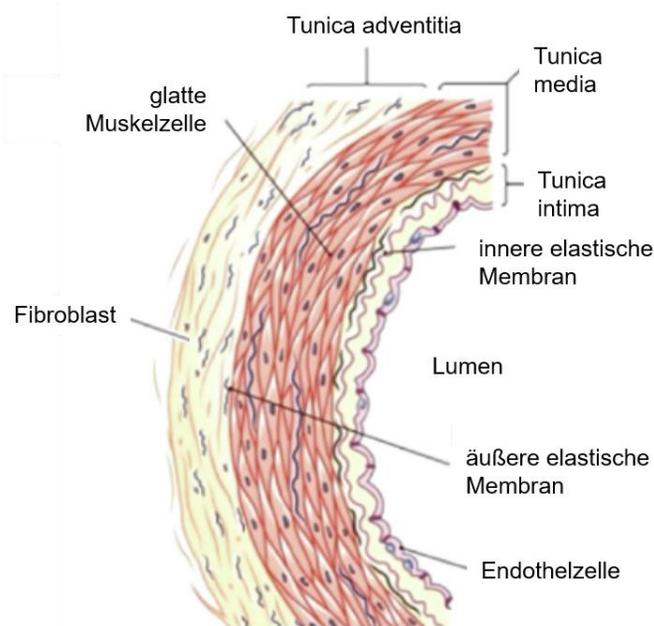


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau eines Blutgefäßes am Beispiel einer Arterie.

Dem Lumen und damit dem Blutkreislauf zugewandte Schicht stellt die Tunica intima dar, die aus Endothelzellen besteht. Die innere elastische Membran trennt sie von der Tunica media ab, welche aus glatten Muskelzellen besteht. Die Tunica adventitia ist die äußerste Schicht, die auf eine äußere elastische Membran folgt. Sie besteht vorwiegend aus Fibroblasten. Abbildung modifiziert nach Cao *et al.* (Cao *et al.*, 2020).

Während die Tunica intima dem Austausch von Gas, Flüssigkeit und Sauerstoff zwischen dem Blut und umliegenden Gewebe dient, reguliert die Tunica media die Gefäßweite und damit den Gefäßwiderstand. Die äußere Tunica adventitia sorgt für die Einbettung in das Gewebe.

Kapillaren sind die kleinsten Vertreter der Blutgefäße. Sie bestehen lediglich aus Endothelzellen sowie der Basalmembran und werden von Perizyten umschlossen. Die den Kapillaren aufliegenden Perizyten sind kontraktile Zellen, die den Blutfluss regulieren (Attwell *et al.*, 2016).

1.1.2 Zelltypen des kardiovaskulären Systems

Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Analyse des Einflusses von Doxorubicin auf die Progenitorzellen von Endothelzellen und Kardiomyozyten liegt, werden ausschließlich diese beiden Zelltypen im Folgenden näher vorgestellt.

1.1.2.1 Endothelzellen

Endothelzellen kleiden alle Blutgefäße von den großen Arterien und Venen bis zu den kleinen Kapillaren aus. Sie stellen eine physikalische Barriere zwischen Blutkreislauf und Gewebe dar. Zur Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase sind Endothelzellen mit effektiven regenerativen Mechanismen ausgestattet (Wallez and Huber, 2008; Vanhoutte, 2010). Sie sind in vielen physiologischen Prozessen involviert. Dazu gehören u.a. die Regulation des Gefäßtonus, der Blutgerinnung und der Gefäßpermeabilität (Michiels, 2003). Im Rahmen einer Inflammation wird das Endothel aktiviert. Endothelzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle, wodurch Leukozyten am Endothelium adhären und in das Gewebe transmigrieren um z.B. Infektionen zu bekämpfen (Michiels, 2003). Damit sind Endothelzellen ebenfalls an der Regulation der Immunantwort eines Organismus beteiligt. Der Tonus der Gefäßmuskulatur und somit der Blutdruck, wird durch die Sezernierung vasoreaktiver Substanzen, wie Stickstoffmonoxid oder Prostacyclin durch Endothelzellen reguliert (Sandoo *et al.*, 2010). Zudem sind sie durch ihre Fähigkeit der Migration an komplexen vaskulären Remodellierungsprozessen beteiligt. Dazu gehören u.a. die Bildung neuer Blutgefäße (Vaskulogenese), das Wachstum neuer Blutgefäße aus vorhandenen (Angiogenese) und die Reparatur beschädigter Blutgefäße (Michaelis, 2014).

Aufgrund ihrer Barrierefunktion sind Endothelzellen konstant hohen Konzentrationen von im Blut enthaltenen toxischen Substanzen ausgesetzt. Kardiovaskuläre Erkrankungen beruhen

meist auf einer Dysfunktion des Endothels (Cai and Harrison, 2000). Typischerweise geht eine endotheliale Dysfunktion mit einem Anstieg von oxidativem Stress und einer reduzierten Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid einher (Cai and Harrison, 2000). Vermutlich trägt dies zur Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen, wie Bluthochdruck, Arteriosklerose, koronare Herzkrankheit und Herzversagen bei (Cai and Harrison, 2000; Rajendran *et al.*, 2013).

1.1.2.2 Kardiomyozyten

Im Herzen stellen Kardiomyozyten ca. 25-35 % der Zellen dar (Nag, 1980; Bergmann *et al.*, 2015) und weisen einen Volumenanteil von 75-80 % auf (Moore *et al.*, 1980; Vliegen *et al.*, 1991). Die Hauptaufgabe des Herzens ist es effizient Blut zu pumpen. Dies wird durch einen koordinierten Kontraktions- und Entspannungszyklus von Kardiomyozyten erreicht (Woodcock and Matkovich, 2005). Die Kontraktion der Kardiomyozyten wird durch Ionenkanäle und -austauscher reguliert, die den Calcium Ein- und Ausstrom in die Zelle und dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) steuern (Woodcock and Matkovich, 2005). Die Kontraktion eines Kardiomyozyten beginnt mit einer Membrandepolarisation, die zur Öffnung von spannungsabhängigen Natriumkanälen führt und somit einen Natriumeinstrom in die Zelle bewirkt. Danach öffnen sich Calcium-Kanäle und Calcium strömt in die Zelle ein. Dieses Calcium löst eine Calcium-Freisetzung aus dem SR über Ryanodinrezeptoren aus und führt zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Anschließend bindet Calcium an den Troponin-Komplex und aktiviert den Kontraktionsapparat (Knollmann and Roden, 2008), welcher sich aus Troponin, Aktin, Myosin und Titin zusammensetzt. Troponin, auch als Troponin-Komplex bezeichnet, besteht aus der Calcium-bindenden Komponente Troponin C, der inhibitorischen Komponente Troponin I und der Tropomyosin-bindenden Komponente Troponin T (Ohtsuki *et al.*, 1986; Nishii *et al.*, 2008). Zusätzlich wird die Myokardkontraktion durch Neurotransmitter, wie Acetylcholin und Noradrenalin, sowie durch Hormone, wie z.B. Schilddrüsenhormone (Klein, 1990) und Adrenalin, beeinflusst. Die zelluläre Relaxation entsteht durch die Entfernung von Calcium aus dem Zytosol. Dies erfolgt durch *calcium-uptake pumps* des SR und durch Natrium/Calcium-Austauschkanäle auf der Zellmembran (Knollmann and Roden, 2008).

Das adulte Herz besteht überwiegend aus ausdifferenzierten post-mitotischen Kardiomyozyten, die eine stark eingeschränkte Regeneration aufweisen. Zudem bleibt die Zellzahl der Kardiomyozyten nach der Geburt konstant, sodass die Zellen nur noch an Größe bzw. Volumen zunehmen. Kommt es zu einer Schädigung durch bspw. einen

Herzinfarkt, werden tote Kardiomyozyten nicht ersetzt sondern eine kollagenreiche Narbe durch Fibroblasten gebildet (Choi and Poss, 2012). Die Narbe kann jedoch die kontrahierenden Zellen nicht ersetzen, sodass es zu Arrhythmien und langfristig zu einer chronischen Herzinsuffizienz führt.

1.1.3 Regeneration

Die Regeneration ist ein natürlicher Prozess der Neubildung von Zellen, die abgestorbene oder verletzte Gewebeteile bzw. Zellen ersetzen. Die Erneuerungsrate der menschlichen Körperzellen unterscheidet sich je nach Zelltyp. Beispielsweise leben Erythrozyten ca. 115 Tage (Mock *et al.*, 2011), Hepatozyten 200-400 Tage (Macdonald, 1961) und Epithelzellen des Dünndarms 3-5 Tage (Sender and Milo, 2021). Lange wurde davon ausgegangen, dass Nervenzellen und Kardiomyozyten das gesamte Leben überdauern ohne sich zu erneuern. Neuere Forschungen hingegen zeigten, dass hippocampale Neurone (Spalding *et al.*, 2013) und Kardiomyozyten doch ein sehr geringes Regenerationspotential aufweisen (Bergmann *et al.*, 2009; Mollova *et al.*, 2013). Von außen verursachte Defekte in einem Gewebe können ebenfalls die Regeneration beeinflussen. Verantwortlich für den regenerativen Prozess sind Stammzellen (Abschnitt 1.2). Sie sind in organeigenen Stammzellnischen, dem Knochenmark oder dem Blut zu finden und werden über sezernierte lösliche Faktoren sowie Wachstumsfaktoren mobilisiert (Jones and Wagers, 2008). Stammzellen gewährleisten demnach einen Nachschub der benötigten Zellen, die durch Zelltodprozesse abgestorben sind. Wie bereits erwähnt, können jedoch nicht alle Zelltypen mit gleicher Effizienz erneuert werden. Daher gibt es vermehrt Indizien, dass eine Deregulation der gewebespezifischen Stammzellfunktion zu schwerwiegenden Folgen führt, wie Gewebedegeneration, Alterung und Tumorgenese (Jones and Wagers, 2008). Zudem können vaskuläre Dysfunktionen Folgen einer Veränderung des endogenen Stammzellpools sein. Bei Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit wurde eine Korrelation zwischen einer steigenden Anzahl an kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, Diabetes und Rauchen, und einer reduzierten, sowie in ihrer Funktion eingeschränkten, Anzahl an zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen beobachtet (Vasa *et al.*, 2001).

Beim Wundheilungsprozess von geschädigten Blutgefäßen sind neben den in der Gefäßwand befindlichen Zellen (Endothelzellen und glatte Muskelzellen) auch vaskuläre Stamm- und Progenitorzellen beteiligt (Evans *et al.*, 2021) (Abbildung 1.3). Nach einer Verletzung bzw. Schädigung des Blutgefäßes werden Endothelzellen durch pathologische

Reize aktiviert. Diese pathologischen Reize sind proangiogenetische Faktoren, wie der Chemokine *Fibroblast growth factor* (FGF), *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *Platelet derived growth factor* (PDGF), sowie der *transforming growth factor β* (TGF- β) (Risau, 1990). Plasmaproteine werden rekrutiert und erfüllen eine Platzhalter-Funktion bis die Migration der residenten Endothelzellen an die geschädigte Stelle erfolgt ist und diese dort proliferieren, um die Lücke zu schließen (Carmeliet, 2000). Gleichzeitig wird die Proliferation von glatten Muskelzellen angeregt, die zusammen mit den proliferierenden Endothelzellen an der Angiogenese, dem Prozess der Gefäßneubildung, beteiligt sind. Nachdem die Stabilität des Gefäßes sichergestellt ist, sezernieren Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO), um die Proliferation der glatten Muskelzellen zu unterdrücken (McDonald and Iruela-Arispe, 2015). Ein dysreguliertes Gefäßwachstum ist an der Pathogenese vieler Krankheiten beteiligt, u.a. Krebs, Arthritis, Erblindung, Autoimmunopathien und Arteriosklerose (Carmeliet, 2003; Spagnoli *et al.*, 2007).

Die sezernierten Chemokine können auch hämatopoetische Stammzellen des peripheren Blutes oder aus dem Knochenmark rekrutieren, welche sich neben Zellen des blutbildenden Systems auch zu Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Kardiomyozyten differenzieren können (Yeh *et al.*, 2003). Zudem sind an der Regeneration der Blutgefäße und der postnatalen Angiogenese residente Stamm- und Progenitorzellen in der Tunica adventitia beteiligt. Diese differenzieren sich in Endothelzellen, glatte Muskelzellen oder Makrophagen (Hu *et al.*, 2004; Zengin *et al.*, 2006; Pasquinelli *et al.*, 2007; Hoshino *et al.*, 2008; Passman *et al.*, 2008; Campagnolo *et al.*, 2010; Majesky *et al.*, 2011; Majesky *et al.*, 2012). Somit können diese Vorläuferzellen verschiedene strukturelle und funktionelle Aufgaben im Rahmen einer Verletzung oder als eine Antwort auf Stress übernehmen.

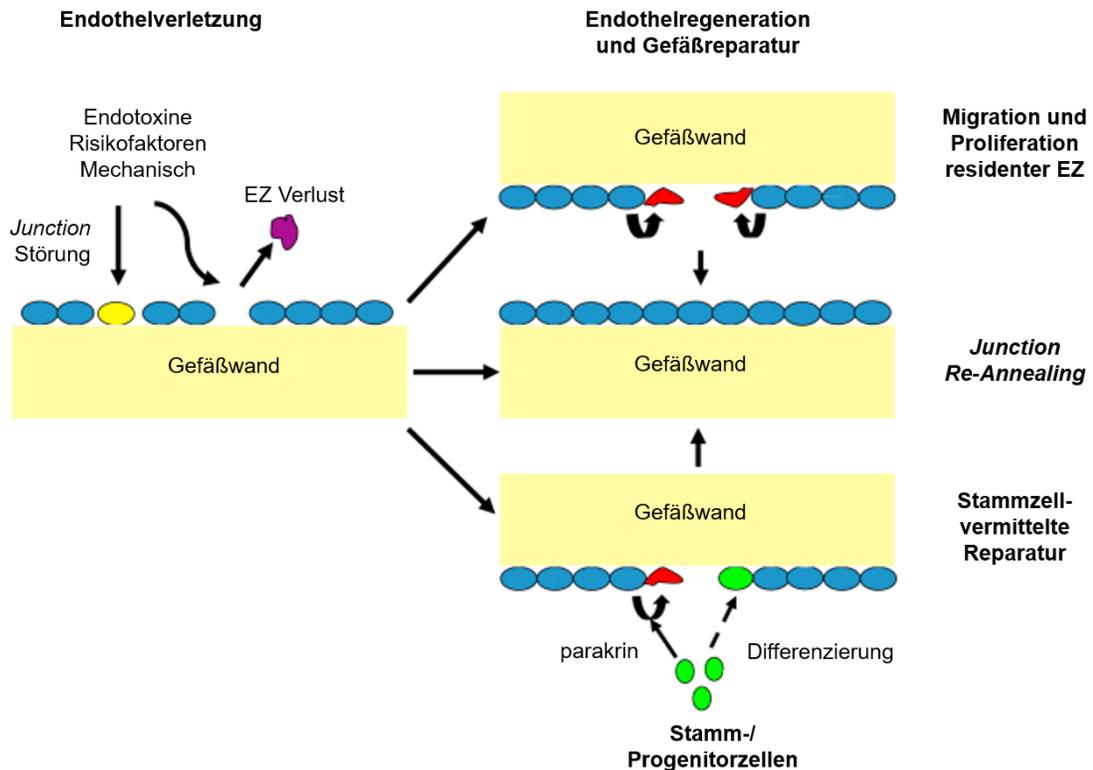


Abbildung 1.3: Prozess der Endothelregeneration und Gefäßreparatur.

Eine Endothelverletzung durch Inflammation (Endotoxine), Risikofaktoren oder mechanische Stimulation ist durch den Tod von EZ und der Störung von endothelialen Zell-Zell-Kontakten gekennzeichnet. Die Folge ist eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Der Reparaturprozess dieser semipermeablen Barriere beinhaltet die Wiederherstellung eines funktionierenden EZ *Monolayers* und der EZ-Verbindungen (*junctions*). Die Endothelregeneration wird durch die Migration und Proliferation residenter EZ erreicht. Zirkulierende Stamm-/Progenitorzellen aus dem Knochenmark tragen ebenfalls zur Gefäßreparatur bei. EZ: Endothelzellen. Abbildung modifiziert nach Evans *et al.* (Evans *et al.*, 2021).

1.2 Stamm- und Progenitorzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die über die Eigenschaften der Selbsterneuerung bzw. der unbegrenzten Vermehrung und der Differenzierung in andere Zelltypen verfügen (Abbildung 1.4). Dabei können sie sich entweder symmetrisch teilen, um zwei neue Stammzellen oder zwei differenzierte Zellen zu generieren, oder asymmetrisch, um eine neue Stammzelle und eine differenzierte Zelle zu erzeugen (Morrison and Kimble, 2006). Die Art der Zellteilung kann je nach Bedarf angepasst werden. So wird die symmetrische Zellteilung von Stammzellen u.a. während der frühen embryonalen Entwicklung benötigt, um große Stammzellpopulationen oder erneuerbare Gewebe zu erzeugen (Morrison and Kimble, 2006). Die asymmetrische Zellteilung dient der Gewebehomöostase (Yamashita *et al.*, 2010).

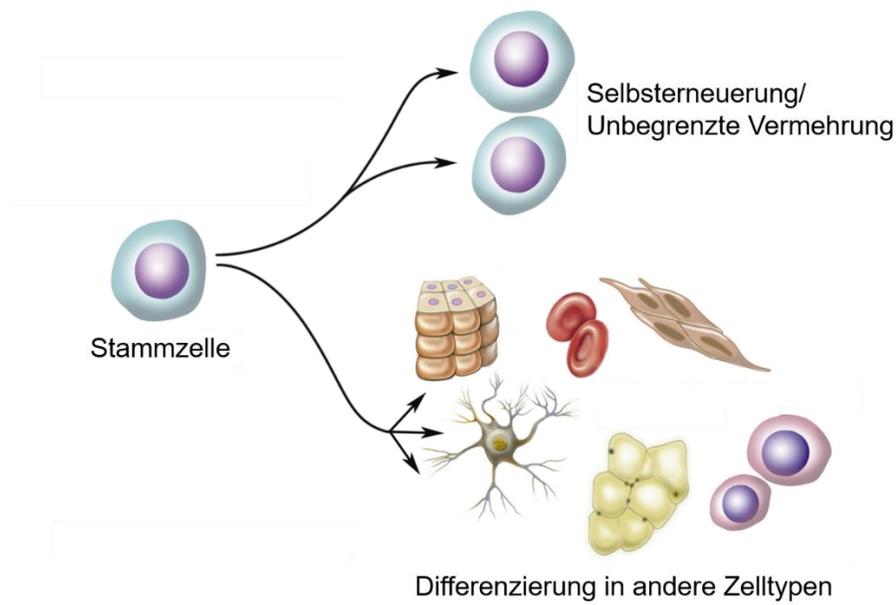


Abbildung 1.4: Eigenschaften einer Stammzelle.

Die charakteristischen Eigenschaften einer Stammzelle sind die Selbsterneuerung bzw. die unbegrenzte Vermehrung sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in andere Zelltypen. Zudem können Stammzellen sich je nach Bedarf symmetrisch oder asymmetrisch teilen. Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen entweder zwei neue Stammzellen oder zwei neue differenzierte Zellen. Die asymmetrische Zellteilung führt zur Bildung einer Stammzelle und einer differenzierten Zelle. Abbildung modifiziert nach <https://www.nationalmssociety.org/Research/Research-News-Progress/Stem-Cells-in-MS> [Stand: 24.05.2021].

Anhand ihres Differenzierungspotentials und ontogenetischen Entwicklungsstandes können die verschiedenen Stammzellpopulationen unterschieden werden. Ein totipotenten Differenzierungspotential weist die befruchtete Eizelle bis zum 8-Zell-Stadium auf. Aus ihr kann ein vollständiger, lebensfähiger Organismus gebildet werden. Embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen haben ein pluripotenten Differenzierungspotential. Sie können sich zu Zellen der drei Keimblätter, dem Ekto-, Endo- und Mesoderm, sowie zu Keimbahnzellen differenzieren. Zu den multipotenten Stammzellen gehören neonatale und adulte Stammzellen. Sie können sich in Zelltypen eines Keimblatts differenzieren. Ein Beispiel für multipotente Stammzellen sind hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks, welche eine Vielzahl der Zellen des Blut- und Immunsystems bilden (Morrison *et al.*, 1995). Progenitorzellen entstehen aus einer Stammzelle und differenzieren in spezifische Zelltypen eines Keimblatts. Sie können sich nur über einen kurzen Zeitraum selbsterneuern (Fuchs and Chen, 2013).

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) stammen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste eines Embryos. Vier bis fünf Tage nach der Fertilisation wird das Blastozystenstadium in der Embryogenese im Menschen erreicht, nach etwa 3,5 Tagen in Mäusen. Blastozysten lassen sich bei Mäusen aus dem Uterus herausspülen. Im Jahr 1981 wurden die ersten murinen embryonalen Stammzellen (mESC, *mouse embryonic stem cells*) von zwei unabhängigen Forschungsgruppen isoliert, in die Zellkultur überführt und in Kultur gehalten (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). mESC lassen sich *in vitro* nahezu unbegrenzt kultivieren und behalten ihren undifferenzierten Zustand durch die Zugabe des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF, *leukemia inhibitory factor*) zu dem Kultivierungsmedium bei (Smith and Hooper, 1987; Smith *et al.*, 1988). Alternativ kann die Kultivierung von mESC auf einem sogenannten *feeder-layer* aus murinen embryonalen Fibroblasten (MEF, *mouse embryonic fibroblast*) erfolgen, welche LIF sezernieren. Die Aufrechterhaltung der Stammzeleigenschaften der Pluripotenz und Selbsterneuerung erfolgt über die Aktivierung von drei Kinase-regulierten Signalwegen: dem *Janus kinase signal transducer and activator of transcription 3* (JAK-STAT3), der Mitogen-aktivierenden Proteinkinase/Extrazellulärer Signal-regulierten Kinase (MAPK/ERK) und der Phosphatidylinositol-3 Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) (Graf *et al.*, 2011).

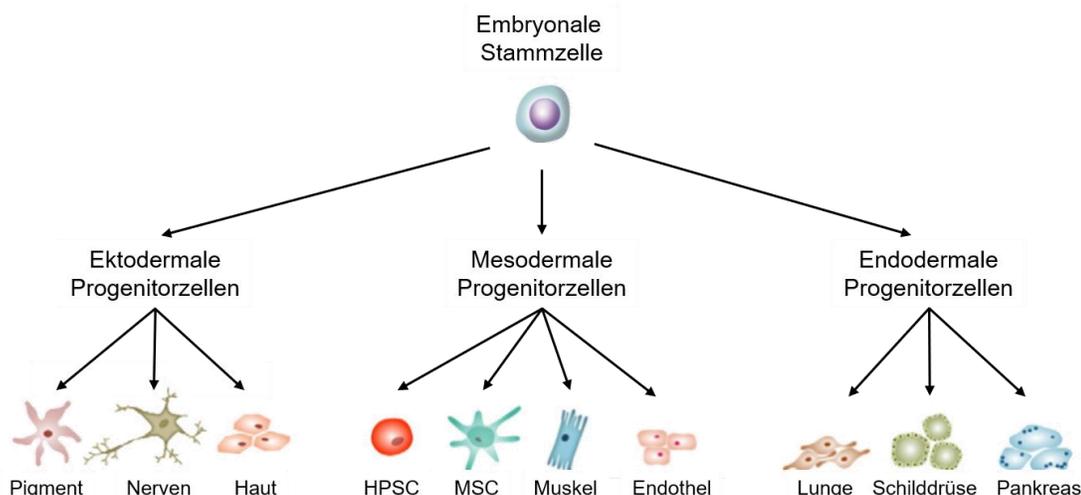


Abbildung 1.5: Differenzierungspotential embryonaler Stammzellen.

Embryonale Stammzellen sind pluripotent und können sich in Zellen aller drei Keimblätter differenzieren. In Zellen des Ektoderms (wie Pigment-, Nerven- und Hautzellen) über ektodermale Progenitorzellen, in Zellen des Mesoderms (wie HPSC, MSC, Muskel- und Endothelzellen) über mesodermale Progenitorzellen und in Zellen des Endoderms (wie Zellen der Lunge, der Schilddrüse und des Pankreas) über endodermale Progenitorzellen. Sie können ebenfalls zu Keimbahnzellen differenzieren (nicht dargestellt). HPSC: hämatopoetische Stammzelle, MSC: mesenchymale Stammzelle. Abbildung modifiziert nach Kaebisch *et al.* (Kaebisch *et al.*, 2015).

Die ersten humanen embryonalen Stammzellen (hESC, *human embryonic stem cells*) wurden 1998, mit dem Einverständnis der Eltern, aus der inneren Zellmasse von Blastozysten gewonnen, die von überzähligen Embryonen aus *in vitro*-Fertilisationen stammen (Thomson *et al.*, 1998). Die Nutzung dieser überzähligen Embryonen wird weitestgehend als akzeptabel angesehen, da diese für den Reproduktionsprozess nicht mehr benötigt werden und sonst verworfen würden (Bishop *et al.*, 2002). Aufgrund ethischer Bedenken gibt es allerdings unterschiedliche, länderspezifische Gesetzeslagen zur Gewinnung von hESC. In Deutschland ist die Gewinnung von hESC untersagt, die Nutzung jedoch erlaubt. Eine Möglichkeit die ethischen Bedenken der Nutzung von hESC zu umgehen bieten induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) (Abschnitt 1.2.5).

Die Möglichkeiten die sich durch die Kultivierung von ES-Zellen und ihre Differenzierung in andere Zelltypen *in vitro* ergeben, reichen vom Einsatz in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung (Laustriat *et al.*, 2010; Wobus and Loser, 2011) bis zur regenerativen Medizin für Zellersatztherapien. Mit ihrem pluripotenten Differenzierungspotential können sie sich in Zellen aller drei Keimblätter (Abbildung 1.5) und in Keimbahnzellen differenzieren. In der vorliegenden Arbeit wurden mESC über mesodermale Progenitorzellen in Endothel-ähnliche (EC, *endothelial-like cells*) und Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM, *cardiomyocyte-like cells*) differenziert. Auch humane iPSC wurden in dieser Arbeit über mesodermale Progenitorzellen in humane EC (hEC) differenziert. Die Auswirkungen einer genotoxischen Noxe, dem Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin, wurden auf diese kardiovaskulären Differenzierungsprozesse untersucht.

1.2.2 Progenitorzellen

Progenitorzellen, auch als Vorläuferzellen bekannt, sind differenziertere Zellen als Stammzellen, die sich in bestimmte Zelltypen eines Keimblatts differenzieren können. Im Gegensatz zu Stammzellen, die sich über einen langen Zeitraum selbsterneuern, können Progenitorzellen dies nur für einen kurzen Zeitraum (Fuchs and Chen, 2013). Sie dienen der Gewebekomöostase. Im Grunde sind Progenitorzellen adulte Stammzellen (Abschnitt 1.2.3).

Endotheliale Progenitorzellen (EPC, *endothelial progenitor cells*) wurden 1997 erstmals aus peripherem Blut isoliert (Asahara *et al.*, 1997). Die Zellen entstammen dem Knochenmark und weisen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein endotheliales sowie vaskulogenetisches Differenzierungspotential auf (Asahara *et al.*, 2011). Eine einheitliche und endgültige

Charakterisierung von EPC (Khakoo and Finkel, 2005; Fadini *et al.*, 2012) gibt es jedoch noch nicht. Vaskuläre Progenitorzellen, zu denen neben EPC auch Perizyten, mesenchymale Stammzellen und glatte Muskelprogenitorzellen gehören, sind essentiell für die Funktion, Aufrechterhaltung und Regeneration von Blutgefäßen (Lu and Li, 2018). Daher weisen sie ein vielversprechendes therapeutisches und diagnostisches Potential auf, v.a. zur Behandlung von vaskulären Erkrankungen.

1.2.3 Adulte Stammzellen

Das Schicksal multipotenter adulter Stammzellen ist bereits durch das Gewebe in dem sie vorkommen festgelegt. Ihr Differenzierungspotential beschränkt sich somit auf spezialisierte Zelltypen einer Abstammungslinie. Ein Beispiel sind hämatopoetische Stammzellen, die sich in alle Typen von Blutzellen differenzieren können. Im Gegensatz zu ES-Zellen sind adulte Stammzellen in vielen Geweben zu finden, wie dem Knochenmark (Pittenger *et al.*, 1999), Nabelschnurblut (Kogler *et al.*, 2004), Fettgewebe (Zuk *et al.*, 2002), Haut (Toma *et al.*, 2001), Gehirn (Sanai *et al.*, 2004), dem peripherem Blut (Kuznetsov *et al.*, 2001) oder auch zu geringen Anteilen im menschlichen Herzen (De Angelis *et al.*, 2010; Choi and Poss, 2012; Piegari *et al.*, 2013). Adulte Stammzellen dienen der Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und können in eingeschränktem Maße geschädigte Zellen ersetzen.

1.2.4 *In vitro* Differenzierung embryonaler und pluripotenter Stammzellen

Mittlerweile sind eine Vielzahl an *in vitro* Differenzierungen sowohl für mESC als auch für hESC sowie diverse andere Progenitorzellen und iPSC durchführbar. Eine Differenzierung von Stammzellen kann über die Bildung von dreidimensionalen Aggregaten, sogenannten *embryoid bodies* (EB), erfolgen oder in einer einschichtigen Ebene, einem sogenannten *Monolayer*. Der initiale Schritt einer Differenzierungsinduktion stellt die Entfernung von LIF dar. Dies geschieht bei der Kultivierung von Stammzellen auf einem *feeder-layer* durch die Entfernung der MEFs. In Medium-befüllten Bakterienkulturschalen können Stammzellen nicht anheften und es bilden sich EB. Alternativ können Stammzellen dort auch über die Methode der hängenden Tropfen, *hanging drops*, EB bilden (Keller, 1995). Bei der EB Methode handelt es sich um eine spontane und ungerichtete Differenzierung der Stammzellen, die zu einem Gemisch verschiedener Zelltypen der drei Keimblätter führt. Dabei entstehen auch kontraktile Kardiomyozyten, die im embryonalen Stammzelltest (EST)

in der Toxikologie als Prädikationsmodell für die Embryotoxizität von Chemikalien dienen (Scholz *et al.*, 1999; Genschow *et al.*, 2002).

Die Differenzierung der Stammzellen in einem *Monolayer* läuft durch die Zugabe von spezifischen Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen (*small molecules*) zu dem Kultivierungsmedium gerichtet ab. Das heißt die Differenzierung in einen bestimmten Zelltyp kann gesteuert werden. Bei dieser direkten Differenzierung können aufwändige Zwischen- bzw. Reinigungsschritte, wie die Generierung von EB und anschließende Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie, vermieden werden (Bahrami *et al.*, 2012). So lassen sich kontrolliert aus *in vitro* kultivierten ES-Zellen eine Vielzahl an Zelltypen differenzieren, bspw. Zellen des Gefäßsystems, wie Endothelzellen (Risau *et al.*, 1988; Yamashita *et al.*, 2000; Blancas *et al.*, 2008; Chiang and Wong, 2011), glatte Muskelzellen (Drab *et al.*, 1997) und Kardiomyozyten (Wobus *et al.*, 1991; Maltsev *et al.*, 1993; Guan *et al.*, 1999). Des Weiteren können ES-Zellen zu Zellen des blutbildenden Systems (Nishikawa *et al.*, 1998; Wiles and Johansson, 1999), des Nerven- (Bain *et al.*, 1995; Fairchild *et al.*, 2000; Park and Lee, 2007) und Knochensystems (Kramer *et al.*, 2000; Buttery *et al.*, 2001) sowie des Muskelsystems (Rohwedel *et al.*, 1994) differenziert werden, um einige Beispiele zu nennen. Zudem können diesen terminal differenzierten Zellen prototypische, zelltypspezifische Funktionen zugeordnet werden. *In vitro* differenzierte Endothelzellen bilden in der Kultur vaskuläre Strukturen, ähnlich den Blutgefäßen aus, in denen erste Blutzellen nachgewiesen wurden (Yamashita *et al.*, 2000). Differenzierte Kardiomyozyten konnten über ihre funktionellen und morphologischen Eigenschaften in Schrittmacher-, Vorhof-, Kammer- und Purkinje-Faserzellen unterschieden werden (Maltsev *et al.*, 1993; Rohwedel *et al.*, 1994; Hescheler *et al.*, 1997). Aus hESC differenzierte dopaminerge Neurone zeigen ein elektrisches Potential auf und schütten vermehrt Dopamin bei der Zugabe von Kaliumionen zum Medium aus (Park and Lee, 2007). Auch aus mESC differenzierte Inselzellen der Bauchspeicheldrüse produzieren Insulin nach der Zugabe von Glukose zu dem Medium (Lumelsky *et al.*, 2001). Diese Daten verdeutlichen, dass *in vitro* aus ES-Zellen differenzierte Zellen in ihren funktionalen Eigenschaften den entsprechenden Körperzellen ähneln. Sie stellen ein geeignetes Modellsystem zur Analyse von Entwicklungs- bzw. Differenzierungsprozessen und für toxikologische Untersuchungen dar.

1.2.5 Induzierte pluripotente Stammzellen

2006 wurden die ersten iPSC aus murinen Fibroblasten generiert/reprogrammiert (Takahashi and Yamanaka, 2006). Die ethischen Bedenken bei der Verwendung von hESC können durch humane iPSC (hiPSC) umgangen werden. Für die Beschreibung der Technik zur Reprogrammierung von somatischen Zellen bzw. die Generierung von iPSC wurde Yamanaka 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Bereits ein Jahr nach der Reprogrammierung von murinen Fibroblasten wurden 2007 die ersten adulten humanen Fibroblasten in hiPSC reprogrammiert (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). iPSC ähneln stark ES-Zellen aufgrund ihrer Morphologie, Proliferation, Selbsterneuerung, des pluripotenten Differenzierungspotentials sowie Genexpressionsprofilen (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Puri and Nagy, 2012). Jedoch zeigen sie unter bestimmten Bedingungen auch Unterschiede hinsichtlich ihrer Genexpression und des Differenzierungspotentials auf (Puri and Nagy, 2012).

Für die Pluripotenz einer Zelle ist vorrangig die Expression der Transkriptionsfaktoren Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct4), *Sex Determining Region Y-Box 2* (Sox2) und *Nanog homeobox* (Nanog) nötig. Sie gehören zu einem regulatorischen Netzwerk, welches mit anderen Genen interagiert, um die Pluripotenz und Selbsterneuerung der Zelle aufrechtzuerhalten aber auch die Differenzierung der Zelle zu reprimieren (Boyer *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Thomson *et al.*, 2011).

Zur Reprogrammierung werden Transkriptionsfaktoren in somatischen Zellen durch eine retrovirale Transduktion überexprimiert (Abbildung 1.6). Takahashi und Kollegen verwendeten für ihre retrovirale Transfektion die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2, *Proto-Oncogene c-Myc* (c-Myc) und *Krüppel-like factor 4* (Klf4) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Da es sich bei c-Myc um ein Protoonkogen handelt, welches Tumore auslösen kann (Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007), wurde es durch andere Transkriptionsfaktoren, wie Lin28 oder Nanog, ersetzt (Yu *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2008). Mittlerweile gibt es mehrere Methoden der Reprogrammierung, auch ohne eine retro- oder lentivirale Transduktion (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010; Kumar *et al.*, 2015).

Mit der erfolgreichen Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen zu hiPSC ergeben sich viele Anwendungsmöglichkeiten (Abbildung 1.6). Neben Untersuchungen zur Säugetierentwicklung können sie ein großes therapeutisches Potential aufweisen. Dieses reicht von der Erforschung von Krankheiten über eine personalisierte Behandlung mit hiPSC. Dabei können die personalisierten hiPSC für die Reparatur geschädigter Gewebe

eingesetzt werden oder für die Generierung differenzierter gesunder Zellen, ohne eine krankheitsauslösende Mutation. Allerdings müssen bis dahin noch einige Probleme überwunden werden, wie bspw. die Tumorigenität, Immunogenität und Heterogenität, auch wenn es bereits einige klinische Versuche gibt (Yamanaka, 2020). Des Weiteren eignen sich iPSC und daraus differenzierte Zellen für toxikologische und pharmakologische Untersuchungen, u.a. beim Wirkstoff-Screening zur Behandlung eines Krankheitsbildes.

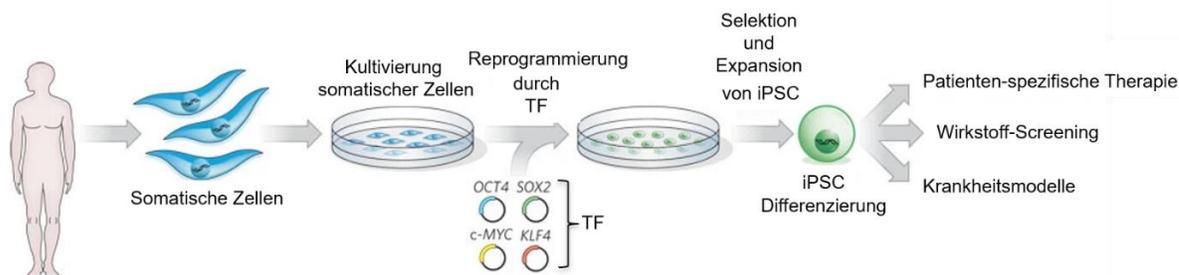


Abbildung 1.6: Reprogrammierung somatischer Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) und deren Anwendungsmöglichkeiten.

Somatische Zellen wurden einem Patienten entnommen und in Kultur gebracht. iPSC werden durch retrovirale Transfektion der somatischen Zellen mit den Pluripotenzfaktoren, den Transkriptionsfaktoren (TF) Oct4, Sox2, c-Myc und Klf4, generiert. Dabei werden die TF überexprimiert. Generierte iPSC werden selektioniert und expandiert. Diese (differenzierten) iPSC ermöglichen eine individuelle Behandlung von Patienten, Wirkstoff-Screenings bzw. pharmakologische und toxikologische Studien für die Behandlung von Erkrankungen sowie die Modellierung von spezifischen Erkrankungen. Oct4: Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4, Sox2: Sex Determining Region Y-Box 2, c-Myc: Proto-Oncogene c-Myc, Klf4: Krüppel-like factor 4. Abbildung modifiziert nach Yamanaka *et al.* (Yamanaka and Blau, 2010).

1.3 Genotoxin-Suszeptibilität kardiovaskulärer Zellen und deren Vorläufer

Das ganze Leben ist der Mensch einer Vielzahl an Giftstoffen ausgesetzt. Dazu gehören chemische Substanzen in Umwelt und Nahrung sowie Medikamente. Diese Exposition kann zu ernststen Risiken für das Individuum führen. Sie können gewebespezifische Schädigungen hervorrufen oder auch in der Entwicklung von Tumoren resultieren (Wobus and Loser, 2011). So ist bspw. bekannt, dass ein hoher Gehalt an Umweltgiften im Blut das Risiko für einen Schlaganfall erhöht. Dazu gehören Polychlorierte Biphenyle (PCB) und Insektizide, wie Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und Hexachlorbenzol (HCB), die über Lebensmittel aufgenommen wurden und zu Verkalkungen der Blutgefäße führen können (Lee *et al.*, 2012a; Ganna *et al.*, 2014; Salihovic *et al.*, 2016). Als natürliche Barriere zwischen dem Blut und dem Gewebe sind Endothelzellen permanent hohen Konzentrationen an systemischen

Noxen ausgesetzt. Um die vaskuläre Gesundheit und Funktion aufrechtzuerhalten, ist es wichtig, dass das vaskuläre Endothelium effektive Reparatur- und Regenerationsprozesse (Abschnitt 1.1.3) aufweist. Ineffektive Reparatur- oder Regenerationsprozesse können schwere Folgen für den Menschen haben und zu endothelialen Dysfunktionen führen. Ein Beispiel ist die Atherosklerose bei Patienten mit defektem Werner Syndrom Protein. Ein Defekt des Werner Syndrom Proteins führt zur Herunterregulation von Werner Syndrom Protein-assoziierten Basenexzisionsreparaturproteinen, welche die Funktion und Homöostase von Endothelzellen negativ beeinflusst (Laarmann *et al.*, 2019). Vaskuläre Dysfunktionen können durch verschiedene DNA-Schäden in den Zellen des Blutgefäßes entstehen. DNA-Schäden umfassen nicht nur spontane Schädigungen wie Replikationsfehler, Desaminierung oder Depurinierung, sondern auch Schäden aufgrund von Oxidation und in der Umwelt vorkommenden Chemikalien, welche alle repariert werden müssen. Viele bekannte Risikofaktoren, die mit Entstehung von Arteriosklerose assoziiert werden, wie Rauchen und Diabetes, können ebenfalls direkt DNA-Schäden induzieren (Mahmoudi *et al.*, 2006). Beispielsweise kann Rauchen u.a. oxidative DNA-Schäden auslösen und die DNA-Reparatur inhibieren (Mahmoudi *et al.*, 2006; Erhardt, 2009).

Im Rahmen einer Tumortherapie eingesetzte Medikamente, wie Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlung (IR, *ionizing radiation*), haben ebenfalls eine genotoxische Wirkung. Neben der beabsichtigten Schädigung der Tumorzellen, werden jedoch auch gesunde Zellen bzw. Gewebe geschädigt. Somit kann eine Tumortherapie ebenso negative Auswirkungen auf vaskuläre Funktionen haben. Beispielsweise werden strahlenbedingte Gefäßveränderungen als Ursache für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen (Hildebrandt, 2010; Lee *et al.*, 2012b). Ebenfalls ist Kardiotoxizität als Nebenwirkung vieler Tumortherapeutika bekannt, wie bei Anthrazyklin-Derivaten, Taxol, Trastuzumab und Tyrosinkinase-Inhibitoren (Yeh *et al.*, 2004). Neben den im Blutgefäß-befindlichen Zelltypen, wie Endothelzellen und glatte Muskelzellen, werden ebenfalls Stamm- und Progenitorzellen geschädigt. Beispielsweise wurde gezeigt, dass der im Knochenmark-befindliche Stammzellpool durch hohe Chemotherapeutika-Konzentrationen und IR-Dosen geschädigt wird. Dies führte zu einer reduzierten Regenerationsfähigkeit dieser Zellen (Cao *et al.*, 2011; Mendelson and Frenette, 2014). Ebenso könnten die Stamm- und Progenitorzellen in den Blutgefäßen und dem Herzen geschädigt und dezimiert werden, sodass deren Regenerationsfähigkeit massiv eingeschränkt wird.

1.3.1 Suszeptibilität gegenüber verschiedenen genotoxischen Noxen

Die Tumorthherapie besteht neben chirurgischen Eingriffen aus der Strahlentherapie in Form von IR und der antineoplastischen Chemotherapie. Die in der Chemotherapie eingesetzten Zytostatika verzögern oder verhindern die Zellteilung durch Beeinflussung des Stoffwechsels mittels unterschiedlicher Wirkmechanismen. Anhand ihrer Wirkmechanismen bzw. Angriffspunkte, lassen sich Zytostatika in Alkylanzien, Platinverbindungen, Interkalanzien, zytostatisch wirkende Antibiotika, Mitosehemmer, Antimetabolite und Topoisomerasehemmer unterteilen. Einige Zytostatika können mehreren Gruppen zugeordnet werden. In der Tumorthherapie werden neben den hier vorgestellten klassischen Zytostatika auch vermehrt zielgerichtete Substanzen, wie Hormonantagonisten, monoklonale Antikörper und Kinasehemmer verwendet (Aktories *et al.*, 2017). In der vorliegenden Arbeit werden die Tumorthapien in Form von IR und die Behandlung mit Chemotherapeutika, hier Anthrazyklinen, vorgestellt.

Eine Tumorthherapie mit IR erfolgt typischerweise über 25 bis 35 Sitzungen mit ca. 2 Gray (2 Gy) pro Sitzung bei 5 Dosen pro Woche, über einen Zeitraum von 5 bis 7 Wochen. Daraus resultiert eine kumulative Dosis von 50 bis 70 Gy (Ahmed *et al.*, 2014; Haslett *et al.*, 2014). Der Vorteil dieser Therapieform ist, dass das Bestrahlungsfeld sich auf die Region des Tumors begrenzt, auch wenn umliegendes gesundes Gewebe ebenfalls geschädigt werden kann. Die zelluläre Zielstruktur der Strahlentherapie sind intrazelluläre Makromoleküle, insbesondere die DNA (Iliakis, 1991; Maier *et al.*, 2016). Dabei kann IR direkt oder indirekt über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), durch die Radiolyse von Wasser, die DNA schädigen (Goodhead, 1994; Azzam *et al.*, 2012). Da die Zelle zu über 80 % aus Wasser besteht, ist es nicht verwunderlich, dass ca. 70 % der IR-induzierten DNA-Schäden indirekt über die Bildung von ROS entstehen (Santivasi and Xia, 2014). Bei den induzierten DNA-Schäden handelt es sich u.a. um Schäden im Zucker-Phosphat-Rückgrat, Basenschäden, wie Pyrimidin- und Purin-Basenmodifikationen, DNA-Vernetzungen, DNA-Einstrangbrüche (SSBs, *single-strand breaks*) oder DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs, *double-strand breaks*) (Roos and Kaina, 2013). 1 Gy verursacht ca. 1000 SSBs und 20-40 DSBs (Cadet *et al.*, 2008; Lomax *et al.*, 2013). Besonders residuale, nicht reparierte DSBs sind schädlich für die Zelle, da sie potente Auslöser des programmierten Zelltods sind (Roos and Kaina, 2013).

Bei der medikamentösen Tumorthherapie ist der gesamte Körper den Chemotherapeutika ausgesetzt, da das Chemotherapeutikum entweder intravenös oder in Form von Tabletten verabreicht wird. Der Behandlungszeitraum beträgt oft einige Monate. Folglich können viele Nebenwirkungen auftreten, die von Übelkeit und Erbrechen über Schleimhautschäden, peripheren Neuropathien bis zu zytotoxischen Effekten in Organen reichen, wie Hämato-, Hepato- oder Nephrotoxizität (Nurgali *et al.*, 2018).

1.3.2 Anthrazyklin-induzierte kardiovaskuläre Schäden

Anthrazykline sind essentielle Chemotherapeutika, die bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen eingesetzt werden, wie u.a. Brustkrebs, Lymphomen und Leukämien (Wang *et al.*, 1971; Blum and Carter, 1974; McGowan *et al.*, 2017). Die ersten Anthrazyklin-Derivate wurden aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius* isoliert (Cassinelli *et al.*, 1982). Anthrazykline zeichnen sich durch ihre Interkalation in die DNA aus und die Hemmung der Topoisomerase II (TopoII) Isoformen. Die Interkalation in die DNA führt zur Hemmung der Transkription und die Inhibition der TopoII zur Bildung von DSBs (Gewirtz, 1999). Daher ist ihre zytotoxische Wirkung vor allem in der S-Phase des Zellzyklus zu beobachten.

Eine ernstzunehmende und oft lebensbedrohliche Nebenwirkung der Tumorthherapie mit Anthrazyklin-Derivaten ist die irreversible und Dosis-abhängige Kardiotoxizität (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014). Abhängig von der kumulativen Dosis, erleiden bis zu 20 % der Patienten eine kongestive Herzinsuffizienz (Swain *et al.*, 2003). Weitere dosislimitierende Faktoren sind die Knochenmarksdepression (Wang *et al.*, 2006), Hepatotoxizität (Saad *et al.*, 2001; Deepa and Varalakshmi, 2003) und Nephrotoxizität (Injac and Strukelj, 2008). Weitgehend unklar sind jedoch die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Anthrazyklin-induzierten irreversiblen Typ I Kardiotoxizität.

1.3.2.1 Doxorubicin

Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums wird das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin zur Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen eingesetzt. Während der Krebstherapie wird Doxorubicin als schnelle Infusion verabreicht (Gewirtz, 1999). Die initialen Plasmakonzentrationen betragen zwischen 0,3-5 μM und sinken innerhalb einer Stunde auf 25–250 nM ab (Gewirtz, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde die klinische Situation berücksichtigt und für die Versuche Doxorubicin-Konzentrationen von bis zu 0,5 μM gewählt.

Klinisch relevante Dosen von 0,5-5 μM Doxorubicin führen zum dominanten DNA-schädigenden Mechanismus der Inhibition der TopoII Isoformen alpha (α) und beta (β), dessen Folge DSBs sind (Kaufmann and Hancock, 1995; Gewirtz, 1999). Die Aufgabe der TopoII Isoformen α und β ist das Einführen von reversiblen DSBs in die DNA, um topologische Spannungen durch DNA Verwicklungen während der Replikation, Transkription, DNA-Reparatur und der Chromatin Remodellierung zu lösen (Chen *et al.*, 2013). Doxorubicin bindet als TopoII-Gift irreversibel an die TopoII und verhindert die Religation der gebrochenen DNA-Enden des DSBs. Der TopoII-Doxorubicin-Komplex, auch spaltbarer Komplex (*cleavable complex*) genannt, ist kovalent an die DNA gebunden bis er von Proteasen erkannt und degradiert wird (Mao *et al.*, 2001). Sofern sie nicht repariert werden bleiben DSBs zurück, die toxisch für die Zelle sind und zum Zelltod führen (Lyu *et al.*, 2007). Da TopoII- α hauptsächlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, im Gegensatz zur TopoII- β Isoform dessen Expression sich über die gesamten Zellzyklusphasen erstreckt, werden proliferierende Zellen stärker durch Doxorubicin geschädigt (Goswami *et al.*, 1996). Aus diesem Grund werden die stärker proliferierenden Tumorzellen in der Krebstherapie mehr durch Doxorubicin geschädigt als gesunde Zellen. Allerdings könnte ähnliches auch für die proliferierenden Stammzellen zutreffen.

Weitere toxische Mechanismen die für Doxorubicin beschrieben wurden sind u.a. die Bildung von ROS. Jedoch wurden ROS *in vitro* erst ab Doxorubicin-Konzentrationen von 4 μM gemessen, welche keine klinisch relevanten Doxorubicin-Dosen für eine Tumorthherapie sind (Gewirtz, 1999). Weitere Hypothesen der Doxorubicin-vermittelten toxischen Mechanismen sind die Bildung von DNA-Addukten und Querverbindungen, die Interaktion mit Helikasen, sowie die DNA-Interkalation. Jedoch treten auch diese Mechanismen erst bei hohen, klinisch nicht relevanten Doxorubicin-Dosen auf (Gewirtz, 1999). Ebenso könnte Doxorubicin zu mitochondrialen Dysfunktionen führen, welche zur Kardiotoxizität beitragen (Abdullah *et al.*, 2019).

1.4 Zelluläre Stressantwort

In den nächsten Kapiteln werden die DNA-Schadensantwort, die DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz erläutert. Abschließend wird die zelluläre Stressantwort in Stammzellen dargelegt.

1.4.1 DNA-Schadensantwort

Zellen sind mit komplexen Mechanismen ausgestattet, um die genomische Integrität sicherzustellen. Diese Mechanismen erkennen DNA-Schäden und reagieren auf diese durch einleiten der sogenannten DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA damage response*). Es handelt sich dabei um einen Signaltransduktionsweg, der die Zellzyklustransition, DNA-Replikation, DNA-Reparatur und die Apoptose koordiniert (Cimprich and Cortez, 2008). Je nach Schweregrad des DNA-Schadens führt dies zum Zelltod (Apoptose), oder zum Zellüberleben über den Zellzyklusarrest, gefolgt von der DNA-Reparatur (Abbildung 1.7).

DNA-Schäden in Form von SSBs und DSBs können u.a. durch die bereits erwähnten Tumorthérapeutika entstehen. Die Serin/Threonin-Kinasen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) oder die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKc) werden durch DSBs oder SSBs aktiviert. Während ATM und DNA-PKc hauptsächlich an der Erkennung und Reparatur von DSBs beteiligt sind, wird ATR durch ein breites Spektrum an DNA-Schäden aktiviert, jedoch überwiegend durch SSBs bei einer blockierten Replikationsgabel (Cimprich and Cortez, 2008). An der Stelle des DNA-Schadens phosphorylieren die Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PKc das Histon H2AX (*H2A histone family, member X*) an seinem Serin 139 (γ H2AX) (Rogakou *et al.*, 1998; Harper and Elledge, 2007). Dies führt zur Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturfaktoren (Mah *et al.*, 2010). γ H2AX ist ein Surrogatmarker der DDR und indikativ für DNA-Schäden (Rogakou *et al.*, 1998; Olive, 2004; Lobrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013).

Je nach DNA-Schaden wird dieser von einem anderen Mediatorkomplex mediiert und ATM, ATR und DNA-PKc werden dorthin rekrutiert. Bspw. wird ein DSB vom MRN-Komplex (bestehend aus *Double-strand break repair protein MRE11* (Mre11), *DNA repair protein RAD50* (Rad50) und Nibrin (Nbs1)) erkannt und ATM daraufhin rekrutiert und aktiviert (Lee and Paull, 2005). Nach Aktivierung der Kinasen ATM oder ATR werden eine Reihe spezifischer Substrate phosphoryliert, welche an der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Apoptose und Seneszenz beteiligt sind. Die Checkpoint Kinasen 1 (Chk1) und 2 (Chk2) werden durch eine ATM/ATR-vermittelte Phosphorylierung aktiviert. Chk1 wird hauptsächlich durch ATR und Chk2 durch ATM phosphoryliert (Manic *et al.*, 2015). Als Folge wird der Zellzyklus an diversen Kontrollpunkten arretiert (Guo *et al.*, 2000; Matsuoka *et al.*, 2000). Bspw. wird über die nachgeschaltete Phosphorylierung des Tumorsuppressorproteins p53 der Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor p21 aktiviert, welcher den Zellzyklus am

Übergang von der G1- zur S-Phase inhibiert (Hoeflerlin *et al.*, 2011). Ein induzierter Zellzyklusarrest dient der Reparatur von DNA-Schäden. Sind diese jedoch zu umfangreich bzw. irreparabel erfolgt ein anhaltender Zellzyklusarrest, welcher die Einleitung der Seneszenz oder der Apoptose als Folge haben kann. Somit wird durch die DNA-Schadensantwort die Entscheidung zwischen Zellüberleben (Proliferation), Seneszenz und Zelltod (Apoptose) getroffen.

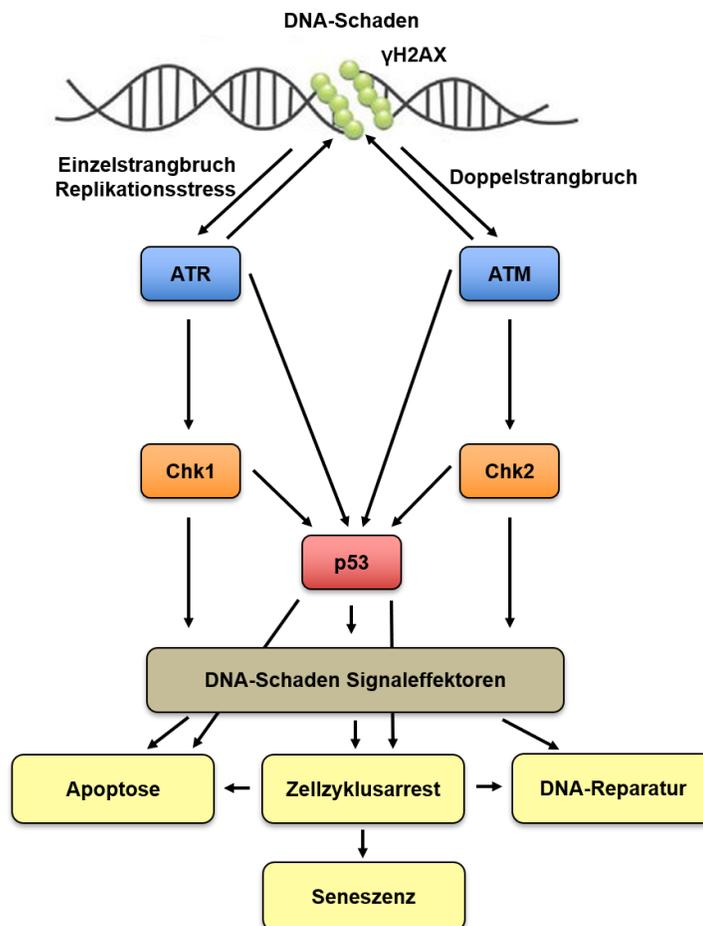


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.

Ein entstandener DNA-Schaden in Form eines Einzelstrangbruchs oder Replikationsstress wird von ATR und ein Doppelstrangbruch von ATM erkannt. Nach ihrer Aktivierung, aktivieren sie die jeweilige Checkpoint Kinase sowie *downstream* DNA-Schaden Signaleffektoren der DDR Signalwege. Ein Zellzyklusarrest erleichtert die DNA-Reparatur. Ein anhaltender Zellzyklusarrest aufgrund nicht-reparierter DNA-Schäden kann zur Einleitung der Apoptose oder der Seneszenz führen. ATR und ATM phosphorylieren zusätzlich H2AX, um das DNA-Schadenssignal zu verstärken. γ H2AX: an Serin 139 phosphoryliertes Histon H2AX, ATM: *ataxia telangiectasia mutated*, ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3 related*, Chk1: Checkpoint Kinase 1, Chk2: Checkpoint Kinase 2, DDR: DNA-Schadensantwort, *DNA damage response*. Abbildung modifiziert nach Christmann *et al.*, Maier *et al.*, Tsuiko *et al.* (Christmann *et al.*, 2003; Maier *et al.*, 2016; Tsuiko *et al.*, 2019).

1.4.2 DNA-Reparatur

Zellen verfügen über verschiedene DNA-Reparaturmechanismen, um ihre Erbinformation zu schützen. Der Reparaturmechanismus richtet sich nach der Art des DNA-Schadens und der Zellzyklusphase in der sich die Zelle befindet. In einem einzelnen Schritt können Alkylierungen der DNA mit Hilfe des Enzyms *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* (Mgmt) behoben werden, um Fehlpaarung mit Thymin zu verhindern. Eine Fehlpaarung würde zu Mutationen führen. Mgmt nimmt die Alkylierung des Guanins am O⁶-Atom selbst auf, wodurch der Schaden behoben ist und Mgmt allerdings irreversibel inaktiviert und degradiert wird (Christmann *et al.*, 2003). Die Alkylierung kann auch durch andere Reparatursysteme behoben werden, bei denen mehrere spezifische Faktoren beteiligt sind, wie durch die Fehlpaarungsreparatur (MMR, *mismatch repair*), Basenexzisionsreparatur (BER) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) (Drablos *et al.*, 2004). Weitere Reparaturmechanismen sind die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe End-Verknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*), welche DSBs reparieren.

Die MMR spielt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Auf kurze Zeit gesehen schützt die MMR Zellen vor der Mutagenese und auf lange Sicht vor der Tumorgenese (Li, 2008). Primär erkennt die MMR spezifisch Basenfehlpaarungen und Insertionen/Deletionen, die während der DNA Replikation und Rekombination entstanden sind (Li, 2008). Zusätzlich erkennt sie chemisch-induzierte DNA-Läsionen wie Intrastrang-Kreuzverbindungen durch Cisplatin oder UV-induzierte Photoprodukte (Mello *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999a). DNA-Läsionen werden über den MutS α -Komplex, bestehend aus MutS Homolog 2 (Msh2) und MutS Homolog 6 (Msh6), erkannt. Ein weiterer Proteinkomplex (MutL α) wird rekrutiert, der in der Nähe der Fehlpaarung einen Strangbruch induziert. Die Exonuklease I entfernt einen Teil des Stranges mit der Fehlpaarung, woraufhin DNA-Polymerasen den Strang neu synthetisieren und eine Ligase ihn verbindet (Christmann *et al.*, 2003).

DNA-Basenschäden bzw. DNA- Läsionen die durch Oxidation und Alkylierung entstehen, werden von der BER repariert (Christmann *et al.*, 2003). Erkannt werden die geschädigten Basen durch DNA-Glykosylasen, wie *N-methylpurine-DNA glycosylase* (Mpg), die diese herausschneiden und eine apurine/apyrimidine Stelle hinterlassen. Daraufhin schneidet die *Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1* (Apex1) das Phosphatrückgrat der DNA (Christmann *et al.*, 2003). Je nach Anzahl der beschädigten Basen wird ein *short-* oder *long-patch*

Reparaturweg eingeschlagen, welcher sich in den beteiligten Polymerasen, u.a. Poly (ADP-Ribose) -Polymerase 1 (Parp1), und Ligasen unterscheidet.

Die NER behebt sperrige DNA-Addukte sowie Interstrang-Kreuzverbindung, die u.a. durch UV-Licht und genotoxische Substanzen, wie das Zytostatikum Cisplatin, gebildet werden (Christmann *et al.*, 2003). An diesem Reparaturmechanismus sind ca. 30 Proteine beteiligt. Ähnlich wie bei der BER, gibt es zwei verschiedene Signalwege mit unterschiedlich beteiligten Reparaturfaktoren. Ein Signalweg ist die globale genomische Reparatur, die überwiegend transkriptionsunabhängig agiert. Sie erkennt DNA-Läsionen in den transkriptionell inaktiven Bereichen des Genoms mittels Proteinkomplexen, u.a. bestehend aus *Xeroderma pigmentosum, complementation group A* (Xpa) und *Xeroderma pigmentosum, complementation group C* (Xpc) (Sugasawa *et al.*, 1998). Bei dem zweiten Signalweg, der transkriptionsgekoppelten Reparatur, werden transkriptionsblockierende DNA-Schäden in den transkriptionell aktiven Genbereichen behoben (Bohr *et al.*, 1985). Die durch den Schaden blockierte RNA Polymerase II wird durch die Rekrutierung von *Cockayne syndrome type A protein* (CSA) und *Cockayne syndrome type B protein* (CSB) an die Läsionsstelle von dieser Läsion entfernt. Nachfolgende Reparaturproteine erhalten nun Zugang zur Läsionsstelle (Nakatsu *et al.*, 2000). In beiden NER Signalwegen wird der Transkriptionsfaktor TFIIH mit den Helikasen *Xeroderma pigmentosum, complementation group B* (Xpb) und *Xeroderma pigmentosum, complementation group D* (Xpd) zur Läsion rekrutiert, um die DNA zu entwinden. Anschließend schneiden die Endonukleasen *Xeroderma pigmentosum, complementation group G* (Xpg) und *Xeroderma pigmentosum, complementation group F* (Xpf)/*Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1* (Ercc1) ein ca. 27-29 Basen-umfassendes Nukleotid aus dem DNA-Strang. Darin enthalten ist der DNA-Schaden. Anschließend erfolgt die Neusynthese der entfernten Nukleotide am DNA-Strang durch Polymerasen. Die abschließende Ligation erfolgt durch die DNA-Ligase I (Aboussekhra *et al.*, 1995; Mu *et al.*, 1995; Araujo *et al.*, 2000).

DSBs sind besonders kritisch für die Zelle, da bereits ein einzelner nicht reparierter DSB ausreicht, um die Apoptose zu induzieren (Rich *et al.*, 2000). Die Reparatur kann über die fehlerfreie HR, während der S- und G2-Phase des Zellzyklus, oder über die fehleranfälligere NHEJ, überwiegend während der G0/G1-Phase des Zellzyklus, erfolgen (Abbildung 1.8). In Säugetieren ist die NHEJ der dominierte Signalweg zur Reparatur von DSBs (Haber, 2000; Cromie *et al.*, 2001).

Die HR benötigt ein Schwesterchromatid als Vorlage (*template*), um den DSB zu reparieren. Erkannt wird der DSB durch den MRN-Komplex, welcher mit *C-terminal binding protein-interacting protein* (CtIP) die 5'-3' End-Resektion fördert (Sartori *et al.*, 2007). Die so generierte überhängende Einzelstrang-DNA wird von einem heptameren Ringkomplex aus Rad52 Proteinen gebunden und somit vor einer Degradation durch Endonukleasen geschützt (Stasiak *et al.*, 2000). *Replication protein A* (RPA) stabilisiert diese Einzelstrang-DNA zusätzlich (Eggleter *et al.*, 2002). Rad52 interagiert mit Rad51 und RPA. Mit Hilfe von Rad52 wird auf dem einzelsträngigen DNA-Segment RPA durch Rad51 ersetzt, sodass ein Nukleoproteinfilament entsteht (Benson *et al.*, 1998; McIlwraith *et al.*, 2000). Rad51 vermittelt den Strangaustausch mit dem Schwesterchromatid, um die passenden homologen Sequenzen zu finden. Dabei handelt es sich um eine Stranginvasion des Einzelstranges in das unbeschädigte Schwesterchromatid (Baumann and West, 1997). Anhand des entstandenen sogenannten *D-loops* erfolgt die Synthese der neuen DNA. Der entstandene Komplex aus den beiden DNA-Helices, enthält sogenannte Hollidaystrukturen, die nun aufgelöst werden, damit die neu synthetisierten DNA-Abschnitte ligiert werden können (Christmann *et al.*, 2003) (Abbildung 1.8).

Bei der NHEJ werden die stumpfen oder komplementären Enden der DNA lediglich mittels DNA-Ligase IV wieder verbunden (Critchlow and Jackson, 1998; Cromie *et al.*, 2001). Initiiert wird die NHEJ durch die Bindung des Ku70/Ku80 Heterodimers an die DNA-Enden. Das Heterodimer assoziiert mit der DNA-PKc, was zur Aktivierung der DNA-PK führt (Gottlieb and Jackson, 1993). Daraufhin wird *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4* (Xrcc4) aktiviert, wodurch Xrcc4 einen stabilen Komplex mit der DNA-Ligase IV bildet, welcher die Enden der DNA-Moleküle bei homologen Überhängen direkt miteinander verknüpft (Lee *et al.*, 2003). Bei DSBs mit nicht-homologen Überhängen kann der Bruch nicht direkt religiert werden. Er muss erst über den MRN-Komplex prozessiert werden, welcher eine Exonuklease-, Endonuklease- und Helikaseaktivität besitzt, um die 3'-Überhänge der DNA zu entfernen (Trujillo *et al.*, 1998; Paull and Gellert, 1999). *Flap structure-specific endonuclease 1* (Fen1) ist für die Entfernung der 5'-Überhänge verantwortlich (Christmann *et al.*, 2003). Anschließend werden die freien Enden durch den stabilen Komplex aus Xrcc4 und Ligase IV miteinander verknüpft (Abbildung 1.8).

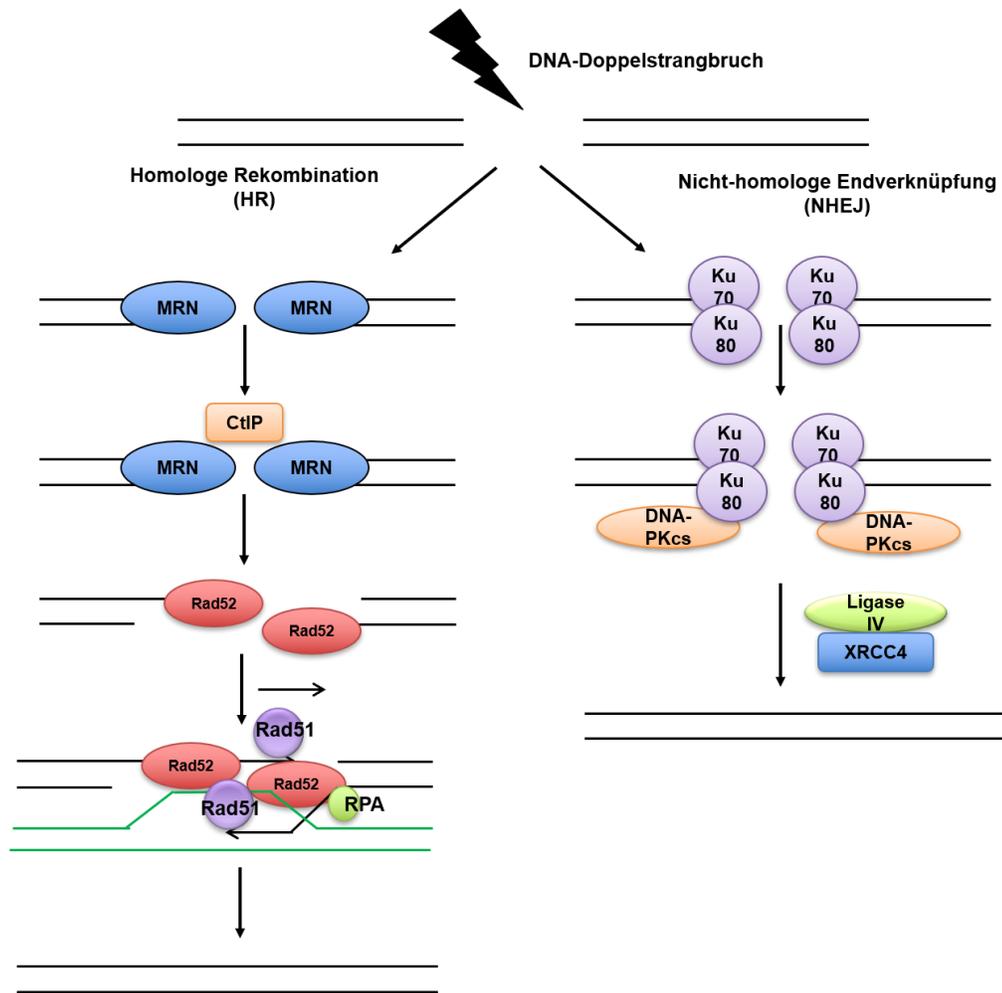


Abbildung 1.8: Mechanismus der homologen Rekombination (HR) und der nicht-homologen End-Verknüpfung (NHEJ).

Erklärungen im Text. MRN: Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex, RPA: *Replication protein A*, DNA-PKcs: katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, Xrcc4: *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*. Abbildung modifiziert nach Christmann *et al.* (Christmann *et al.*, 2003).

1.4.3 Apoptose und Seneszenz

Die Apoptose ist der programmierte Zelltod und ein weiterer Schutzmechanismus eines Organismus, um sich vor mutierten und stark geschädigten Zellen zu schützen. Leitet eine Zelle die Apoptose ein, schrumpft sie und ihre DNA wird kondensiert und degradiert. Die Mitochondrien werden abgebaut und die Zelle wird in membranumhüllte Apoptosekörper, sogenannte *apoptotic bodies*, fragmentiert. Makrophagen erkennen so die dem Zelltod bestimmte Zelle und phagozytieren sie (Martin *et al.*, 1995).

Die Apoptose kann über den extrinsischen Weg oder den intrinsisch, Mitochondrien-vermittelten Weg induziert werden. Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung eines Liganden an die Todesrezeptoren ausgelöst. Der intrinsische, Mitochondrien-vermittelte Signalweg wird durch DNA-Schäden ausgelöst und spielt bei IR-, Zytostatika- oder ROS-induzierten DNA-Schäden eine Rolle. Die intrinsische Apoptose wird über Vertreter der Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*)-Genfamilie, wie z.B. *Bcl2-associated X protein* (Bax), *Bcl2-binding component 3* (Puma) und *Bcl2-homology 3* (Noxa), kontrolliert und reguliert. Sie steuern die Permeabilität der Mitochondrienmembran (Cory and Adams, 2002). Durch Chk1/Chk2, sowie ATM/ATR, wird p53 phosphoryliert und akkumuliert, woraufhin pro- und anti-apoptotische Gene in ihrer Expression reguliert werden (Roos and Kaina, 2013). Somit übernimmt der Transkriptionsfaktor p53 sowohl eine protektive Rolle durch die Förderung der DNA-Reparatur, als auch eine Rolle bei der Förderung der Apoptose. Die nukleäre Akkumulation von p53 aktiviert die Expression der pro-apoptotischen Proteine Bax, Puma und Noxa (Kuribayashi *et al.*, 2011). Daher ist es bei starker, langanhaltender Aktivierung von p53 wahrscheinlicher, dass die Zelle die Apoptose einleitet, als in einen transienten Zellzyklusarrest überzugehen (Vousden, 2000). Unter normalen Bedingungen lagert sich Bcl2 in der Mitochondrienmembran ein, um die Durchlässigkeit der Membran für Cytochrom C zu hemmen. Bei Einleitung der Apoptose lagert sich stattdessen Bax in die Mitochondrienmembran ein, wodurch die Membran durchlässiger für Cytochrom C wird (Maier *et al.*, 2016). Durch die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol entsteht ein Apoptosom, zusammengesetzt aus Cytochrom C, *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1) und Procaspase 9 (Cain *et al.*, 2000). Anschließend aktiviert die Initiatorcaspase 9 die Effektorcaspasen 3 und 7. Dies führt letztendlich zu einer post-mitochondrial-vermittelten Caspase-Kaskade (Maier *et al.*, 2016).

Neben Telomerverkürzungen können auch DNA-Schäden die zelluläre Seneszenz auslösen. Diese wird auch als replikative Seneszenz bezeichnet (von Zglinicki *et al.*, 2005). Telomerverkürzungen finden während des normalen Alterungsprozesses statt. Senescente Zellen bleiben trotz irreversiblen Zellzyklusarrests metabolisch aktiv (Maier *et al.*, 2016). Da diese Zellen in ihrer Zellteilung inhibiert sind, können enthaltene Mutationen nicht an die Nachkommen weitergegeben werden. Neben dem Zellzyklusarrest weisen senescente Zellen eine andere Morphologie und Eigenschaften auf, wie eine höhere Aktivität der β -Galaktosidase. Der Seneszenz-bedingte Zellzyklusarrest wird durch einen p53- oder p16-abhängigen Signalweg aktiviert (Roos *et al.*, 2016). P53 aktiviert p21, ein CDK-Inhibitor,

wodurch die Zelle in der G1-Phase arretiert. Über die p16-vermittelte Seneszenz werden die Zellen am Übergang von der G1- in die S-Phase gehindert (Maier *et al.*, 2016).

1.4.4 Zelluläre Stressantwort in Stammzellen

Die zelluläre Stressantwort in Stammzellen unterscheidet sich von der in somatischen Zellen. Dies liegt daran, dass die Zellen unterschiedliche Aufgaben und dementsprechende Funktionen haben. Stammzellen müssen die genomische Stabilität sowie genomische Integrität über mehrere Generationen sicherstellen und aufrechterhalten (Stambrook, 2007), damit der Organismus sich fehlerfrei entwickeln kann. Bei der Entwicklung spielt die Differenzierung von Stammzellen eine entscheidende Rolle. Kommt es zu einer Störung des streng regulierten, komplexen sowie räumlich und zeitlich festgelegten Prozesses der Entwicklung, kann dies zu einer Entwicklungstoxizität führen. Die Folgen sind Geburtsfehler oder embryonale Sterblichkeit (Kupsco and Schlenk, 2015). Früh in der Entwicklung auftretende schädliche Mutationen können neben einer embryonalen Letalität auch zu angeborenen Krankheiten führen (Stambrook, 2007). Daher müssen ES-Zellen mit hoch effizienten Mechanismen ausgestattet sein, um sich gegen DNA-Schäden zu schützen und um erfahrene Schäden zu reparieren (Saretzki *et al.*, 2004; Saretzki *et al.*, 2008). Dies erklärt warum ES-Zellen eine geringere Mutationsrate im Vergleich zu somatischen Zellen (MEFs) aufweisen (Cervantes *et al.*, 2002). Somatische Zellen haben einen relativ instabilen Zustand und eine erhöhte Mutationsanzahl (Kirkwood, 1977). Beispielsweise haben MEFs eine ca. 100-fach höhere Frequenz an Mutationen sowie mitotischer Rekombination im Vergleich zu ES-Zellen (Cervantes *et al.*, 2002; Stambrook, 2007). DNA-Schäden in somatischen Zellen haben keine direkten Folgen für den Organismus. Dennoch führen hohe somatische Mutationsraten zu somatischen Krankheiten, welche die Lebensdauer limitieren können. Die Unterdrückung der Mutagenese in ES-Zellen scheint einer der Mechanismen zu sein, um ihre genomische Integrität zu bewahren. Allerdings ist dieser alleine nicht ausreichend (Tichy and Stambrook, 2008). ES-Zellen sind hypersensitiv gegenüber DNA-schädigenden Stoffen und leiten relativ schnell die Apoptose oder Differenzierung ein, um die geschädigte Zelle aus dem pluripotenten Stammzellpool zu entfernen (Van Sloun *et al.*, 1999; de Waard *et al.*, 2003; Tichy and Stambrook, 2008). Somit bleibt der Stammzellpool unversehrt. Außerdem fehlt ES-Zellen durch eine teilweise Sequestration von p53 im Zytoplasma ein funktionaler G1-Kontrollpunkt, wodurch geschädigte Zellen direkt in die S-Phase des Zellzyklus übergehen und sich der Schaden über mehrere Replikationsrunden

verschlimmert. Auf diesem Wege wird die Apoptose dieser Zellen eingeleitet (Aladjem *et al.*, 1998; Tichy and Stambrook, 2008).

Des Weiteren weisen ES-Zellen verstärkte DNA-Reparaturprozesse bzw. eine Überexpression von einigen Reparaturgenen auf, wie z.B. Rad51 und Msh2 (Tichy and Stambrook, 2008; Tichy *et al.*, 2011). Für die Reparatur von DSBs verwenden ES-Zellen vorwiegend die HR, während somatische bzw. differenzierte Zellen DSBs überwiegend mittels NHEJ reparieren (Adams *et al.*, 2010; Stambrook and Tichy, 2010; Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2012). In hämatopoetischen Stammzellen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (Kraft *et al.*, 2015; Biechonski *et al.*, 2018). Rad51, ein Hauptspieler der HR, zeigt in ES-Zellen eine ca. 20-fach höhere Proteinexpression als in MEFs (Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum Reparaturprozess der NHEJ ist die HR fehlerfrei. Dies scheint für ES-Zellen enorm wichtig zu sein, da sie eine hohe Anzahl an basalen γ H2AX-Foci aufweisen (Tichy and Stambrook, 2008), welche indikativ für DSBs sind. Zusätzlich spielt die MMR eine wichtige Rolle in der DNA-Schadensreparatur von ES-Zellen, da diese im Vergleich zu Fibroblasten eine verstärkte Expression von Msh2 aufzeigen (Roos *et al.*, 2007; Momcilovic *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2014). Für Gene deren Produkte an der Reparatur von DNA-Schäden über die BER oder NER beteiligt sind, konnten bislang keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Diese Daten veranschaulichen, dass sich ES-Zellen bezüglich ihrer zellulären Stressantwort deutlich von differenzierten, somatischen Zellen unterscheiden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die irreversible und Dosis-abhängige Kardiotoxizität ist eine ernstzunehmende und oft lebensbedrohliche Nebenwirkung bei einer Tumorthherapie mit Anthrazyklinen, wie dem Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014). Weitgehend unklar sind jedoch die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität und die besonders relevanten Zelltypen. Anthrazykline können neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten und Endothelzellen (Wolf and Baynes, 2006; Wilkinson *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2016; Gambardella *et al.*, 2017), sowie die geringe Anzahl im Herzen vorkommender kardialer Progenitorzellen schädigen (De Angelis *et al.*, 2010; Choi and Poss, 2012; Piegari *et al.*, 2013). Zum regenerativen Prozess des Herzens tragen vermutlich u.a. Stammzellen des Knochenmarks bei (Orlic *et al.*, 2001).

Durch ihre systematische Barrierefunktion sind vor allem Endothelzellen konstant hohen Konzentrationen von toxischen Substanzen und damit Schädigungen ausgesetzt.

Endothelzellen weisen effektive regenerative Mechanismen zur Aufrechterhaltung der endothelialen Homöostase auf (Wallez and Huber, 2008; Vanhoutte, 2010). Eine unzureichende Reaktion von endothelialen Progenitorzellen auf eine Doxorubicin-induzierte Schädigung könnte regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigen und so zu chronischen Herzschäden führen (Prezioso *et al.*, 2010).

Vor diesem Hintergrund bietet sich ein toxikologisches *in vitro*-Modellsystem an, welches das 3R-Prinzip zur Vermeidung (*replacement*), Verringerung (*reduction*) und Verbesserung (*refinement*) von Tierexperimenten unterstützt. Aus diesem Grund wurden pluripotente Stammzellen gewählt, die sich *in vitro* in verschiedene Zelltypen differenzieren lassen.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss des Anthrazyklin-Derivates Doxorubicin auf kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse näher zu untersuchen. Dabei sollte zunächst, neben der bereits etablierten und angepassten Endothelzeldifferenzierung (Hennicke *et al.*, 2015) von murinen embryonalen Stammzellen (mESC, *mouse embryonic stem cells*), eine Kardiomyozytendifferenzierung für die murine Stammzelllinie LF2 (Nichols *et al.*, 1990) etabliert werden. Neben zelltypspezifischen Eigenschaften sollten ebenfalls basale Genexpressionsmuster von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren, die an der Regulation von Stress-induzierbaren Signalwegen, der Zellzyklusregulation, dem Zelltod und der DNA-Reparatur beteiligt sind, in mESC und den differenzierteren kardiovaskulären Zelltypen vergleichend analysiert werden. Anschließend sollte die Empfindlichkeit von mESC und daraus differenzierten Progenitor- und terminal differenzierten kardiovaskulären Zellen gegenüber Doxorubicin ermittelt werden. Im Doxorubicin-sensitivsten Zelltyp sollte nachfolgend die molekulare Wirkung von Doxorubicin auf das Differenzierungspotential in Hinblick auf zelltypspezifische Eigenschaften und Funktionen untersucht werden.

Des Weiteren sollte die Kultivierung und eine Endothelzeldifferenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC, *human induced pluripotent stem cells*) der Stammzelllinie b4 (Wang and Adjaye, 2011) etabliert werden. Dabei sollten zunächst insbesondere die zelltypspezifischen Eigenschaften der differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen (hEC) gewährleistet werden. Inwieweit sich hiPSC und daraus differenzierte hEC in ihrem basalen Genexpressionsmuster von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren unterscheiden, sollte ebenfalls untersucht werden. Zusätzlich sollte der Einfluss von Doxorubicin auf die Viabilität von hiPSC und Progenitor hEC analysiert werden und in welchem Ausmaß das Differenzierungspotential von Progenitorzellen durch Doxorubicin Exposition beeinträchtigt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Herstellernachweise

Tabelle 2.2.1: Auflistung der Herstellerhauptstandorte.

Hersteller	Hauptsitz
Abcam	Cambridge, UK
Active Motif	La Hulpe, Belgien
Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Andreas Hettich GmbH & Co.KG	Tuttlingen, Deutschland
Ansell	Richmond, Australia
AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
baseclick GmbH	Tutzing, Deutschland
BD Pharmingen™ (Becton, Dickinson and Company)	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Becton, Dickinson and Company	Franklin Lakes, New Jersey, USA
Bethyl Laboratories, Inc.	Montgomery, Texas, USA
BINDER GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Bioline	London, UK
Bio-Rad	Hercules, Kalifornien, USA
BioSurplus	San Diego, Kalifornien, USA
BMG Labtech GmbH	Offenburg, Deutschland
BRAND GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Calbiochem®, Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Cell Pharm GmbH	Hannover, Deutschland
Cell Signaling Technology	Cambridge, UK
Clarivate Analytics	Boston, Massachusetts, USA
Corning	Corning, New York, USA
eBioscience, Inc.	San Diego, Kalifornien, USA
Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

Eurofins Genomics	Huntsville, Alabama, USA
GE Healthcare™	Little Chalfont, UK
Gilson®	Middleton, Wisconsin, USA
GK Sondermaschinenbau GmbH Labortechnik Medingen	Arnsdorf, Deutschland
GraphPad	La Jolla, Kalifornien, USA
Greiner Bio-One International AG	Kremsmünster, Österreich
IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Infactory PEARL. GmbH	Buggingen, Deutschland
Kälte-Berlin	Berlin, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern, Deutschland
Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach an der Riß, Deutschland
Life Technologies	Carlsbad, Kalifornien, USA
Memmert GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
Microsoft	Redmond, Washington, USA
Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH	Heidelberg, Deutschland
New England Biolabs	Frankfurt am Main, Deutschland
Nordion International Inc.	Ottawa, Ontario, Kanada
Olympus	Shinjuku, Japan
Oncogene Research Products	La Jolla, Kalifornien, USA
OriGene Technologies, Inc.	Rockville, Maryland, USA
PAN™ Biotech	Aidenbach, Deutschland
Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Pechiney Plastic Packaging, Inc.	Chicago, Illinois, USA
PeproTech®	Rocky Hill, Connecticut, USA
Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen, Deutschland
PromoCell® GmbH	Heidelberg, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Ratiolab	Dreieich, Deutschland
Roche Diagnostic GmbH	Mannheim, Deutschland
Rockland Immunochemicals	Limerick, Pennsylvania, USA

Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Dallas, Texas, USA
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Schott AG	Mainz, Deutschland
Scientific Industries Inc.	Bohemia, New York, USA
Selleck Chemicals	Houston, Texas, USA
SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Starlab	Hamburg, Deutschland
Systemec GmbH	Wettenberg, Deutschland
Taylor-Wharton	Mildstedt, Deutschland
Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz
Vector Laboratories	Burlingame, Kalifornien, USA
VWR International GmbH	Radnor, Pennsylvania, USA

2.1.2 Geräte

Tabelle 2.2: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
Absaugstation MINI-VAC ECO	Peqlab Biotechnologie GmbH
Autoklav Systemec VX-95	Systemec GmbH
Blottingsystem Mini Trans-Blot [®] Cell	Bio-Rad
CFX96 [™] Real-time PCR Detection System	Bio-Rad
CO ₂ -Inkubator C150	BINDER GmbH
Dokumentationssystem ChemiDox [™] Touch imaging system	Bio-Rad
Durchflusszytometer BD Accuri [™] C6	Becton, Dickinson and Company
Eismaschine Manitowoc	Kälte-Berlin
Feinwaage Kern ABS	Kern & Sohn GmbH
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus
Fluoreszenzmikroskop (Invers) CKX41	Olympus
Gammacell 1000 Elite Bestrahlungsgerät	Nordion International Inc.

Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Gefrierschrank Premium NonFrost (-20 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH
Gelelektrophoreseapparatur Mini	Bio-Rad
Heizplatte/Magnetrührer Combimag RET	IKA-Werke GmbH & Co. KG
Kühlschrank Comfort	Liebherr-International Deutschland GmbH
Kühlzentrifuge MIKRO 200 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG
Mikroliterpipetten PIPETMAN® classic 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Gilson
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® 200pro	Tecan Group AG
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite® F200	Tecan Group AG
Mikrotiterplatten-Photometer Sunrise™	Tecan Group AG
Milli-Q® Advantage A10 System	Merck Millipore
Mini Rocker-Shaker MR-1	Peqlab Biotechnologie GmbH
Mini-Zentrifuge	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
NanoVue™ Plus Dspectrophotometer	GE Healthcare™
Personal Bio-Vortex V-1 plus	Peqlab Biotechnologie GmbH
Pipette Reference® 2,5 ml	Eppendorf
QIAcube	Qiagen
Radiometer Copenhagen PHM 93 Reference pH Meter	BioSurplus
Roto-Shake Genie®	Scientific Industries Inc.
Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzer	Agilent Technologies
Sonifiziergerät EpiShear™ Probe sonicator	Active Motif
Stepperpipette Multipette® plus	Eppendorf AG
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Stickstofftank LS3000	Taylor-Wharton
T Personal Thermacycler Biometra®	Neolab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH
Thermomixer® compact	Eppendorf
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc.
Waage 3716MP	Sartorius
Wärme-/Trockenschrank	Memmert GmbH & Co. KG
Wasserbad W22	GK Sondermaschinenbau GmbH Labor- technik Medingen
Zählkammer Neubauer-Improved	Paul Marienfeld GmbH &Co. KG

Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ X1R	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Zentrifuge Micro Star 17	VWR International GmbH
Zentrifuge Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
12-Well Platten Cell ⁺	Sarstedt
6-Well Platten	Greiner Bio-One International AG
6-Well Platten Cell ⁺	Sarstedt
96-Well Mikrotiterplatte 0,2 ml skirted	Thermo Fisher Scientific, Inc.
96-Well Platten, F-Boden	Greiner Bio-One International AG
Adhesive PCR Plate Seals	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Autoklavierbeutel	Ratiolab
Chromatographie-Papier Whatman™	GE Healthcare™
Deckgläser, rund 15 mm	VWR International GmbH
Einfrierröhrchen Cryo.s™	Greiner Bio-One International AG
Filterspitzen 10 µl, 20 µl	Biozym Scientific GmbH
Glasflaschen	Schott AG
Glaspasteurpipetten 145 mm	BRAND GmbH & Co. KG
Mehrzweckröhrchen Cellstar® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One International AG
Micro-Touch® Nitril Handschuhe	Ansell
Nitrozellulosemembran Amersham™ Protran™ 0,2 µm	GE Healthcare™
Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc.
Pipettenspitze epT.I.P.S.® 0,25 – 2,5 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen TipOne® 10/20 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab
Reaktionsgefäße Safe Seal 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Serologische Einwegpipetten Cellstar® 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International AG

Spitzenvorsatzfilter Ø: 0,45 µm Cellulose-acetat Membran	VWR International GmbH
Spritzen Braun Injekt® 10 ml	B. Braun Melsungen AG
Stepper Combitips advanced® 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf
Zellkulturflaschen 25 cm ² (T25), 75 cm ² (T75)	Greiner Bio-One International AG
Zellkulturschale Cellstar® Ø: 3,5 cm ²	Greiner Bio-One International AG
Zellspatel	TPP Techno Plastic Products AG
Zellzähler	Infactory PEARL. GmbH

2.1.4 Kits

Tabelle 2.4: Auflistung der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
BM Chemiluminescence Blotting Substrate	Roche Diagnostic GmbH
DC™ Protein Assay	Bio-Rad
DNeasy® Blood & Tissue	Qiagen
EdU-Click 488	baseclick GmbH
High-Capacity cDNA Reverse Transcription	Applied Biosystems
RNase-Free DNase Set	Qiagen
RNeasy® Mini	Qiagen
SensiMix SYBR Hi-Rox	Bioline

2.1.5 Chemikalien

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Acylamid 30 % (Rotiphorese® Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Adenosintriphosphat	Sigma-Aldrich
BSA	Merck Millipore
CaCl ₂	Merck KGaA.
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
DMSO	Merck Millipore
DTT	AppliChem GmbH
EDTA	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG

Ethanol	Merck Millipore
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich
Isopropanol	VWR International GmbH
KCl	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG
Methanol	VWR International GmbH
MgCl ₂	Merck KGaA
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG
NaCl	VWR International GmbH
NaF	Merck KGaA
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
NaOH	Merck KGaA
Na-Resazurin	Sigma-Aldrich
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich
NP-40	Sigma-Aldrich
Oregon Green [®] 488 BAPTA-1/AM	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Paraformaldehyd	Merck Millipore
Pluronic F-127	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich
Propidiumiodid	Carl Roth GmbH & Co. KG
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck KGaA

2.1.6 Lösungen und Puffer

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Lösungen und Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotting Puffer	250 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % (v/v) Ethanol
Krebs-HEPES-Puffer (pH 7,4) (KHP)	100 mM Tris, pH 9,5 135 mM NaCl 3,6 mM KCl 5 mM NaHCO ₃ 0,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,5 mM MgCl ₂ 1,5 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES
NaCl/P _i -Puffer	1,06 mM KH ₂ PO ₄ 154 mM NaCl 3,77 mM Na ₂ HPO ₄
PBS (pH 7,4)	0,4 M Tris-Base pH 7,5 2 mM KH ₂ PO ₄ 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
PBS mit erhöhtem Salzgehalt	2 mM KH ₂ PO ₄ 400 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄
PBST	PBS 0,3 % (v/v) Triton X-100
Ponceau-S-Lösung	1,5 g/l Ponceau-S 5 ml/l Essigsäure
Resazurin-Lösung	Resazurin-Stocklösung 1:1000 mit NaCl/P _i -Puffer
Resazurin-Stocklösung	440 mM Na-Resazurin in Dimethyl- formamid
RIPA-Puffer	50 mM Tris HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 0,1 % SDS 1 % Natriumdesoxycholol 1 mM Natriumorthovanadat

	1 mM PMSF 50 mM Natriumfluorid 1 x PIC 50 % (v/v) Aqua bidest.
Sammelgel (5 %) für 2 Gele	1,3 ml Acrylamid (30 %) 1 ml 1,5 M Tris-Base (pH 6,8) 5,5 ml Aqua bidest. 160 µl SDS (10 %) 80 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
SDS Laufpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
TBS	50 mM Tris-Base (pH 7,4) 150 mM NaCl
TBST	TBS 0,05 % (v/v) Tween 20
Trenngel (10 %) für 2 Gele	6,7 ml Acrylamid (30 %) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 7,8 ml Aqua bidest. 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
Trenngel (12 %) für 2 Gele	8 ml Acrylamid (30 %) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 6,5 ml Aqua bidest. 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 80 µl TEMED (10 %)
Trenngel (6 %) für 2 Gele	4 ml Acrylamid (30 %) 5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8) 10,4 ml Aqua bidest. 200 µl SDS (10 %) 200 µl APS (100 g/l) 160 µl TEMED (10 %)

2.1.7 Verwendete Zelllinien

Tabelle 2.7: Auflistung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Organismus	Bezugsquelle
b4, induzierte pluripotente Stammzellen	Mensch	Institut für Stammzellforschung und Regenerative Medizin Düsseldorf
H5V	Maus	Institut Mario Negri, Mailand, Italien
HL-1	Maus	Institut William C. Claycomb, New Orleans, Louisiana, USA
HUVEC	Mensch	PromoCell® GmbH, Heidelberg
LF2, embryonale Stammzellen	Maus	Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie Düsseldorf

2.1.8 Medien und Medienzusätze

Tabelle 2.8: Auflistung der verwendeten Medien und Zusätze.

Bezeichnung	Hersteller
Activin A	PeptoTech®
ALKi (SB431542)	Selleck Chemicals
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
B-27 Minus Insulin Supplement (50 x)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
B-27 Supplement (50 x)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
bFGF	PeptoTech®
BMP-4	PeptoTech®
Claycomb Medium	Sigma-Aldrich
DMEM Ham's F12 (DMEM/F12)	Biochrom GmbH
DMEM ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Inc.
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) <i>high glucose</i>	Sigma-Aldrich
<i>Endothelial cell basal medium</i> (ECBM)	PromoCell® GmbH
<i>Endothelial cell growth medium</i> (EGM2)	PromoCell® GmbH
FCS	Merck Millipore
FCS, hitzeinaktiviert	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Forskolin	Sigma-Aldrich
Glutamax	Thermo Fisher Scientific, Inc.

GSK-3 Inhibitor XVI (GSKi)	Calbiochem®, Merck Millipore
Heparin	Sigma-Aldrich
<i>Knockout</i> DMEM	Thermo Fisher Scientific, Inc.
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
LIF	Merck Millipore
Neurobasalmedium	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Neuropan 2 Supplement (100 x)	PAN BioTech
Norepinephrin	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Inc.
ROCK-Inhibitor/Y-27632	Sigma-Aldrich
StemMACS™ iPS-Brew XF	Miltenyi Biotec
VEGF ₁₆₅	PeproTech®
WNT-C59	Selleck Chemicals
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Inc.

2.1.8.1 Zellkultur- und Differenzierungsmedien

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der verwendeten Zellkultur- und Differenzierungsmedien.

Medium	Zusammensetzung
mESC Kultivierungsmedium (ES-Medium)	KO-DMEM 12,5 % (v/v) FCS hitzeinaktiviert 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) Glutamax 5 x 10 ⁻⁵ M β-Mercaptoethanol 1000 U/ml LIF
HL-1 Kultivierungsmedium	Claycomb Medium 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) Norepinephrin (10 mM) 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) L-Glutamin
HUVEC Kultivierungsmedium	EGM2
H5V Kultivierungsmedium	DMEM 10 % (v/v) FCS 1 % (v/v) L-Glutamin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin

Präinkubationsmedium Endothelzellendifferenzierung (N2B27-Medium)	50 % (v/v) DMEM/F12 50 % (v/v) Neurobasalmedium 1% (v/v) B-27 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin 0,5 % (v/v) Glutamax 10 ⁻⁴ M (0,5 %) Neuropan 2 3 µg/ml Heparin 10 ⁻⁴ M β-Mercaptoethanol
Mesoderm-Induktionsmedium Endothelzellendifferenzierung (N2B27-MI)	N2B27-Medium 4 ng/ml Activin A 12,5 ng/ml bFGF 5 ng/ml BMP4 3 µM GSKi
Endothelzell-Induktionsmedium (N2B27-VM)	N2B27-Medium 12,5 ng/ml bFGF 20 ng/ml VEGF ₁₆₅ 10 µM Forskolin 0,2 µM ALKi
Präinkubationsmedium Kardiomyozytendifferenzierung (N2B27-Medium-Insulin)	50 % (v/v) DMEM/F12 50 % (v/v) Neurobasalmedium 1 % (v/v) B-27-Insulin 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 0,5 % (v/v) Glutamax 10 ⁻⁴ M (0,5 %) Neuropan 2 3 µg/ml Heparin 10 ⁻⁴ M β-Mercaptoethanol
Mesoderm-Induktionsmedium Kardiomyozytendifferenzierung (N2B27-Insulin-MI)	N2B27-Medium-Insulin 4 ng/ml Activin A 12,5 ng/ml bFGF 5 ng/ml BMP4 3 µM GSKi
Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1 (N2B27-Insulin-1)	N2B27-Medium-Insulin 20 ng/ml VEGF ₁₆₅ 2 µM Wnt-C59
Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2 (N2B27-Insulin-2)	N2B27-Medium-Insulin 20 ng/ml VEGF ₁₆₅
hiPSC Kultivierungsmedium (StemMACS)	StemMACS iPS-Brew XF
Mesoderm-Induktionsmedium hiPSC Endothelzellendifferenzierung	DMEM/F12 4 µM GSKi
Endothelzell-Induktionsmedium hiPSC	ECBM 5 ng/ml bFGF 10 ng/ml VEGF ₁₆₅

<i>Seahorse</i> Versuchsmedium mESC	DMEM 4,5 g/l Glukose 1 % (v/v) Glutamax 0,11 g/l Natrium Pyruvat 5 x 10 ⁻⁵ M β-Mercaptoethanol 1000 U/ml LIF
<i>Seahorse</i> Versuchsmedium EC	DMEM 1,91 g/l Glukose 0,09 g/l L-Glutamin 0,02 g/l Natrium Pyruvat 1% (v/v) B-27 10 ⁻⁴ M (0,5 %) Neuropan 2 10 ⁻⁴ M β-Mercaptoethanol 3 µg/ml Heparin 0,5% (v/v) Glutamax

2.1.9 Real-time PCR-Primer

Tabelle 2.10: Auflistung der murinen Primersequenzen für die *real-time* PCR.

Gen	NCBI Referenzsequenz	Primersequenzen (5' – 3') vorwärts- und reversgerichtet
<i>Actb</i>	NM_007393	GCATTGCTGACAGGATGCAG CCTGCTTGCTGATCCACATC
<i>Actn1</i>	NM_001346669	ATGATATTGGCAACGACCCC CTGTGATGTAATTCTTATCTCCAGC
<i>Atg7</i>	NM_028835	GCACAACACCAACACACT CGAAGGTCAGGAGCAGAA
<i>Bax</i>	NM_007527	CTGGACACTGGACTTCCT GCCACAAAGATGGTCACT
<i>Bcl2</i>	NM_009741	GTGTGGTTGCCTTATGTAT GTATATCCGCTACAAGTTACA
<i>Becn1</i>	NM_019584	GATGGGAACCTCTGGAGGT GGCTGTGGTAAGTAATGGA
<i>Cacna1α</i>	NM_001252059	GCCCCATCACTTGGATGAA GGGGGCGATATTACTCGCAA
<i>Casp2</i>	NM_007610	TACTGCTCACAACCCTCTC GGACCATCACCATTATCTAAGG
<i>Ccl2</i>	NM_011333	ATGAGATCAGAACCCTACAAC TCCTACAGAAGTGCTTGAG
<i>Cdc42</i>	NM_009861	TCTGCCCTCACACAGAAAGG GCGTTCATAGCAGCACACAC

<i>Cox2</i>	NC_010339	GGATCCGAGCATCTTATCCA GGTGGTACTCCCCTGTAAA
<i>Ddb2</i>	NM_028119	AGGCAACATTCTCAGAGT CATTGGAGGTTCCAAAG
<i>eNos</i>	NM_008713	GCATGGGCAACTTGAAGA AGGGTGTCTAGGTGATG
<i>Ercc1</i>	NM_007948	AAACAGGAGCAAAGTCTAAT GGATGTAGTCTGGATGGA
<i>Flk1</i>	NM_001363216	GTTCTGCGTGGAGACCCGAGC CAAAGCCAGTCCAGGTCCCGC
<i>Gapdh</i>	NM_008084	GACGGCCGCATCTTCTTGTGC CACTGCAAATGGCAGCCCTGG
<i>Gpx1</i>	NM_008160	TTGGTGATTACTGGCTGC TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
<i>Hmox1</i>	NM_010442	CCAGAGTCCCTCACAGAT CCCAAGAGAAGAGAGCCA
<i>Icam-1</i>	NM_010493	TGCTCAGGTATCCATCCAT GGAAACGAATACACGGTGAT
<i>Ii6</i>	NM_031168	AGTTGCCTTCTTGGGACTGA CAGAATTGCCATTGCACAAC
<i>Ii8</i>	NM_011339	CATCTTCGTCCGTCCCTGTG CCTTCACCCATGGAGCATCA
<i>iNos</i>	NM_010927	GCTGTTAGAGACACTTCTGAG CACTTTGGTAGGATTTGACTTTG
<i>Mfn2</i>	NM_133201	ATGTTACCACGGAGCTGGAC AACTGCTTCTCCGTCTGCAT
<i>Msh2</i>	NM_008628	GTCTAAGGAGAATGAGTGGTATC CCATAACGCCAACGGAAG
<i>Myh6</i>	NM_001164171	GAGTGCTTCGTGCCTGATGA GAACTTGGGTGGGTTCTGCT
<i>Myl2</i>	NM_010861	CCACACAAGCAGAGAGGTTCT TCCTTCTTCTCCGTGGGTA
<i>Nanog</i>	NM_001289828	AGAGGAAGGGCGAGGAGA TTCTTGCTTACAAGGGTCTGC
<i>Nkx2-5</i>	NM_008700	GTCCGGCCTGGCAGAG GGCTTTGTCCAGCTCCACT
<i>Oct-4</i>	NM_001252452	CTGCCCCCAGGTCCCCACTT AGCATCCCCAGGGAGGGCTG
<i>p16</i>	NM_001040654	AAAGCGAACTCGAGGAGAGC TCATCATCACCTGAATCGGGG

<i>p21</i>	NM_007669	ACCTGAATAGCACTTTGGAAA TCTGAGCAATGTCAAGAGTC
<i>p53</i>	NM_011640	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCAT GGCAGTCATCCAGTCTTC
<i>Pecam1</i>	NM_001032378	GCTCTGGGAACGAGAGCCACAG CTGCTTTCGGTGGGGACAGGC
<i>Pgc1α</i>	NM_008904	CCGAGAATTCATGGAGCAAT TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA
<i>Rac1</i>	NM_009007	ACAAAGCCTTCTTAAAGCCTTA GCGGTCTTCTTAGCAACA
<i>Rad51</i>	NM_011234	CAGCGATGTCCTAGATAATGTAG TTACCACTGCGACACCAA
<i>RhoA</i>	NM_016802	AAGTCTGGGTGCCTCAT ATAATCGTGGTTGGCTTCTAA
<i>Rn18s</i>	NC_000072	AAACGGCTACCACATCCAAG CCTCCAATGGATCCTCGTTA
<i>Ryr2</i>	NM_023868	CGACCATCCACAAAGAACAGC CGTACTGACAGGGACTGCTC
<i>Sele</i>	NM_011345	TGCGAGAAGAACGGATAGA CTGAATTGCCACCAGATGT
<i>Sirt4</i>	NM_133760	AATGCCGCTCCAACTCTGAA GGGGCAGCTCTCATTCTGT
<i>Sod1</i>	NM_011434	ACCAGTTGTGTTGTCAGG TTTCTTAGAGTGAGGATTAATGAG
<i>Tie1</i>	NM_011587	CAATGGGCCGTCTCCCTGTGC GCGTGCCTCCAAGGCTCACT
<i>Tnnt2</i>	NM_001130174	GCTGAGGCTGAACAGATACCTC CAGACATGCTCTCGGCTCTCC
<i>TopBP1</i>	NM_176979	TCGGGCTCCACCTAGTTCAG ACAAGAAACGGCTCTTGGTCA
<i>Topollα</i>	NM_011623	CTTCAGGAGCCGTCACCAT GAGCAGTATATGTTCCAGTTGT
<i>Topollβ</i>	NM_009409	TGGGTGAACAATGCTACAAA TGTATGTATCAGGACGAAGGA
<i>Txnrd1</i>	NM_015762	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT GCACATTGGTCTGCTCTTCA
<i>Vcam-1</i>	NM_011693	ATATACTTGGAAGTGTCTGTGT GACCATCTTCACAGGCATT
<i>VE-cadherin</i>	NM_009868	AAGGCTCAGCGCAGCATCGG TCGTTGGCCTCCACAGTCAGGT
<i>Xpa</i>	NM_011728	GACAACCACTCACCAACATA TGAACCTTGAACAGGGTCTTTA

<i>Xrcc1</i>	NM_009532	CCAACCGTGTTCGCATTT GCACTGTCATCCTCCTCTT
<i>β-Gal</i>	NM_009752	CGGATACCCCGCTTCTACTG AGGGCACGTACATCTGGATAG

Tabelle 2.11: Auflistung der humanen Primersequenzen für die *real-time* PCR.

Gen	NCBI Referenzsequenz	Primersequenzen (5' – 3') vorwärts- und reversgerichtet
<i>Actb</i>	NM_001101	GAGCACAGAGCCTCGCC TCATCATCCATGGTGAGCTGG
<i>Claudin5</i>	NM_001130861	GAGCAGCCCCTGTGAAGATT GTCTCTGGCAAAAAGCGGTG
<i>Connexin40</i>	NM_005266	CAAAAAGCGTGGGCAGTTGG CCAAAATTCTGCTTCTTTTCCTCC
<i>Efnb2</i>	NM_004093	AGGGACTCCGTGTGGAAGTA CCAGGTAGAAATTTGGAGTTGAG
<i>Ephb4</i>	NM_004444	GTCTGACTTTGGCCTTTCCC TGACATCACCTCCCACATCA
<i>Flk1</i>	NM_002253	CGGTCAACAAAGTCGGGAGA CAGTGCACCACAAAGACACG
<i>Nanog</i>	NM_024865	ACCTCAGCTACAAACAGGTGAA AAAGGCTGGGGTAGGTAGGT
<i>Oct3/4</i>	NM_001173531	ACCCACACTGCAGCAGATCA CCACACTCGGACCACATCCT
<i>Pecam1</i>	NM_000442	AGACGTGCAGTACACGGAAG TTTCCACGGCATCAGGGAC
<i>RLP32</i>	NM_000994	GTTACGACCCATCAGCCCTTG CATGATGCCGAGAAGGAGATGG
<i>VE-cadherin</i>	NM_001795	ATGCGGCTAGGCATAGCATT TGTGACTCGGAAGAACTGGC
<i>vWF</i>	NM_000552	TTTTGCCAGGGACCCTTTGT TTGCCATTCTGGAAGTCCCC

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert und vor Gebrauch auf 3 µM verdünnt.

2.1.10 *Real-time* PCR-Array-Primer

Die PCR-Arrays wurden in Zusammenarbeit mit Sigma-Aldrich Deutschland erstellt (Fritz *et al.*, 2011).

Tabelle 2.12: Auflistung der murinen Primersequenzen des *real-time* PCR-Arrays.

Gen	NCBI Referenzsequenz	Primersequenzen (5' – 3') vorwärts- und reversgerichtet
<i>Actb</i>	NM_007393	ACCATGGAGGAAATCACAGC TGGTGGCATCATCCAAGATA
<i>Akt1</i>	NM_009652	AGAAGAGACTCTGAGCATCA AAGGTGCCATCGTTCTTG
<i>Apex1</i>	NM_009687	AGAAATTGACCTCCGTAACC CGCCAACCAACATTCTTAGA
<i>Arhgdia</i>	NM_133796	CCCTACCTACCCCAAACC TGGACAACCCTGACAGTG
<i>Atf2</i>	NM_009715	TATCGTTCGTCCAGCATCA TACTTGAGGTTGGTGAAGGTA
<i>Atg3</i>	NM_026402	ACCACCTCCTATGTGTTCA TGTGTAGTCATATTCTATTGTTGGA
<i>Atg7</i>	NM_028835	GCACAACACCAACACACT CGAAGGTCAGGAGCAGAA
<i>Atm</i>	NM_007499	ACCAGAGGATGCTGTTCA ATCATTAAGTCTATGTTGAGTCCAA
<i>Bax</i>	NM_007527	CTGGACACTGGACTTCCT GCCACAAAGATGGTCACT
<i>Bcl2</i>	NM_009741	GTGTGGTTGCCTTATGTAT GTATATCCGCTACAAGTTACA
<i>Becn1</i>	NM_019584	GATGGGAACTCTGGAGGT GGCTGTGGTAAGTAATGGA
<i>Bid</i>	NM_007544	CACCATGTACCTTTGTCCTATC ACCTCTCCTAATGCTGTTCT
<i>Brca1</i>	NM_009764	TTGTGAGCGTTTGAATGA ACCTGGCTTAGTTACTGT
<i>Brca2</i>	NM_009765	TAACGCCTGCTGACTCTC TGCCAGATGAATCTCCTAACA
<i>Casp2</i>	NM_007610	TACTGCTCACAACCCTCTC GGACCATCACCATTATCTAAGG
<i>Ccna1</i>	NM_007628	GAGGGCATCATATTTGAGGAT CTTGGGTCTGTGCTTACTTC
<i>Ccnb1</i>	NM_172301	GGTCACTAGGAACACGAAA TTTGGTAGGGCTTTAAACAGT
<i>Ccne1</i>	NM_007633	AGCCCTGGGATGATAATTCA GCTCTGGGTGGTCTGATT
<i>Cd44</i>	NM_009851	ACACCTACCTTCCTACTG TTGTGGACTGTGAATTACC

<i>Cdc25a</i>	NM_007658	TCAAATGAAAGTGAATCAGGAAAT CTTCATATTCTCGCCATCCA
<i>Cdc25b</i>	NM_023117	CACATCCCTCTCCTCACT GAAGCCATCAGACTCAAAC
<i>Cdkn1a</i>	NM_007669	ACCTGAATAGCACTTTGGAAA TCTGAGCAATGTCAAGAGTC
<i>Cdkn1b</i>	NM_009875	CCCTCCAGTACACTTGAT TAAACAACAAAACCGAACAAA
<i>Chk1</i>	NM_007691	TGAACGCTTACTGAACAAGAT CCACAGGACCAAACATCAA
<i>Chk2</i>	NM_016681	TGAGAAGGACGGACAAGT TCTACATAGTGAAAGTGCGATTT
<i>C-IAP1 (Birc3)</i>	NM_007464	GCTGACACCTTTGAGTTGA GCAGAAGCACTTGACCTT
<i>C-Jun</i>	NM_010591	AACTTTCCTGACCCAGAG GCGAACTGGTATGAGTATAG
<i>Cxcr4</i>	NM_009911	TCTACATAGTGAAAGTGCGATTT ATACCTGACTTCATCTTTGCC
<i>Cyp1a1</i>	NM_009992	TGGAGTGTGACAGCTTAGA CCTCCGTTACCTGCCTAA
<i>Cyp1b1</i>	NM_009994	GTCCTGACAATGCTCAATGA GACGATGCGGAGTTCCTA
<i>Ddb2</i>	NM_028119	AGGCAACATTCTCAGAGT CATTTCGGAGGTTCCAAAG
<i>Ddit3</i>	NM_007837	GTCAGTTATCTTGAGCCTAA GTGTGGTGGTGTATGAAG
<i>Elk1</i>	NM_007922	AGCCTGAGGTGTCTGTAA GTGTTGGGAAGCACTGAG
<i>Ercc1</i>	NM_007948	AAACAGGAGCAAAGTCTAAT GGATGTAGTCTGGATGGA
<i>Fancc</i>	NM_007985	GCTTGTTGGAATCCTCTCAT CCACGAGTTAAGTCCTGAC
<i>Fas-L</i>	NM_010177	CTGGAATGGGAAGACACATAT TGGTCAGCACTGGTAAGA
<i>Fas-R</i>	NM_007987	AGAACCTCCAGTCGTGAA ATCTATCTTGCCCTCCTTGA
<i>Fen1</i>	NM_007999	GGAACGATACTGAAAGAACGG CGGCGAAGAGGAATGTTC
<i>Fos</i>	NM_010234	AACTTCGACCATGATGTTCT GCACTAGAGACGGACAGA
<i>Gadd45a</i>	NM_007836	GTCGCTACATGGATCAGTG GTGACTGCTTGAGTAACTACA

<i>Gapdh</i>	NM_008084	TCTCCTGCGACTTCAACA TCTCTTGCTCAGTGTCTT
<i>Gpx1</i>	NM_008160	TTGGTGATTACTGGCTGC TGATATTCAGCACTTTATTCTTAGTAG
<i>Gstm1</i>	NM_010358	ACACAGCCTTCATTCTCC AATTCTAGGAAGCGTGAGTT
<i>Hif1a</i>	NM_010431	GAGGAGCGCCTAGGAACC CGGAGAAAGAGACAAGTCCA
<i>Hmox1</i>	NM_010442	CCAGAGTCCCTCACAGAT CCCAAGAGAAGAGAGCCA
<i>Hsp90</i>	NM_010480	CGGAGGCTTCTGGAAAGA CATCGTGGCTGAATGAACA
<i>Hspa1b</i>	NM_010478	AGACGCTGACAGCTACTC CTCGCTTCTGGAAGGCT
<i>Hus1</i>	NM_008316	TGGAAGGAGTCTCTGAAGAA AGGGAAAGTGTGTTAGTCA
<i>Icam-1</i>	NM_010493	TGCTCAGGTATCCATCCAT GGAAACGAATACACGGTGAT
<i>Il12a</i>	NM_008351	GGAACTACACAAGAACGAGAG CGCCATTATGATTCAGAGACT
<i>Itgb1</i>	NM_010578	GCCAGCCAAGTGACATAG ACTTCTGTGGTTCTCCTGAT
<i>Lamp1</i>	NM_010684	AAGTGGAGAACAAGAACAGAG TCAGTGAATGGTTGGAGATG
<i>Lig1</i>	NM_010715	ATTTCTGGGTTTGCCTCTC ACCACTTGATTCTCTCTCTT
<i>Lig4</i>	NM_176953	GTGTCCTGATGCTTAGTTGT CTCCTTGAAGTGCCTGATT
<i>Mdm2</i>	NM_010786	AAGGTGGGAGTGATCTGAA TCTGTGTTCTCTTCTGTCTCA
<i>Mgmt</i>	NM_008598	GCTGCTGAAGGTTGTGAA TTCATTGCTCCTCCTACTG
<i>Mmp13</i>	NM_008607	GCCACCTTCTTCTTGTTGA TAGTATGATTTCAAGTAGTGCTCTG
<i>Mmp3</i>	NM_010809	GCTGTGGGAAAGTCAATGA GCCATAGTAGTTTTCTAGGTATT
<i>Mmp7</i>	NM_010810	GAACAGGCTCAGAATTATCTTAGA CCACTACGATCCGAGGTAA
<i>Mpg</i>	NM_010822	CTGTATGTGTACCTCATCTATGG CAGAGTTCACGGTCTTGG
<i>Mre11a</i>	NM_018736	TACGGCTTAGGCTCCATT ATGCTTACTCCTGTTCTGATG

<i>Msh2</i>	NM_008628	GTCTAAGGAGAATGAGTGGTATC CCATAACGCCAACGGAAG
<i>Nos2</i>	NM_010927	GCTGTTAGAGACACTTCTGAG CACTTTGGTAGGATTTGACTTTG
<i>Nos3</i>	NM_008713	GCATGGGCAACTTGAAGA AGGGTGTTCGTAGGTGATG
<i>Nox1</i>	NM_172203	GGCTAAATCCCATCCAGTC CCTAAGCAGATGATATAGACGATAA
<i>Ogg1</i>	NM_010957	TGAGACTGCTGAGACAAGA GGAAGCCATGATAAGTGACA
<i>Pcna</i>	NM_011045	GACTTAGATGTGGAGCAACTT GGCTAAGGTCTCGGCATA
<i>Pold1</i>	NM_011131	CTCCATTTCTCCGCATCAC CAATGTCAGCATCCACCAT
<i>Pole</i>	NM_011132	CGGTGGATTACTACTTCATTCA CTTCTTTGGGCACATTCTCTA
<i>Pten</i>	NM_008960	ATCAAGAGATCGTTAGCAGAAA TTGGCGGTGTCATAATGTC
<i>Rac1</i>	NM_009007	ACAAAGCCTTCTTAAAGCCTTA GCGGTCTTCTTAGCAACA
<i>Rad51</i>	NM_011234	CAGCGATGTCCTAGATAATGTAG TTACCACTGCGACACCAA
<i>Rev1</i>	NM_019570	TCTGCGGAGGAATTGAGA ACACAGGATTGAAGTTGAGAC
<i>Rev3</i>	NM_011264	TTCTCAGATGGCATTGAGTATC TCATTATGGCTCCGCTTTG
<i>Rhoa</i>	NM_016802	AAGTCTGGGTGCCTCAT AATAATCGTGGTTGGCTTCTAA
<i>Rhob</i>	NM_007483	CAGCATCAGCCATCACTTC CTAGGCTCGCTAACTGCA
<i>Sele</i>	NM_011345	TGCGAGAAGAACGGATAGA CTGAATTGCCACCAGATGT
<i>Sod1</i>	NM_011434	ACCAGTTGTGTTGTCAGG TTTCTTAGAGTGAGGATTAATGAG
<i>Tiam1</i>	NM_009384	GGTAGAACCATTTGTGGACTG CGGTGTGGCATTAGAGAC
<i>Timp2</i>	NM_011594	CAAAGCAGTGAGCGAGAA CATCTTGCCATCTCCTTCTG
<i>Topollα</i>	NM_011623	CTTCAGGAGCCGTCACCAT GAGCAGTATATGTTCCAGTTGT
<i>Topollβ</i>	NM_009409	TGGGTGAACAATGCTACAAA TGTATGTATCAGGACGAAGGA

<i>Trex1</i>	NM_011637	GCTACCACTGGAACAACC TGCTATGGAAGTCTTTATTCATCA
<i>Trp53</i>	NM_011640	AAGTTCTGTAGCTTCAGTTCAT GGCAGTCATCCAGTCTTC
<i>Trp63</i>	NM_011641	AGCATCAGAAAGCAGCAA GATCTTCAGCAACATCTCGTA
<i>Trp73</i>	NM_011642	CTCCGCACCCTTATAACC GCTGAGCAAATTGAACTGG
<i>Txnrd1</i>	NM_015762	CAGTTCGTCCCAACGAAAAT GCACATTGGTCTGCTCTTCA
<i>Vcam-1</i>	NM_011693	ATATACTTGGAAGTGTCGTGTT GACCATCTTCACAGGCATT
<i>Wee1</i>	NM_009516	GTAGTCTCTATTCATGGACACA GTTGCTTTCAGTAATTGTAATTCTTT
<i>Wrn</i>	NM_011721	TGATTGCTCCTTCCTGTCT ACTGCGACTCTGCTTCTT
<i>Wrnip1</i>	NM_030215	GCCAATGAGATCCCTTCG AACCTTATGCTGTGCTTCTT
<i>Xpa</i>	NM_011728	GACAACCACTCACCAACATA TGAACCTTGAACAGGGTCTTTA
<i>Xpc</i>	NM_009531	GCGAAAGAACGGGAAAGA AAGCGAATTGGAATGATGGA
<i>Xrcc1</i>	NM_009532	CCAACCGTGTTTCGCATTT GCACTGTCATCCTCCTCTT
<i>Xrcc3</i>	NM_028875	GGAGGAAGTCTGAGTTGGT CTCTTAACCGCAGCAGTAAT
<i>Xrcc4</i>	NM_028012	TGCCTGGACACCATTACA CTTCTCATTGAGCACCAAGAT

Tabelle 2.13: Auflistung der humanen Primersequenzen des *real-time* PCR-Arrays.

Gen	NCBI Referenzsequenz	Primersequenzen (5' – 3') vorwärts- und reversgerichtet
<i>Actb</i>	NM_001101	GAGCACAGAGCCTCGCC TCATCATCCATGGTGAGCTGG
<i>Akt1</i>	NM_005163	ATTGTGAAGGAGGGTTGG TGAAGGTGCCATCATTCT
<i>Apex1</i>	NM_080649	AGGATTAGATTGGGTAAAGGA GCTGGTAGTTTGTCTCTG
<i>Arhgdia</i>	NM_004309	TCGTTTGTGCTGAAGGAG TCATGCCGGACACTATCT

<i>Atg3</i>	NM_022488	AGGACAATATAAGGCTTCAA TTCCAACAATCCACTCTC
<i>Atg7</i>	NM_006395	GAACCTCAGTGAATGTATG AACCTTGTCCAAGTCTAA
<i>Atm</i>	NM_000051	CAAGATGTTTCATAGAGTT TGAGGAAGATAGTAAGAG
<i>Bax</i>	NM_004324	ATCAGATGTGGTCTATAATG CAGAAGGCACTAATCAAG
<i>Bcl2</i>	NM_000633	CGACTCCTGATTCATTGG TCTACTTCCTCTGTGATGT
<i>Becn1</i>	NM_003766	GGATGGAAGGGTCTAAGA CTGTGGTAAGTAATGGAG
<i>Bid</i>	NM_001196	GAAGACAGGCTGGAAGATA GTGTGGATGATATGAAGGC
<i>Brca1</i>	NM_007294	AAGACTTCTACAGAGTGAA CAGTTCCAAGGTTAGAGA
<i>Brca2</i>	NM_000059	AACAACAATTACGAACCAA AACATTCCTTCCTAAGTCTA
<i>Casp2</i>	NM_032982	GAGAGAAAGAACTGGAATT TCTGGTCACATAGAACAT
<i>Ccna1</i>	NM_003914	ATTTCAACACAGTTTCCC CAGCATATTCAGTCACATT
<i>Ccnb1</i>	NM_031966	CCTTCGGAGAGCATCTAA CATAGTTAGTTCCATCAGGTATT
<i>Ccne1</i>	NM_001238	GCAAATAGAGAGGAAGTC ATTAACCAATCCAGAAGAAT
<i>CD44</i>	NM_000610	GGACCAATTACCATAACTATT AGGATTCGTTCTGTATTCT
<i>Cdc25a</i>	NM_001789	GTGAAGAACAACAGTAATC TGAGGTAGGGAATGTATT
<i>Cdc25b</i>	NM_021873	CGTGACCTTGATTGAGTT TCCCGGAAGTTTGCTAAA
<i>Cdkn1a</i>	NM_000389	TACATCTTCTGCCTTAGT TCTTAGGAACCTCTCATT
<i>Cdkn1b</i>	NM_004064	ACAGCTCGAATTAAGAATA CTTATACAGGATGTCCATT
<i>Chk1</i>	NM_001274	CCACCTCTTCATAACAACAA TAAATCACAATCGCCACTC
<i>Chk2</i>	NM_007194	GCACTGTCACTAAGCAGAAAT AGGCACCACTTCCAAGAG
<i>C-IAP1(Birc3)</i>	NM_001165	TGGTAATGAGATGTGATG GTAAAGAGGTTCTGAGTC

<i>C-Jun</i>	NM_002228	ATGGAAACGACCTTCTATG TCTTGGGGTTACTGTAGC
<i>Cxcr4</i>	NM_003467	GCCTTACTACATTGGGAT ACAGTGTTCTCAAACCTCA
<i>Cyp1a1</i>	NM_000499	CTGCTTAGCCTAGTCAAC GGTAGGTAGCGAAGAATAG
<i>Cyp1b1</i>	NM_000104	TCCGTCCCCATCCCAATC CCTCACTGGAAGCTTTAACT
<i>DDB2</i>	NM_000107	TTTAACCCTCTCAATACCA CTACTAGCAGACACATCC
<i>Ddit3</i>	NM_004083	ACTGAGCGTATCATGTAA CAGGTGTGGTGATGTATG
<i>Ercc1</i>	NM_001983	AGGAAGAAATTTGTGATAC TGTGTAGATCGGAATAAG
<i>Fancc</i>	NM_000136	AGATGTATGAAGCCTTGAA AGACAACATAAGCACCAT
<i>Fas-L</i>	NM_000639	CAATCTTACCAGTGCTGAT AATCCCAAAGTGCTTCTC
<i>Fas-R</i>	NM_000043	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA GGCTTCATTGACACCATT
<i>Fen1</i>	NM_004111	CGGGAGAATGACATCAAG AACAGCAATCAGGAACTG
<i>Fos</i>	NM_005252	TCAGTGGAACCTGTCAAGA TGGATGATGCTGGGAACA
<i>Gadd45a</i>	NM_001924	ATCCACATTCATCTCAAT GTAACACTACAAAGGTATTTCA
<i>Gapdh</i>	NM_002046	CATGAGAAGTATGACAACAG ATGAGTCCTTCCACGATA
<i>Gpx1</i>	NM_000581	GCCAAGAACGAAGAGATT TCGAAGAGCATGAAGTTG
<i>Gstm1</i>	NM_000561	ACTATCCTTCGTGAACATC AGACACAACCACTAACAG
<i>Hif1a</i>	NM_001530	TATTTGCGTGTGAGGAAA CATCTGTGAGAACCATAAC
<i>Hmox1</i>	NM_002133	CAACAAAGTGCAAGATTC AGAAAGCTGAGTGTAAGG
<i>Hsp90</i>	NM_001017963	AGTTATCCTACACCTGAA CATCATCGCTTACTTCTT
<i>Hspa1b</i>	NM_005346	GGACTTTGACAACAGGCT GCTTGTTCTGGCTGATGT
<i>Hus1</i>	NM_004507	TGTTATCTATGTCAAGCAGTA CGGTTCTTGTAAAGTCCTT

<i>Icam-1</i>	NM_000201	AAGAAGATAGCCAACCAATGT TACACGGTGAGGAAGGTT
<i>IL6</i>	NM_000600	CCAATCTGGATTCAATGA GTTCTCACTACTCTCAA
<i>Itgb1</i>	NM_002211	GAGGATTACTTCGGACTTCA GCTGGTGTGTGCTAATG
<i>Lamp1</i>	NM_005561	GCTCCAAAGAAATCAAGACTGT GGTGCCACTAACACATCTG
<i>Lig1</i>	NM_000234	GAAGTGGCAACAGAGAAG CTTTGGAGGTCTTTAGGG
<i>Lig3</i>	NM_002311	GCTATATGTCTTTGGCTTTC GGAATAGGCACAGTTCTT
<i>Lig4</i>	NM_002312	TGAGCACATTGAGAAGGA CAGTAGGAGAAGCACCAA
<i>Mdm2</i>	NM_002392	ATCTTGATGCTGGTGTA AGGCTATAATCTTCTGAGTC
<i>Mgmt</i>	NM_002412	CTCTTCACCATCCGTTT AATCACTTCTCCGAATTTAC
<i>Mmp13</i>	NM_002427	GGCTCTTAATGGTTATGAC GCACTTATCTTCTTAATTCT
<i>Mmp3</i>	NM_002422	GAAGTTACTAGCAAGGACCTC TCCAGCTCGTACCTCATT
<i>Mmp7</i>	NM_002423	TTGATAAGCACTGTTTCT GCAAGTATAGATGAATAAGACA
<i>Mpg</i>	NM_002434	CAACCGAGGCATGTTTCAT TGGAGATGTTTCATGCAGAAG
<i>Mre11a</i>	NM_005590	GCCTGTCCAGTTTCAAAT GGTTGCCATCTTGATAGTT
<i>Msh2</i>	NM_000251	CTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGA ATCATTCTCCTTGATGCCTTAT
<i>Nos2</i>	NM_000625	AATCCAGATAAGTGACATAAG CTCCACATTGTTGTTGAT
<i>Nos3</i>	NM_000603	CAAGGAGACGAAGAGAAC TGGAGTCTTGTGTAGGATA
<i>Nox1</i>	NM_007052	CTCTCCAGCCTATCTCAT AATGTCACATACTCCACTG
<i>Ogg1</i>	NM_002542	AAGAGGTGGCTCAGAAAT GATGTTGTTGTTGGAGGAA
<i>Parp1</i>	NM_001618	GAACGACCTGATCTGGAA CACTTGCTGCTTGTGAA
<i>Pcna</i>	NM_182649	TTACCATAGAGATGAATGAACCA AGTGTCACCGTTGAAGAG

<i>Pold1</i>	NM_002691	TCTGGGATGATGATGATGC GTGTTCTGCCTCCATCTC
<i>Pole</i>	NM_006231	TTTGGCATTGACATTGAG AATCATCATAATCTGGTCTGT
<i>Pten</i>	NM_000314	ATCATCAAAGAGATCGTTA ACCTTACTACATCATCAATA
<i>Rac1</i>	NM_006908	ATCAGTTACACAACCAAT CGTAATCTGTCATAATCTTC
<i>Rad51</i>	NM_002875	AATTAGTTCCAATGGGTTT TGAAGTAGTTTGTCAAGC
<i>Rev1</i>	NM_016316	AACACATATTATTGCCACAA GAATGTAGGAGAGGAGTC
<i>Rev3</i>	NM_002912	AGTGTCATTAGTATCAGGAA TGTAGGAGGTAGGGAATA
<i>RhoA</i>	NM_001664	CCGATGTTATACTGATGTG ACAGAAATGCTTGACTTC
<i>RhoB</i>	NM_004040	TGATCGTGTTCAAGTAAGGAC CAATGTCGGCCACATAGTT
<i>Sele</i>	NM_000450	GCTATGACTTATGATGAG ATTCCAATCCAGTAATAAC
<i>Sod1</i>	NM_000454	TCTGTTTCAATGACCTGTATT GCCTCATAATAAGTGCCATA
<i>Tiam1</i>	NM_003253	TAATGCTCTGAATCCTAGTC GAAACAGAAGAGGCTTTG
<i>Timp2</i>	NM_003255	AAGGAAGTGGACTCTGGAA CTTTGAACATCTTTATCTGCTTGA
<i>Topo II a</i>	NM_001067	ACGGTGTTGGATATTCTAAG AAGCGAGCCTGATTATTC
<i>Topo II b</i>	NM_001068	ATAACATTCCAACCAGAT GGCAATTTCTTTCCATTA
<i>Trex1</i>	NM_016381	TCATGTGAAGAGGGGAGAC GAAGTTGGAGAGGGTGAG
<i>Trp53</i>	NM_000546	AGCACTAAGCGAGCACTG ACGGATCTGAAGGGTGA
<i>Trp63</i>	NM_003722	ATTGTTCTCCGTTCTGTTGATA GTAAGGGTCAGGGCAGTA
<i>Trp73</i>	NM_005427	CACTTTGAGGTCACCTTTC ATCTGGCAGTAGAGTTC
<i>Txnrd1</i>	NM_003330	CGAAATTATGGATGGAAAGTC GAGCCAATGTGATTCTGTA
<i>Vcam-1</i>	NM_001078	TGTCATTGAGGATATTGGAA ATAACTGTATTCTTGGGTGAT

<i>Wee1</i>	NM_001143976	TTCCAGAGATTAAGACAA ATATTCACCTTGAGGAGTC
<i>Wrn</i>	NM_000553	AAGATGTGCTGTAGAAGAA TCGTAAC TATACACAATGGA
<i>Wrnip1</i>	NM_020135	CTGGAGACCAACGAAATC TAATGTCACAAACCTTATGC
<i>Xpa</i>	NM_000380	AAGGAAGTCCGACAGGAA ACACGCTGCTTCTTACTG
<i>Xpc</i>	NM_004628	ACACCTACTACCTCTCAA TAAATAGCAAATCTCCTTTCC
<i>Xrcc1</i>	NM_006297	GAGGAAGTTGGATTTGAA ATTTAGGTCTCTTGGGAA
<i>Xrcc3</i>	NM_005432	CATTGTTCTGTCTTTCT CTCCTTTACCGATTTTACAG
<i>Xrcc4</i>	NM_003401	GTGTGAGTGCTAAGGAAG CTCATCATAGACTGGATCTC

2.1.11 Antikörper

2.1.11.1 Primärantikörper

Tabelle 2.14: Auflistung der verwendeten Primärantikörper.

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung	
			ICC	WB
53BP1	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:500 BSA/PBST	
Cardiac Troponin	Kaninchen	Abcam	1:100 BSA/PBST	
Flk1	Ratte	Becton, Dickinson and Company™	1:50 BSA/PBS	1:1000 Milch/TBST
Oct4 (GT735)	Maus	Abcam	1:100 BSA/PBS	
p-AMPK α (Thr172)	Kaninchen	Cell Signaling Technology		1:1000 BSA/TBST
Pecam1	Kaninchen	Abcam	1:50 BSA/PBS	1:500 Milch/TBST
Pecam1 (H-3)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:200 BSA/PBS	
p-GSK-3 α (Ser21)	Kaninchen	Cell Signaling Technology		1:1000 BSA/TBST

p-GSK-3 β (Ser9)	Kaninchen	Cell Signaling Technology		1:1000 BSA/TBST
p-p70S6K (Thr389)	Maus	Cell Signaling Technology		1:1000 BSA/TBST
Talin-1	Kaninchen	Cell Signaling Technology		1:1000 BSA/TBST
VE-Cadherin	Ratte	eBioscience	1:50 BSA/PBS	1:1000 Milch/TBST
VE-Cadherin (F-8)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:200 BSA/PBS	
β -Aktin (C4)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc		1:2000 TBST
γ H2AX (S139) (JBW301)	Maus	Merck Millipore	1:500 BSA/PBST	

2.1.11.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2.15: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper.

Name	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor [®] 488	Ziege gegen Maus	Life Technologies	1:500-1:2000
Alexa Fluor [®] 488	Ziege gegen Kaninchen	Life Technologies	1:500-1:1000
Alexa Fluor [®] 555	Ziege gegen Maus	Life Technologies	1:500-1:1000
Anti-Kaninchen IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege gegen Kaninchen	Rockland Immunochemicals	1:2000
Anti-Maus IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege gegen Maus	Rockland Immunochemicals	1:2000
Anti-Ratte IgG Peroxidasekonjugiert	Ziege gegen Ratte	Rockland Immunochemicals	1:2000

2.1.12 Sonstige Substanzen

Tabelle 2.16: Auflistung der verwendeten sonstigen Substanzen.

Substanz	Hersteller
Dil acetylated low-density lipoprotein (LDL) from human plasma	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Doxorubicin	Cell Pharm GmbH
Fibronectin	Sigma-Aldrich
Gelatine	Merck Millipore

IL-1 β , rekombinant Maus	BioLegend
Immersionsöl Type-F	Olympus
Matrigel® Matrix Basement Membrane Growth Factor Reduced	Corning
Matrigel® Matrix hESC-qualified	Corning
PageRuler Plus Prestained™ Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.
PBS (ohne Calcium und Magnesium) (-/-)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Poly-D-lysine Hydrobromide	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Calbiochem
RNase Inhibitor RiboLock	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Roti®-Load-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG
StemPro® Accutase® Cell Dissociation Regent (StemPro Accutase)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
TNF- α , rekombinant Maus	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Trypsin/EDTA-Lösung (10 x)	Sigma-Aldrich
Vectashield® mit DAPI	Vector Laboratories

2.1.13 Software

Tabelle 2.17 Auflistung der verwendeten Software.

Bezeichnung	Hersteller
BD Accuri™ C6 Plus	Becton, Dickinson and Company
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad
CellSens Dimension	Olympus
EndNote 8	Clarivate Analytics
Fiji ImageJ	https://imagej.net/Fiji
GraphPad Prism 6	GraphPad
i-control™ Software	Tecan Group AG
Image Lab Software	Bio-Rad
LinRegPCR	http://LinRegPCR.nl
Microsoft Office	Microsoft
Mikroskopsoftware ZEN 2012 (blue edition)	Carl Zeiss Microscopy GmbH
NOVOstar® Software V1.20	BMG Labtech GmbH
Wave 2.6.0	Agilent Technologies
XFluor4	Tecan Group AG

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle beschriebenen zellkulturellen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂.

2.2.1.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Bei den Stammzellen erfolgte täglich ein Wechsel des Kultivierungsmediums. Durch Zugabe des doppelten Volumens an Kultivierungsmedium konnte der Mediumwechsel an einem (hiPSC) bzw. an zwei Tagen (mESC) ausgelassen werden.

2.2.1.1.1 Embryonale Stammzellen der Maus (mESC)

Die Kultivierung der murinen embryonalen Stammzelllinie LF2 (mESC) erfolgte in ES-Medium in einer mit 0,1 % Gelatine beschichteten T25 Zellkulturflasche. Bevor sich die Subkolonien berührten, erfolgte das Passagieren. Dazu wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *phosphate buffered saline*) gewaschen und die Zellen durch die Zugabe von 1 ml 1 x Trypsin/Ethylendiamintetraacetat (Trypsin/EDTA) für ca. 3 min bei Raumtemperatur (RT) abgelöst. Durch Zugabe der doppelten Menge an ES-Medium wurde die Enzymreaktion von Trypsin und damit das Ablösen der Zellen gestoppt. Die abgelöste Zellsuspension wurde in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und mittels Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, RT) pelettiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer ermittelt. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden in frischem ES-Medium resuspendiert und in eine neue mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.1.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)

Die Kultivierung der humanen induzierten pluripotenten Stammzelllinie b4 (hiPSC) erfolgte in StemMACS Medium in einer 6-Well Platte (Zell⁺-Wachstumsoberfläche). Vor dem Passagieren wurde die 6-Well Platte mit Matrigel nach Konzentrationsangaben des Herstellers beschichtet. Dazu wurde das Matrigel zunächst in 4 °C kaltem *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) gelöst. Die Polymerisation des Matrigels erfolgte innerhalb 1 h bei RT in der 6-Well Platte mit 1 ml/Well dieser Matrigellösung. Anschließend wurde die überschüssige Matrigellösung abgesaugt und frisches StemMACS Medium mit

5 μM *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase* (ROCK) -Inhibitor (bekannt als Y-27632) in das beschichtete Well vorgelegt. Der ROCK-Inhibitor erhöht das Überleben von abgelösten (und vereinzelt) humanen embryonalen Stammzellen (hESC, *human embryonic stem cells*) durch die Blockierung der Dissoziations-induzierten Apoptose (Watanabe *et al.*, 2007).

Das Passagieren der hiPSC erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Dazu wurde zunächst das Medium der kultivierten hiPSC abgenommen und aufbewahrt. Der Zellerasen wurde einmal mit PBS ohne Calcium und Magnesium (PBS (-/-)) gewaschen und erneut für ca. 5 min bei RT mit PBS (-/-) inkubiert. Sobald sich der Rand der Kolonien langsam abzulösen begann, wurden die Zellen mit einem Zellspatel abgelöst und mit dem vorher abgenommenen Medium vorsichtig resuspendiert, um große Kolonien beizubehalten. Die abgelösten Zellen in diesem Medium wurden in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und mittels Zentrifugation (38 x g, 2 min, RT) pelettiert. Durch die geringe Beschleunigung befanden sich größere hiPSC-Kolonien im Pelett, während sich vereinzelt differenzierte Zellen im Überstand befanden. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pelett vorsichtig resuspendiert und die hiPSC-Kolonien-Lösung (1:6 Verdünnung) wurde in eine Matrigelbeschichtete 6-Well Platte mit vorgelegtem Medium und ROCK-Inhibitor ausgesät.

Für die Differenzierung hingegen werden vereinzelt Zellen benötigt. Dazu wurden die hiPSC nach einmaligem Waschen mit PBS (-/-) für 2 min bei RT mit StemPro Accutase inkubiert. Die Ablösung und Vereinzelung der Zellen durch Accutase ist im Vergleich zu einer Vereinzelung mit Trypsin/EDTA schonender zu den empfindlichen hiPSC, da eine hohe Zellviabilität aufrechterhalten wird. Nach dieser Ablösung und Vereinzelung wurden die Zellen auch hier mit dem zuvor abgenommenen Medium resuspendiert und durch Zentrifugation (200 x g, 4 min, RT) pelettiert. Das Zellpelett wurde resuspendiert und mit einer 1:1 Verdünnung einer 0,4 %igen Trypanblaulösung versetzt, um die Zellvitalität bestimmen zu können. Dabei dringt der Farbstoff Trypanblau durch die perforierte Zellmembran in tote Zellen ein und färbt diese blau. In vitale, lebende Zellen kann der Farbstoff nicht eindringen und erlaubt somit die Bestimmung der Zellvitalität. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl der vitalen Zellen ermittelt. $0,3 \times 10^5$ hiPSC wurden pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät (Abschnitt 2.2.2.3).

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Die dauerhafte Lagerung von Zellen erfolgte in Kryovials in flüssigem Stickstoff bei – 196 °C. Die Kryokonservierung der verwendeten Stammzelllinien wird in den folgenden Abschnitten 2.2.1.2.1 und 2.2.1.2.2 beschrieben.

2.2.1.2.1 Embryonale Stammzellen der Maus (mESC)

Für die Kryokonservierung der Zellen wurden sie wie in 2.2.1.1.1 beschrieben aus der Zellkulturflasche abgelöst und pelettiert. In einem Kryovial wurde 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 80 % fetalem Kälberserum (FCS, *fetal calf serum*) und 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO), vorgelegt. Anschließend wurden ca. 2×10^6 Zellen auf 1 ml ES-Medium aufgefüllt und in das Kryovial überführt. Nach zweimaligem invertieren des Kryovials wurde es in einem Einfrierbehälter für 24 h bei – 80 °C zwischengelagert.

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis sich nur noch ein kleiner Eiskristall im Kryovial befand. Dieser wurde durch Zugabe und mehrfaches Resuspendieren mit 500 µl FCS aufgelöst und der gesamte Inhalt in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen mit 3 ml vorgelegtem ES-Medium überführt. Nach der Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pelett in 5 ml ES-Medium resuspendiert und in eine zuvor mit 0,1 % Gelatine beschichtete T25 Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung pipettiert.

2.2.1.2.2 Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC)

Für das Einfrieren von hiPSC wurde das Einfriermedium Cryo-Brew verwendet. Für die Kultivierung geerntete Zellen wurden wie in 2.2.1.1.2 beschrieben abgelöst und pelettiert. Das Zellpelett wurde in 1,8 ml Cryo-Brew aufgenommen, in ein Kryovial überführt und in einem Einfrierbehälter für 24 h bei – 80 °C zwischengelagert.

Das Auftauen der hiPSC erfolgte ebenfalls im Wasserbad bei 37 °C, bis nur noch ein kleiner Eiskristall sichtbar war. Anschließend wurde der Inhalt in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und tropfenweise 3 ml DMEM Medium hinzugegeben. Nach der Zentrifugation (200 x g, 4 min, RT) wurde das Zellpelett vorsichtig in 1 ml StemMACS Medium aufgenommen, resuspendiert und in ein zuvor mit Matrigel beschichtetes 6-Well mit 1 ml vorgelegtem StemMACS Medium mit 10 µM ROCK-Inhibitor überführt. Durch die Zugabe des (höher konzentrierten) ROCK-Inhibitors wird nicht nur das Überleben von abgelösten

hESC erhöht, sondern auch das Überleben von kryokonservierten, vereinzelt hESC nach dem Auftauen (Li *et al.*, 2009).

2.2.2 Differenzierungen

Die Differenzierungen der Stammzellen (mESC und hiPSC) wurden in den Passagen 17 bis 44 durchgeführt. Vor Beginn der Differenzierung befanden sich die Zellen mindestens eine Woche (mESC) bzw. zwei Wochen (hiPSC) in Kultur. Für einige Versuche wurden von dem Standard 6-Well Differenzierungsformat abweichende Formate, wie 12-, 24- oder 96-Well Platten, verwendet. Alternativ erfolgte die Differenzierung auch auf Deckgläsern, um immunzytochemische Analysen durchführen zu können. Für alle Differenzierungsformate wurde dasselbe Prinzip der Beschichtung und der Aussaat mit angepasster Zellzahl (Abschnitt 2.2.2.1, Abschnitt 2.2.2.2 und Abschnitt 2.2.2.3) benutzt.

2.2.2.1 mESC Endothelzellendifferenzierung

Für die endotheliale Differenzierung von mESC wurden modifizierte Protokolle von Chiang und Wong (Chiang and Wong, 2011) sowie von Hennicke und Kollegen (Hennicke *et al.*, 2015) verwendet. Zunächst wurden 6-Well Platten für 1 h (RT) mit Poly-D-Lysin Hydrobromid (PDL) (10 µg/ml) vorbeschichtet, damit die Oberfläche wasserabweisend wird. Nach dreimaligem Waschen mit autoklaviertem, destilliertem Wasser wurden die Platten mit 1 ml Fibronectin (10 µg/ml) pro Well über Nacht (37 °C) beschichtet. Es wurden $0,2 \times 10^5$ mESC pro Well einer zuvor beschichteten 6-Well Platte in 2 ml Präinkubationsmedium (N2B27 Medium ohne Wachstumsfaktoren) ausgesät. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag null (d0) festgelegt. Es handelt sich um eine direkte Differenzierung, bei der an bestimmten Tagen definierte Wachstumsfaktoren und niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) dem Medium hinzugefügt werden (Tabelle 2.9, Abbildung 3.1). An Tag zwei (d2) wurde das Medium durch das Mesoderm-Induktionsmedium (N2B27-MI) ersetzt. N2B27-MI enthält die Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen Activin A, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *bone morphogenic protein 4* (BMP4) und den Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor (GSKi), welche die Differenzierung der Zellen in die mesodermale Richtung lenken. An Tag vier (d4) wird das Medium durch Endothelzell-Induktionsmedium (N2B27-VM) ersetzt. N2B27-VM prägt das endotheliale Schicksal der Zellen durch die Zugabe von bFGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *activin receptor-like kinase receptor inhibitor* (ALKi) und Forskolin. Bei Analysen, die an Tag acht erfolgten, wurde an Tag sechs (d6) zu N2B27 Medium gewechselt.

2.2.2.2 mESC Kardiomyozytendifferenzierung

Für die Differenzierung der mESC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll von Yang und Kollegen (Yang *et al.*, 2008) verwendet. Wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben wurden 6-Well Platten zunächst mit PDL vorbeschichtet, mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Fibronectin über Nacht beschichtet. Es wurden $0,15 \times 10^5$ mESC pro Well einer zuvor beschichteten 6-Well Platte in 2 ml Präinkubationsmedium ohne Insulin (N2B27-Insulin Medium ohne Wachstumsfaktoren) ausgesät. Dieser Zeitpunkt wurde als Tag null (d0) festgelegt. Auch hier handelt es sich durch die Zugabe von definierten Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen an bestimmten Tagen zu dem Medium, um eine direkte Differenzierung (Tabelle 2.9, Abbildung 3.4). An Tag zwei (d2) wurde das Medium durch das Mesoderm-Induktionsmedium (N2B27-Insulin-MI) ersetzt. N2B27-Insulin-MI enthält die gleiche Zusammensetzung an Activin A, bFGF, BMP4 und GSKi, um die Differenzierung der Zellen in die mesodermale Richtung zu lenken, wie bei der Endothelzell-Differenzierung. An Tag vier (d4) erfolgt ein Mediumwechsel durch Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1 (N2B27-Insulin-1 Medium). Dieses prägt die kardiale Spezifikation bzw. die Entwicklung des Endoderms durch Zugabe von VEGF und *wingless inhibitor* (WNT-C59). An den Tagen sechs (d6), acht (d8) und elf (d11) erfolgte der Mediumwechsel mit Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2 (N2B27-Insulin-2 Medium), welches nur VEGF enthält und das kardiale Schicksal der Zellen prägt.

2.2.2.3 hiPSC Endothelzellendifferenzierung

Für die Differenzierung von hiPSC in Endothel-ähnliche Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll von Liu und Kollegen (Liu *et al.*, 2016a) verwendet. Eine 6-Well Platte Cell⁺ wurde mit Wachstumsfaktor-reduziertem (GFR, *Growth Factor Reduced*) Matrigel nach Angaben des Herstellers beschichtet. 1,5 ml StemMACS Medium und 5 μ M ROCK-Inhibitor wurden pro Well vorgelegt. $0,3 \times 10^5$ hiPSC in 0,5 ml StemMACS Medium wurden pro Well hinzugegeben und damit ausgesät. Der Zeitpunkt der Aussaat wurde als Tag null (d0) festgelegt. Durch die Zugabe von definierten Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen an bestimmten Tagen zu dem Medium wurde eine direkte Differenzierung gewählt (Tabelle 2.9, Abbildung 3.26). An Tag eins (d1) erfolgte ein Mediumwechsel mit StemMACS Medium. An Tag zwei (d2) wurde das Medium mit dem Mesoderm-Induktionsmedium (DMEM/F12) gewechselt. DMEM/F12 wurde mit der niedermolekularen Verbindung GSKi versetzt, um die Differenzierung zu Mesodermzellen zu initiieren. An Tag

vier (d4) wurde dieses Medium durch das Endothelzell-Induktionsmedium (ECBM), welches mit bFGF und VEGF versetzt war, ersetzt, um die Zellen zu Endothelzellen zu differenzieren.

2.2.3 Behandlung der Zellen mit Genotoxinen

Die Behandlung der Zellen mit dem als Tumorthapeutikum verwendeten Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin (Abschnitt 1.3.2.1) erfolgte für 2 h. Die kurze Behandlungsdauer von 2 h wird als Pulsbehandlung bezeichnet. Die Bestrahlung der Zellen mit ionisierender Strahlung (Abschnitt 1.3.1) erfolgte mit einer Cäsium¹³⁷-Quelle in dem Bestrahlungsgerät Gammacell® 1000 Elite. Nach der Behandlungs- bzw. Inkubationszeit wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und in frischem Medium bis zur Analyse weiter kultiviert.

2.2.4 Vorbereitung von Deckgläsern

Für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Damit die Zellen auf den Deckgläsern anwachsen konnten, musste die Deckglas-Oberfläche angeraut werden. Dies erfolgte in einer Metalldose durch eine Erhitzung bei 220 °C für 6 h. Die Dose mit den hitzesterilisierten Deckgläsern wurde nur unter sterilen Bedingungen geöffnet und verwendet. Die Deckgläser wurden in 6- oder 12-Well Platten gegeben und diese je nach Zelltyp entweder mit Gelatine (Abschnitt 2.2.1.1.1) oder PDL und Fibronectin (Abschnitt 2.2.2.1 und Abschnitt 2.2.2.2) oder mit Matrigel (Abschnitt 2.2.1.1.2 und Abschnitt 2.2.2.3) beschichtet.

2.2.5 Analysen zur Charakterisierung differenzierter Zellen

2.2.5.1 Immunzytochemie

Um die Expression von zelltypspezifischen Proteinen in Stammzellen sowie differenzierten Zellen nachzuweisen, wurden Markerproteine angefärbt und immunzytochemisch detektiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert bzw. differenziert. Nach der Abnahme des Kultivierungs- bzw. Differenzierungsmediums, wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 4 °C kaltem 4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min, RT). Anschließend wurde der Zellrasen dreimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Antigenbindungsstellen wurden mit 5 % BSA/PBS, bei späterer Anfärbung von Oberflächenproteinen, oder mit 5 % BSA/PBST, bei späterer Anfärbung von zytosolischen Proteinen, blockiert (1 h, RT). Es folgte die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper (Tabelle 2.14) über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4 °C. Anschließend wurde der überschüssige Primärantikörper durch

dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 2.15) unter Lichtausschluss in PBS bzw. PBST inkubiert (2 h, RT, Feuchtkammer). Alle nachfolgenden Schritte wurden im Dunkeln ausgeführt. Die auf Deckgläsern fixierten Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) -haltigem Vectashield® auf einem Objektträger eingedeckelt und dieser mit Nagellack versiegelt. Der Farbstoff DAPI interkaliert in die doppelsträngige DNA und ermöglicht die Detektion von Zellkernen. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der Software CellSens Dimension.

Für die Anfärbung des Aktin-Zytoskeletts wurde Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -gekoppeltes Phalloidin verwendet. Phalloidin ist ein zyklisches Peptid und das Toxin des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, welches sich an filamentöses Aktin anlagert (Dancker *et al.*, 1975). Die auf Deckgläsern kultivierten bzw. differenzierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 °C kaltem 4 % Paraformaldehyd/PBS für 15 min bei RT. Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 5 min mit Aceton permeabilisiert und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit FITC-gekoppeltem Phalloidin (1 mg/ml) für 1 h unter Lichtausschluss wurden unspezifische Antigenbindungsstellen mit 1 % BSA/PBS blockiert (45 min, RT). Die nachfolgenden Schritte wurden alle im Dunkeln ausgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit DAPI-haltigem Vectashield® auf einem Objektträger eingedeckelt und dieser mit Nagellack versiegelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.5.2 Aufnahme von Dil-ac-LDL

Um die Rezeptor-vermittelte, Endothelzell-spezifische Aufnahme von humanem Lipoprotein geringer Dichte (LDL, *low density lipoprotein*) zu analysieren, wurde 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyaninperchlorat-markiertes acetyliertes LDL (Dil-ac-LDL) nach Herstellerangaben verwendet. Modifiziertes Dil-ac-LDL bindet im Gegensatz zu normalem LDL nicht an LDL-Rezeptoren, sondern an *Scavenger* Rezeptoren auf der Zellmembran und wird ebenfalls durch Endozytose aufgenommen. Die mit Dil-ac-LDL-beladenen Transportvesikel fusionieren im Zytosol mit Lysosomen und der Dil-ac-LDL Komplex wird von lysosomalen Enzymen abgebaut. Der Fluoreszenzfarbstoff Dil reichert sich dabei in den lysosomalen Membranen an.

Für die Analyse wurden Zellen auf hitzesterilisierten Deckgläsern ausgesät und gemäß Abschnitt 2.2.1.1.1 und Abschnitt 2.2.2.1 kultiviert bzw. differenziert. 10 µg/ml des Dil-ac-LDL Komplexes wurden dem Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellen für 4 h bei 37 °C im Inkubator mit diesem Komplex inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 °C kaltem 4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min, RT). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben mit DAPI-haltigem Vectashield® auf einem Objektträger eingedeckelt und dieser mit Nagellack versiegelt. Die mikroskopische Analyse der Aufnahme von Dil-ac-LDL erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.5.3 Calcium-Assay

Um die Endothelzell-spezifische Funktion der intrazellulären Calcium (Ca^{2+}) -Freisetzung nach Stimulation der purinergen Rezeptoren mit Adenosintriphosphat (ATP) zu untersuchen, wurde der Ca^{2+} -Assay verwendet. Bei dem Ca^{2+} -Assay handelt es sich um einen funktionellen Assay zur direkten Bestimmung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dabei wurde Oregon Green 488 BAPTA-1/AM, ein membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, verwendet, der eine Ca^{2+} -komplexierende Komponente, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraethansäure (BAPTA), enthält. Die Carbonsäurereste des Farbstoffes liegen zunächst acetoxymethyliert vor, wodurch der Farbstoff zellpermeabel wird und mittels passiver Diffusion durch die Zellmembran in das Zellinnere gelangt. Dort werden die Acetoxymethylester (AM) durch unspezifische Esterasen enzymatisch gespalten. Der Farbstoff ist somit nicht mehr zellpermeabel und wird im Zytoplasma lebender Zellen angereichert. Die Komplexbildung mit Ca^{2+} innerhalb der Zelle erhöht die Fluoreszenzemission des Farbstoffes proportional zur Ca^{2+} -Konzentration. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann somit durch einen Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden.

Ca^{2+} Fluoreszenzmessungen wurden mit Oregon Green 488 BAPTA-1/AM wie beschrieben durchgeführt (Kassack *et al.*, 2002). Die Zellen wurden zunächst trypsiniert, in frischem Medium resuspendiert und für 15 min bei 5 % CO_2 und 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Krebs-HEPES-Puffer (KHP) gewaschen und in KHP aufgenommen. Die Zellsuspension wurde zu 1,5 µM Oregon Green 488 BAPT-1/AM mit 0,03 % Pluronic F-127 gegeben und unter Schütteln (600 rpm) für 45 min bei RT inkubiert. Pluronic F-127 erleichtert als nichtionisches Tensid-Polyol die Auflösung des wasserunlöslichen Oregon Greens 488 BAPTA-1/AM in physiologischen Medien. Danach wurde die farbstoffbeladene Zellsuspension mit KHP gewaschen, um Farbstoffreste zu entfernen.

Anschließend wurden die Zellen in eine 96-Well Platte mit einer Zelldichte von 65.000 Zellen/Well ausgesät. Die 96-Well Platte wurde in den NOVOstar® Mikroplattenleser mit eingebautem Pipettiersystem überführt. Nach einer 30-minütigen Ruhepause wurden entweder die Pufferkontrolle oder zur Stimulation der Ca^{2+} -Freisetzung verschiedene Konzentrationen ATP in einzelne Wells (Triplikate) hinzu pipettiert. Die zeitabhängigen Veränderungen in der Fluoreszenz wurden gemessen. Die Anregung erfolgte bei 485 nm und die Emission bei 538 nm. Die Injektionszeit betrug 7,2 s und die Gesamtmesszeit 31,2 s. Die Auswertung der gemessenen Daten der Fluoreszenz-Zeit-Verläufe erfolgte mit Hilfe der NOVOstar®-Software. Die Ca^{2+} -Messungen wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Kassack des Instituts für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt, welche Laborräume und Geräte zur Verfügung stellte.

2.2.5.4 ATP-Luciferase Assay

Eine Veränderung der Mitochondrienfunktion bzw. des bioenergetischen Status der Zelle kann mit Hilfe des zellulären ATP-Gehalts gemessen werden. Dazu wurde das Lumineszent ATP Detektionskit von Abcam nach Herstellerangaben verwendet. Zuerst wurden in einem Lyseschritt die ATPasen der Zellen inaktiviert, damit das erhaltende Lumineszenz-Signal am Ende des Versuches ausschließlich der Menge des intrazellulären ATP-Gehalts entspricht. Der Assay basiert auf der Umsetzung von ATP mit D-Luciferin, Luciferase und Sauerstoff zu Oxyluciferin. Dabei entsteht neben Adenosinmonophosphat (AMP), anorganischem Diphosphat (PP_i) und CO_2 auch Licht. Das emittierte Licht ist dabei proportional zu der ATP-Konzentration in der Zelle.

Zur Bestimmung des zellulären ATP-Gehalts wurden die Zellen in einer 96-Well Platte in Triplikaten kultiviert bzw. differenziert und behandelt. Zur Lyse der Zellen wurde der Lysepuffer (Bestandteil des Kits) für 5 min unter Schütteln (500 rpm) bei RT hinzugegeben. Anschließend wurde die Substratlösung bestehend aus D-Luciferin und Luciferase (Bestandteil des Kits) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls für 5 min unter Schütteln bei RT. Bevor die Lumineszenz mittels Tecan Infinite® F200 gemessen wurde (Dauer: 4 sec; Amplitude: 5 mm; Integrationszeit: 5000 ms), erfolgte eine Inkubationsphase von 10 min im Dunkeln.

Da je nach Tag der Analyse bzw. Zelltyp und verwendeter Doxorubicin-Konzentration eine unterschiedliche Zellzahl vorlag, wurde der gemessene ATP-Gehalt auf die ermittelte Viabilität der Zellen (Abschnitt 2.2.7.1) bezogen.

2.2.5.5 Metabolische Analysen mittels Seahorse XFe Analyzer

Die metabolischen Analysen mittels *Seahorse* XFe Analyzer wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reichert des Instituts für Biochemie und Molekulare Biologie I der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Nach Durchführung der Differenzierung bzw. Kultivierung und anschließender Behandlung der Zellen, wurden die einzelnen Schritte des eigentlichen *Seahorse* Versuches von einem Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Reichert durchgeführt.

2.2.5.5.1 Messprinzip des Seahorse XFe96 Extracellular Flux Analyzers für die mitochondriale Respiration mittels Mito Stress Test Kit

Der *Seahorse* XFe96 Extracellular Flux Analyzer ermöglicht als Analysegerät die Untersuchung des Zellmetabolismus *in vitro*. Die Technik beruht auf einem Multiwell-Verfahren. In jedem Well wird über einen Sensor, der mit zwei Fluorophoren ausgestattet ist, der Sauerstoffverbrauch und die extrazelluläre Ansäuerung im Medium über die Versuchsdauer in Echtzeit gemessen. Die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, *oxygen consumption rate*) gibt Aufschluss über die mitochondriale Respiration, während die Ansäuerungsrate (EACR, *extracellular acidification rate*) Aussagen über die Glykolyse ermöglicht.

Der Mito Stress Test wurde durchgeführt, um über die Erfassung der mitochondrialen Atmung der Zelle Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion zu untersuchen. Dazu wurden vier pharmakologische Modulatoren der Elektronentransportkette (Oligomycin, Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)phenylhydrazon (FCCP), Rotenon und Antimycin A) eingesetzt und nacheinander zu den Zellen gegeben (Abbildung 2.1). Zunächst wurde die Basislinie gemessen, welche die basale Respiration darstellt. Hierzu erfolgten drei Messungen innerhalb von 13 min. Nach jeder Zugabe eines Modulators fanden ebenfalls drei Messungen innerhalb von 13 min statt. Der zuerst hinzugefügte Modulator Oligomycin inhibiert die ATP Synthase von Komplex V und gibt Aufschluss über die ATP Produktion der Mitochondrien bzw. der Zelle. Es folgt die Zugabe von FCCP, einem mitochondrialen Entkoppler. FCCP lässt den Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran zusammenbrechen und unterbricht damit das mitochondriale Membranpotenzial. Dadurch wird die maximale Respiration ausgelöst. Gleichzeitig kann die freie respiratorische Kapazität aus der Differenz der maximalen und der basalen Atmung, die zu Beginn des Versuches aufgezeichnet wurde, errechnet werden. Die letzte Zugabe ist ein Gemisch aus Rotenon und Antimycin A. Erster inhibiert Komplex I der Atmungskette während Letzterer

Komplex III inhibiert. Dies führt zur Hemmung der mitochondrialen Respiration und ermöglicht die Berechnung der nicht-mitochondrialen Respiration. Die abschließende Analyse der OCR erfolgte mittels Wave Software.

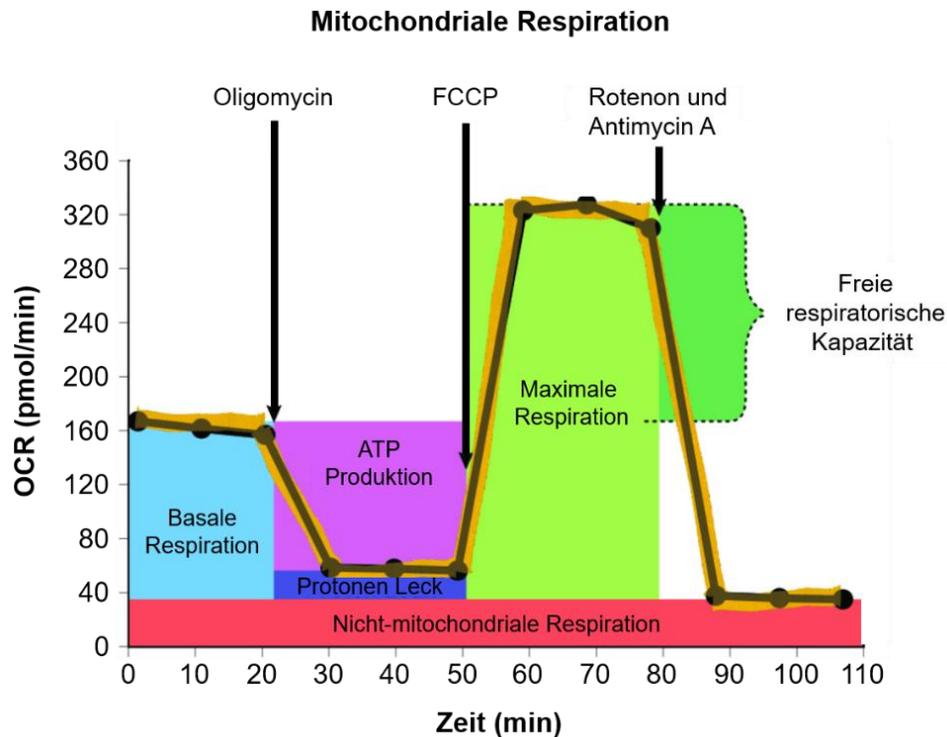


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Seahorse XF Cell Mito Stress Tests mit den verschiedenen Parametern der mitochondrialen Respiration.

Versuchsablauf des Mit Stress Tests mit zeitlichem Verlauf der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, oxygen consumption rate) nach Zugabe verschiedener Inhibitoren (Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A), um die mitochondriale Atmung der Zellen zu analysieren (modifiziert nach Seahorse XF Cell Mito Stress Kit Benutzerhandbuch). ATP: Adenosintri-phosphat, FCCP: Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)-phenylhydrazon.

2.2.5.5.2 Etablierung von Seahorse-Messungen einer neuen Zelllinie

Um eine optimale Seahorse-Messung garantieren zu können, ist es entscheidend, eine geeignete Zellzahl einer Zelllinie vor der eigentlichen Messung zu bestimmen. Hierzu wurden mESC in Gelatine-beschichtete XFe 96-Well Seahorse-Platten kultiviert. Die endotheliale Differenzierung der mESC (in EC) erfolgte in Fibronectin-beschichteten XFe 96-Well Seahorse-Platten. Getestet wurden Zellzahlen zwischen $0,4$ und $1,0 \times 10^4$ Zellen pro Well für mESC und Zellzahlen zwischen $0,5$ und $3,5 \times 10^2$ Zellen pro Well für die Endothelzell-differenzierung. Gleichzeitig wurde auch die geeignete zelltypspezifische Konzentration an FCCP ermittelt. Getestet wurden Konzentrationen zwischen $0,25 \mu\text{M}$ und $2 \mu\text{M}$. Tabelle 2.18 zeigt die ermittelte optimale Zellzahl und FCCP Konzentration, die für

den in Abschnitt 2.2.5.5.3 beschriebenen Versuch zur Bestimmung der mitochondrialen Respiration verwendet wurde.

Tabelle 2.18: Auflistung der etablierten Zellzahlen und FCCP-Konzentrationen für Messungen mit dem Seahorse XFe Analyzer.

mESC: Embryonale Stammzellen der Maus, EC: Endothel-ähnliche Zellen, FCCP: Carbonylcyanid-4-(trifluormethoxy)-phenylhydrazon.

Zelllinie	Zellzahl	FCCP Konzentration
mESC	$1,0 \times 10^4$	0,25 μM
EC	$3,5 \times 10^2$	2 μM

2.2.5.5.3 Bestimmung der mitochondrialen Respiration

Die Sauerstoffverbrauchsrate (ORC) wurde mittels *Seahorse* XFe96 Extracellular Flux Analyzer nach Herstellerangaben für den Mito Stress Test gemessen. Hierzu wurden mESC in Gelatine-beschichtete XFe 96-Well *Seahorse*-Platten kultiviert und mit Doxorubicin behandelt. Die endotheliale Differenzierung der mESC in EC und die anschließende Behandlung mit Doxorubicin erfolgte in Fibronectin-beschichtete XFe 96-Well *Seahorse*-Platten. Das spezielle *Seahorse* Versuchsmedium (Tabelle 2.9) wurde für diesen Versuch angesetzt, auf 37 °C erwärmt und der pH auf 7,4 eingestellt. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit ihrem jeweiligen Versuchsmedium gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen im jeweiligen Versuchsmedium für 1 h im Inkubator bei 37 °C ohne CO₂. Bei der anschließenden Messung im *Seahorse* XFe96 Extracellular Flux Analyzer wurden folgende Konzentrationen der zu injizierenden Komponenten verwendet: für Oligomycin 1 μM , für FCCP 0,25 μM für mESC und 2 μM für EC, Rotenon und Antimycin A wurden jeweils mit 0,5 μM eingesetzt. Nach der Messung wurde eine Normalisierung auf die Zellzahl durch eine Hoechst Färbung durchgeführt. Die anschließende Auswertung unter Berücksichtigung der Zellzahl erfolgte mit der Agilent *Seahorse* Wave Software.

2.2.6 Molekularbiologie

2.2.6.1 DNA-Isolierung

Gesamt-DNA wurde mit dem *DNeasy[®] Blood & Tissue Kit* der Firma Qiagen isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers halbautomatisch unter Verwendung des *QIAcubes* nach dem Protokoll „*Purification of total DNA from animal blood or cells V2*“. Das Prinzip dieser DNA-Isolierung beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran unter

Anwesenheit von chaotropen Salzen. Die DNA wird durch zwei Waschschriffe auf der Säulenmembran gereinigt und anschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung wurden Zellpeletts in PBS resuspendiert und die Isolierung der genomischen DNA nach Herstellerangaben mit Hilfe des *QIAcubes* durchgeführt. Die Konzentration und Qualität der gewonnenen DNA wurde mittels NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Reine DNA hat bei den Absorptionsverhältnissen von 260 nm/230 nm einen Wert zwischen 2,0 bis 2,2 und bei 260 nm/280 nm einen Wert von ~1,8. Die gewonnene DNA wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6.2 RNA-Isolierung

Zur Gesamt-RNA-Isolierung wurde das RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Je nach Anzahl der Proben wurde die RNA nach Angaben des Herstellers manuell oder halbautomatisch unter Verwendung des *QIAcubes* nach dem Protokoll „*Purification of total RNA from animal tissues and cells including DNase digestion*“ isoliert. Analog zur DNA-Isolierung, beruht das Prinzip dieser RNA-Isolierung auf der Bindung von RNA an eine Silikamembran unter Anwesenheit von chaotropen Salzen. Durch mehrere Waschschriffe wird die RNA auf der Säulenmembran gereinigt und anschließend mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

Für die Isolierung wurden Zellpeletts in Dithiothreitol (DTT) -haltigem RLT-Puffer (40 µl DTT (1 M) je 1 ml RLT Puffer) lysiert. Zusätzlich wurde ein DNase Verdau auf der RNA-bindenden Membran durchgeführt, um genomische DNA-Kontaminationen zu entfernen. Die Konzentration und Qualität der gewonnenen RNA wurde mittels NanoVue™ Plus Spectrophotometer bestimmt. Reine RNA hat bei den Absorptionsverhältnissen von 260 nm/230 nm einen Wert zwischen 2,0 bis 2,2 und bei 260 nm/280 nm einen Wert von ~2,0. Die gewonnene RNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.6.3 cDNA-Synthese

500-2000 ng isolierter Gesamt-RNA (Abschnitt 2.2.6.2) wurden mittels reverser Transkription mit dem *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird mit Hilfe der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, eine zur mRNA komplementäre cDNA synthetisiert. Durch die Verwendung von *Random Primers* wird eine quantitative Erststrangsynthese aller

RNA-Spezies erreicht. Als RNase-Inhibitor wurde RiboLock verwendet. Die hergestellte cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.6.4 Quantitative *real-time* PCR

Für die quantitative *real-time* Polymerasekettenreaktion (PCR) (qRT-PCR) wurden das SensiMix™ SYBR Hi-ROX Kit und das CFX96™ *Real-time* PCR Detektionssystem verwendet. Das Prinzip der qRT-PCR beruht darauf, dass der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green in die doppelsträngige DNA interkaliert und die gemessene SYBR-Green Fluoreszenz proportional zu der gebildeten DNA-Menge steigt. Die Fluoreszenz wurde nach jedem Amplifizierungszyklus detektiert. Die Quantifizierung basiert auf der Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes (Cq-Wert). Der Cq-Wert zeigt den Beginn der exponentiellen Phase an, ab dem die SYBR-Green Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt.

Ein Reaktionsansatz umfasst 20 ng cDNA (Abschnitt 2.2.6.3) und 0,25 µM der eingesetzten Primer (Tabelle 2.10, Tabelle 2.11, Tabelle 2.12 und Tabelle 2.13). Alle Reaktionen erfolgten in Duplikaten. Die qRT-PCR wurde wie folgt durchgeführt: 1. Polymeraseaktivierung, bei 95 °C für 10 min, 2. 45 Amplifizierungszyklen bestehend aus der Denaturierung, bei 95 °C für 15 sec, der Primerhybridisierung bei 55 °C für 15 sec und der Elongation bei 72 °C für 17 sec, und 3. die Erstellung einer Schmelzkurve des PCR-Produktes, bei 95 °C für 1 min, 55 °C für 1 min und 65 °C für 5 sec. Am Ende jedes Laufes wurden die Schmelzkurven analysiert, um die Spezifität des Amplifikationsproduktes zu überprüfen. PCR-Produkte, die erst nach mehr als 35 Zyklen detektierbar waren, wurden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Die mRNA Expressionslevel wurden auf die Referenzgene β -Aktin und Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) oder ribosomales Protein L32 (RPL32) normalisiert und mittels der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software errechnet. Die relative mRNA Expression wurde in den jeweiligen unbehandelten Kontrollen (undifferenzierte oder differenzierte Zellen) gleich 1,0 gesetzt. Veränderungen in der mRNA Expression von $\leq 0,5$ und $\geq 2,0$, verglichen zur jeweiligen Kontrolle, wurden als biologisch relevant angesehen.

2.2.6.4.1 Bestimmung des mitochondrialen DNA-Gehalts durch qRT-PCR

Die Menge des mitochondrialen DNA-Gehalts in Relation zum nukleären DNA-Gehalt wurde mittels qRT-PCR bestimmt (Marechal *et al.*, 2011). Die Gesamt-DNA wurde wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben aus Zellen isoliert. Die Analyse erfolgte in Duplikaten wie in Abschnitt

2.2.6.4 beschrieben mit einer DNA-Konzentration zwischen 9 ng und 35 ng. Die DNA Expression der mitochondrialen Cytochrom Oxidase Untereinheit II (Cox2) wurde auf die Expression der genomischen 18S ribosomalen DNA (Rn18S) normalisiert (Primer-Sequenzen Tabelle 2.10). Dieses Verhältnis von Cox2/Rn18S wurde in undifferenzierten, unbehandelten mESC gleich 1,0 gesetzt.

2.2.6.5 Microarray Analysen zur Erfassung der mRNA Expression

Bei dem Microarray handelt es sich um ein technisches Verfahren aus der Halbleiterindustrie. Diese *high throughput* Methode dient der Analyse der Genexpression. Kleine fluoreszenzmarkierte DNA-Sequenzen befinden sich auf der meist aus Glas bestehenden Oberfläche. Durch Hybridisierung lagert sich die mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte Probe bzw. die entsprechende RNA-Sequenz komplementär an die DNA-Sequenz an. Durch eine komplementäre Bindung von der Probe an das Substrat entsteht eine Mischfarbe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe. Darüber kann mittels einer hochauflösenden Laserkamera eine Aussage über die Expression der Gene getroffen werden.

Die Microarray Analysen wurden bei dem *Genomics & Transcriptomic* Labor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Auftrag gegeben und durchgeführt. Für die Durchführung wurde 1 µg RNA benötigt. Gewählt wurde der sogenannte *Affymetrix GeneChip PrimeView human; 3' IVT Labeling Microarray*. Die Auswertung der generierten Rohdaten wurde durchgeführt von dem Institut für Stammzellforschung und Regenerative Medizin Düsseldorf, unter der Leitung von Prof. Dr. Adjaye.

2.2.7 Analyse der Zellviabilität

2.2.7.1 Alamar Blue-Assay

Um den Einfluss von Doxorubicin auf die Viabilität von Zellen zu untersuchen, wurde der Alamar Blue-Assay durchgeführt (O'Brien *et al.*, 2000). Hierbei reduzieren lebende Zellen den blauen, wasserlöslichen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid (Rasazurin) zu rosafarbenem, fluoreszierendem 7-Hydroxyphenoxazin-3-on (Resorufin). Die Reduktionsrate des Resazurins korreliert direkt mit der Anzahl lebender Zellen, woraus die Zellviabilität bzw. Zytotoxizität und die Proliferation abgeleitet werden kann (Abbildung 2.2).

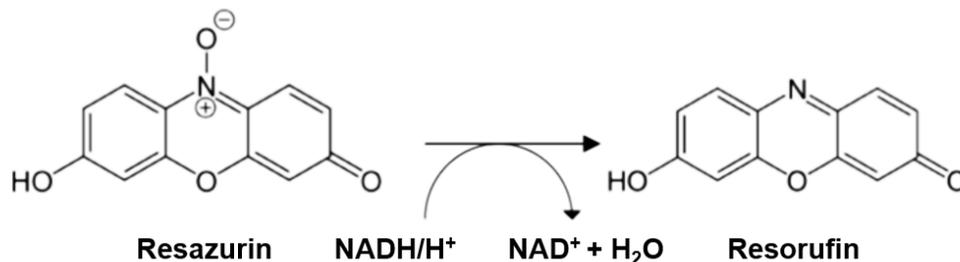


Abbildung 2.2: Prinzip des Alamar Blue-Assays.

Lebende Zellen setzen das nicht-fluoreszierende Substrat 7-Hydroxyphenoxazin-3-on-10-oxid (Resazurin) zu dem pinkfarbenen, fluoreszierenden 7-Hydroxyphenoxazin-3-on (Resorufin) um. Die anschließend gemessene Fluoreszenz (Exzitation: 353 nm; Emission: 590 nm) dient als Maß für die Zellviabilität. NADH: Nikotinamidadenindinukleotid-Hydrid, NAD: Nikotinamidadenindinukleotid.

Für diesen Versuch wurden Zellen in 12-Well Platten kultiviert bzw. differenziert. Nach erfolgter 2 h Pulsbehandlung mit Doxorubicin wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 48 h kultiviert bzw. differenziert (Abschnitt 2.2.3). Am Tag der Viabilitätsmessung wurde das Kultivierungs- bzw. Differenzierungsmedium entfernt und durch 500 µl gebrauchsfertige Resazurin-Lösung (Resazurin-Lösung in DMEM ohne Phenolrot, 1:10; finale Konzentration: 44 µM) ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 2,5 h (mESC) bis 4 h (hiPSC) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden je 100 µl des Überstandes aus den unterschiedlich behandelten Proben in Quadruplikaten in eine 96-Well Platte überführt. Nur mit der gebrauchsfertigen Resazurin-Lösung befüllte Wells dienten als *Blank*. Zur Analyse wurde die Fluoreszenz mittels des Mikrotiterplatten-Lesegerätes Infinite® F200 gemessen (Exzitation: 535 nm; Emission: 590 nm; 5 Blitze; Integrationszeit: 20 µs) und die Hintergrundfluoreszenz (*Blank*) subtrahiert. Die relative Zellviabilität in unbehandelten Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt.

2.2.8 Analyse der Zellzyklusverteilung

2.2.8.1 Durchflusszytometrie

Da Zellen je nach ihrem Zellzyklusstatus unterschiedliche Mengen an DNA aufweisen, kann ihr relativer DNA-Gehalt durch die Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden, weisen einen einfachen DNA-Gehalt auf, während sich in der G₂/M-Phase befindende Zellen einen doppelten DNA-Gehalt aufweisen. Nicht gut abgrenzbar sind Zellen, die sich in der S-Phase befinden, da sie einen einfachen bis zweifachen DNA-Gehalt besitzen. Apoptotische Zellen haben aufgrund von intrazellulären Degenerationsprozessen einen niedrigeren DNA-Gehalt als Zellen in der

G0/G1-Phase und werden daher als SubG1-Population bezeichnet. Mit Hilfe des DNA-interkalierenden, fluoreszierenden Propidiumiodids (PI) lassen sich die jeweiligen Zellzyklusphasen, die durch unterschiedliche DNA-Mengen der Zelle charakterisiert sind, gut unterscheiden.

Für die Zellzyklusanalyse wurden das Kultivierungsmedium und alle verwendeten Lösungen, die zum Waschen und Ablösen der Zellen benötigt wurden, in einem 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Zellen wurden mit Trypsin vereinzelt, abgelöst und ebenfalls in das Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4 °C, reduzierte Bremse) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und unter Vortexen wurden tropfenweise 2 ml -20 °C kaltes 80 %iges Ethanol zur Fixierung hinzugegeben. Bis zur Messung wurden die Zellsuspensionen bei -20 °C gelagert (mindestens 20 min). Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4 °C, reduzierte Bremse) und das Pellet in RNase-haltigem PBS (132 µl PBS + 1 µl DNase-freie RNase (1 mg/ml)) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PI (367 µl 50 µg/ml PI in PBS) versetzt, resuspendiert und auf Eis im Dunklen für weitere 20 min inkubiert. Die Proben wurden nach erneutem Resuspendieren in dem Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 gemessen (10.000 Events bei langsamer Geschwindigkeit im PE-Kanal) und die Zellzyklusverteilung mit der gleichnamigen Software analysiert. Quantifiziert wurde der prozentuale Anteil der sich in der SubG1-Fraktion befindenden Zellen, der als apoptotische Zellpopulation betrachtet wurde. Die basale Apoptosefrequenz in unbehandelten Kontrollzellen wurde von der Apoptoserate in Doxorubicin-behandelten Zellen subtrahiert, um den prozentualen Anteil der Doxorubicin-induzierten SubG1-Fraktion zu berechnen.

2.2.8.2 EdU-Inkorporations-Assay

Um das Proliferationsverhalten von Zellen zu analysieren, wurde das EdU-Click 488 Kit verwendet. 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) ist ein Nukleosid-Analog zu Thymidin, welches während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert (Yu *et al.*, 2009). In einer Kupfer-katalysierten Reaktion bindet der Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein-Azid (6 FAM-Azid) kovalent unter Ringschluss an die Alkyngruppe von EdU. So kann die Inkorporation von EdU durch Zugabe von 6 FAM-Azid unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Zellen wurden nach Herstellerangaben auf Deckgläsern (Abschnitt 2.2.4) kultiviert bzw. differenziert. Nach einer 3 h EdU Puls-Behandlung (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 4 % Formaldehyd/PBS fixiert (15 min, RT). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 3 % BSA/PBS gewaschen und zur Permeabilisierung 20 min mit PBST inkubiert (RT). Nach erneutem zweimaligen Waschen wurden die Zellen mit dem Reaktionscocktail nach Herstellerangaben für 30 min inkubiert (RT, dunkel). Bevor die Zellen mit DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt wurden, wurden sie dreimal mit PBS gewaschen. Die mikroskopische Analyse zur Quantifizierung der Inkorporation von EdU (Prozentanteil der EdU-positiven Zellen) erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der Software CellSens Dimension.

2.2.9 Proteinbiochemie

2.2.9.1 Proteinisolierung

Für die Gesamt-Proteinisolation wurde den in 6-Well Platten kultivierten bzw. differenzierten Zellen das Medium entfernt, der Zellrasen mit PBS gewaschen und die Platten auf Eis überführt. Zur Lyse wurden 100 µl des frisch angesetzten RIPA-Puffers (Tabelle 2.6) auf den Zellrasen gegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zellschaber abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppi-Gefäß) auf Eis überführt. Die nachfolgende Sonifizierung (Amplitude 30 %, 5 Pulse: je 2 sec Puls und 1 sec Pause) zum Zellaufschluss erfolgte ebenfalls auf Eis.

Durch die wechselnde Druckänderung des eingesetzten Ultraschalls werden die Zellmembranen aufgebrochen. Während der Aufarbeitung verhindert das im RIPA-Puffer enthaltene Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF) den Abbau der Proteine. Natriumdodecylsulfat (SDS, *sodium dodecyl sulfate*) denaturiert die Proteine und überdeckt ihre Eigenladung, während NP-40 die Proteine solubilisiert. Die SDS komplexierten Proteine weisen durch ihre Bindung mit SDS eine negative Ladung auf. Die elektrophoretische Mobilität der Proteine ist somit in der anschließenden Gel-Elektrophorese (Abschnitt 2.2.9.3) von ihrem Molekulargewicht abhängig.

Nach dem Zellaufschluss wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppi-Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.9.2 Proteinbestimmung

Um sicherzugehen, dass gleiche Proteinmengen für die Western Blot Analyse eingesetzt werden, wurde der DC™ Protein Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Jeweils 5 µl einer BSA-Standardreihe, mit 14 unterschiedlichen Konzentrationen, und 5 µl der einzelnen Proben wurden in Triplikaten auf eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden alkalisches Kupfertartrat, eine Tensidlösung und verdünntes Folinreagenz aus dem Kit zu den einzelnen Wells gegeben und die Platte für 15 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Die anschließende Messung erfolgte mit dem Tecan Sunrise und der Software XFluor4. Die Platte wurde zunächst 5 sec im Gerät geschüttelt, bevor die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm erfolgte. Die Messpunkte der mitgeführten BSA Standardreihe wurden zur Erstellung einer linearen Trendlinie verwendet. Durch die daraus resultierende Steigungsformel wurde die Proteinkonzentration der einzelnen Proteinlösungen bestimmt.

Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt wurde, wurden die Proteinlösungen mit den entsprechenden Mengen an RIPA-Puffer und Roti-Load Proteinladepuffer (25 % v/v) versetzt, um eine Proteinkonzentration von 15-30 µg pro 30 µl zu erreichen. Danach wurden die Proteinlösungen herunterzentrifugiert, bevor sie für 10 min bei 95 °C (300 rpm) auf dem Heizblock denaturiert wurden. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.9.3 SDS-Page

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte unter denaturierten Bedingungen mit diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Ornstein, 1964; Laemmli, 1970; Fling and Gregerson, 1986). Die mit SDS komplexierten und damit negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode. Dabei migrieren sie zunächst durch ein Sammelgel, wo sie sich am Übergang zum Trenngel konzentrieren. Bei der weiteren Migration zur Anode durch das Trenngel werden die Proteine durch die Poren des Acrylamidgels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

15 bis 30 µg Protein aus den Zelllysaten wurden mittels 5 %igem Sammel- und 6-12 %igem Trenngel (Tabelle 2.6) separiert. Die Elektrophorese erfolgte mittels Mini-PROTEAN® Tetra Cell Elektrophoresesystem in SDS-Laufpuffer (Tabelle 2.6) bei 10 bis 30 mA pro Gel bis zur gewünschten Auftrennung. Als Größenstandard diente der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (5–10 µl).

2.2.9.4 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch die SDS-Page (Abschnitt 2.2.9.3) wurden diese mittels Mini Trans-Blot Cell® System auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (90 min, 300 mA). Die erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran wurde mittels Ponceau-S Färbung überprüft. Anschließend wurde die Membran mit Aqua bidest. wieder entfärbt und für 5 min in TBST gewaschen. Die nachfolgenden Arbeitsschritte erfolgten alle unter konstantem Schwenken auf einem Schüttler. Zur Blockierung von unspezifischen Antigenbindungsstellen wurde die Membran in 5 %igem Magermilchpulver/TBST für mind. 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 2.14) in TBST, 5 % Magermilchpulver/TBST oder 5 % BSA/TBST über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran mit TBST entfernt. Die Membran wurde mit dem entsprechenden Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper in 5 %igem Magermilchpulver/TBST (Tabelle 2.15) für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Membran mit TBST wurde sie zur Visualisierung der Proteinbanden leicht getrocknet und für eine Minute mit einer luminolhaltigen Chemilumineszenzlösung (*BM Chemiluminescence Blotting Substrate*) inkubiert. Die Lösung wurde abgetupft und die Intensität der Signale mittels des ChemiDox™ Touch Imaging Systems und der Image Lab Software analysiert. Zur Normalisierung wurden Talin-1 und β -Aktin als Referenzproteine verwendet.

2.2.10 Analyse von DNA-Schäden

2.2.10.1 γ H2AX- und 53BP1-Foci

Um die genotoxische Wirkung von Doxorubicin und ionisierender Strahlung zu analysieren, wurde die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs, *double-strand breaks*) mittels immunzytochemischer Färbung quantifiziert. Angefärbt wurden das an Serin 139 phosphorylierte Histon H2AX (γ H2AX) und das P53-bindende Protein1 (53BP1). Die Methode basiert darauf, dass der MRN-Komplex (bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1) DSBs erkennt und daraufhin die Proteinkinasen ATM und ATR, sowie die DNA-PKc rekrutiert werden (Abschnitt 1.4.1). Diese phosphorylieren das dem DSB am nächsten gelegene Histon H2AX (γ H2AX-Focus) an seinem Serin 139. Die so gebildeten nukleären γ H2AX-Foci können durch eine spezifische Antikörperfärbung detektiert und anschließend quantifiziert werden. γ H2AX ist ein akzeptierter und höchst sensitiver Surrogatmarker der

DDR, die durch DSBs ausgelöst wird und indikativ für DNA-Schäden ist (Rogakou *et al.*, 1998; Olive, 2004; Lobrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013). Einen weiteren DNA-Doppelstrangbruchindikator stellen Foci des 53BP1 dar (Schultz *et al.*, 2000; Mochan *et al.*, 2004; Panier and Boulton, 2014). Zusätzlich sind 53BP1-Foci indikativ für die Reparatur von DSBs über die nicht-homologe End-Verknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*). Als Folge eines DSBs wird 53BP1 aus dem Zytoplasma rekrutiert und bindet an das Chromatin in der Nähe des DNA-Schadens (Panier and Boulton, 2014; Zimmermann and de Lange, 2014). Demnach sind sowohl die Anzahl der γ H2AX-Foci als auch die der 53BP1-Foci pro Zellkern proportional zur Anzahl der DSBs.

Zur immunzytochemischen Untersuchung der Foci wurden die Zellen auf Deckgläsern kultiviert bzw. differenziert. Nachdem das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen wurden, erfolgte die Fixierung mit 4 °C kaltem 4 % Formaldehyd/PBS (15 min, RT). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit -20 °C kaltem Methanol für mindestens 20 min permeabilisiert. Nachdem das Methanol durch Abspülen mit PBS entfernt wurde, erfolgte die Blockierung unspezifischer Antigenbindungsstellen mit 5 % BSA/PBST für 1 h bei RT. Die anschließende Inkubation mit den Primärantikörpern γ H2AX und 53BP1 (1:500 in 5 % BSA/PBST) erfolgte bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch Waschen mit PBS (2 x 5 min), PBS mit erhöhtem Salzgehalt (0,4 M NaCl) (2 min) und PBST (5 min) entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 bzw. 555 (1:500 in 5 % BSA/PBST) unter Lichtausschluss für 2 h bei RT in einer Feuchtkammer. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und zweimaligem Abspülen mit PBST wurden die Proben mit DAPI-haltigem Vectashield® eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop Olympus BX43 und der Software CellSens Dimension. Anschließend wurde die Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foci pro Nukleus ermittelt.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde, je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen, mittels zweiseitigen, ungepaarten t-Test nach Student (Student, 1908) oder mittels *One-way Analysis of variance* (ANOVA) mit Tukey's und Dunnett's post-hoc Test überprüft. Als statistisch signifikant wurde eine Zufallswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \leq 0,05$) angenommen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit * versehen. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

Zielsetzung dieser Arbeit war es den Einfluss des Anthrazyklin-Derivates Doxorubicin auf kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse zu untersuchen. Dazu wurden drei verschiedene *in vitro* Differenzierungsmodelle genutzt, um embryonale Stammzellen der Maus (mESC, *mouse embryonic stem cells*) und humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC, *human induced pluripotent stem cells*) in kardiovaskuläre Zelltypen zu differenzieren. Verwendet wurden die murine Stammzelllinie LF2 (Nichols *et al.*, 1990) und die humane induzierte pluripotente Stammzelllinie b4 (Wang and Adjaye, 2011). In Anlehnung an das bereits etablierte Differenzierungsmodell von mESC in Endothel-ähnliche Zellen (EC, *endothelial-like cells*) (Hennicke *et al.*, 2015) wurde der Einfluss einer Doxorubicin-induzierten Schädigung von Progenitorzellen (Vorläuferzellen) auf die Differenzierung zu terminal differenzierten EC untersucht. Weitere Zielsetzungen dieser Arbeit waren die Charakterisierung der Differenzierung von mESC zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (CM, *cardiomyocyte-like cells*) sowie der Differenzierung von hiPSC zu Endothel-ähnlichen Zellen (hEC, *human endothelial-like cells*) im humanen System. Auch in diesen Differenzierungssystemen wurde der Einfluss von Doxorubicin auf undifferenzierte und differenzierte Zellen untersucht.

3.1 Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Die verwendete murine embryonale Stammzelllinie LF2 (Nichols *et al.*, 1990) wurde in Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen ohne Feeder-Zellen kultiviert. Durch die Zugabe des Leukämie-inhibierenden Faktors (LIF, *leukemia inhibitory factor*) in das Kultivierungsmedium, wurde der undifferenzierte Status der Stammzellen aufrechterhalten (Smith *et al.*, 1988). Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen der Stammzelllinie LF2 werden im Folgenden als mESC bezeichnet.

3.1.1 Endothelzellendifferenzierung

Die *in vitro* Differenzierung von mESC in EC basiert auf dem Protokoll von Chiang und Wong (Chiang and Wong, 2011) und wurde bereits auf die hier verwendete Stammzelllinie LF2 angepasst und etabliert (Hennicke *et al.*, 2015). Das Differenzierungsprotokoll ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

Für die Endothelzelldifferenzierung wurden mESC in ein serumfreies Differenzierungsmedium (Präinkubationsmedium) mit einer Zelldichte von $0,2 \times 10^5$ Zellen/6-Well in Fibronectin-beschichtete 6-Well Platten ausgesät. Durch die Entfernung von LIF aus dem Kultivierungsmedium wurde die Differenzierung initiiert. Bei dieser direkten Differenzierung wurden definierte Wachstumsfaktoren und sogenannte niedermolekulare Verbindungen (*small molecules*) nach zwei und vier Tagen beim Mediumwechsel dem Differenzierungsmedium hinzugefügt. Um die Zellen in eine mesodermale Richtung zu lenken, wurden dem Medium an Tag zwei der Differenzierung die Wachstumsfaktoren Activin A, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *bone morphogenic protein 4* (BMP4) und der Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor (GSKi) hinzugefügt. Durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren bFGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *activin receptor-like kinase receptor inhibitor* (ALKi) und Forskolin an Tag vier der Differenzierung wurde das endotheliale Schicksal der Zellen geprägt. EC sind nach sechs Tagen der Differenzierung aus den mESC abgeleitet worden.

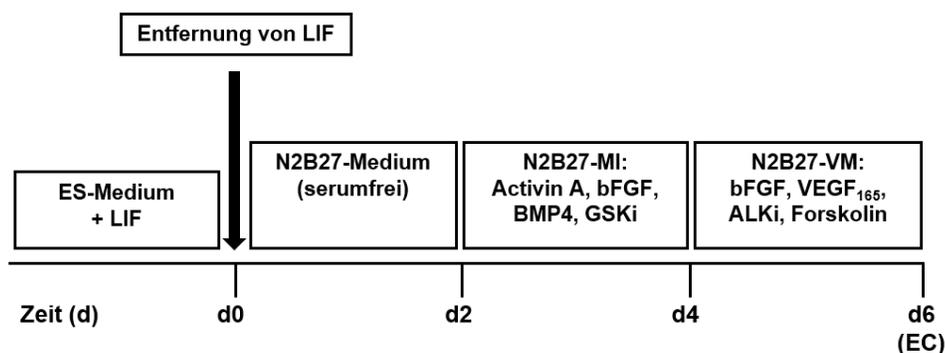


Abbildung 3.1: Protokoll zur Differenzierung von mESC in Endothel-ähnliche Zellen (EC).

Schematische Darstellung des modifizierten Differenzierungsprotokolls nach Chiang und Wong (Chiang and Wong, 2011), angelehnt an Hennicke und Kollegen (Hennicke *et al.*, 2015), zur Differenzierung embryonaler Stammzellen der Maus (mESC) in Endothel-ähnliche Zellen (EC). d: Tag, LIF: *leukemia inhibitory factor*, N2B27-Medium: Präinkubationsmedium, N2B27-MI: Mesoderm-Induktionsmedium, N2B27-VM: Endothelzell-Induktionsmedium, bFGF: *basic fibroblast growth factor*, BMP4: *bone morphogenic protein 4*, GSKi: Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor, VEGF₁₆₅: *vascular endothelial growth factor*, ALKi: *activin receptor-like kinase receptor inhibitor*.

3.1.1.1 Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen

Der Verlauf der Differenzierung von mESC in EC war mit deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Zellen verbunden (Abbildung 3.2 A). An Tag sechs der Differenzierung (d6) zeigten die Zellen eine für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterförmige Morphologie,

welche vergleichbar mit der Morphologie der immortalisierten Maus Endothelzelllinie H5V und der humanen Nabelschnurvenen Endothelzelllinie HUVEC ist (Abbildung 3.2 B).

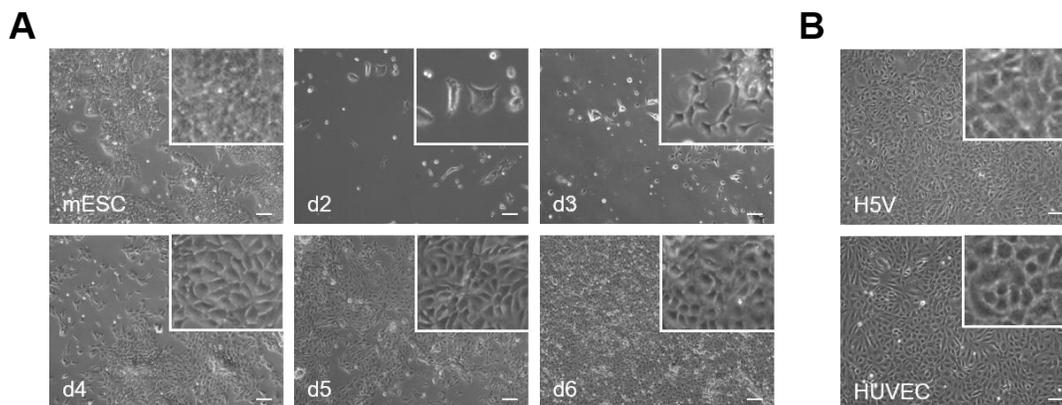


Abbildung 3.2: Morphologische Veränderungen während der Endothelzelldifferenzierung von mESC.

(A) Veränderung der Morphologie im Differenzierungsverlauf von embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) zu Endothel-ähnlichen Zellen (EC). Die Abbildungen zu Tag zwei bis vier (d2–d4) zeigen die Morphologie der Zellen nach der Mesoderm-Induktion, während die Abbildungen zu Tag fünf und sechs (d5, d6) die der Endothelzell-Induktion zeigen. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . (B) Phänotyp von immortalisierten Maus Endothelzellen (Zelllinie H5V) und von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) zum morphologischen Vergleich. 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . d: Tag.

Zur weiteren Charakterisierung der differenzierten EC wurde die Expression von prototypischen Stamm- und Endothelzell-zugehörigen Markern auf mRNA- und Protein-Ebene analysiert. In Genexpressionsanalysen mittels quantitativer *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) Analyse wurden mESC, EC Progenitorzellen an Tag vier der Differenzierung (EC d4) und terminal differenzierte EC an Tag sechs (EC d6) untersucht. Anhand verschiedener Marker wurde der Differenzierungsverlauf der mESC beurteilt.

Es wurde gezeigt, dass die relative mRNA Expression der Stammzellfaktoren Nanog Homöobox (Nanog, *Nanog homeobox*) und Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct4, *octamer binding transcription factor 4*) im Verlauf der Differenzierung bei EC d4 und EC d6 im Vergleich zu mESC herunterreguliert wurde (Abbildung 3.3 A). Dies spricht für einen differenzierten Zustand der Zellen bereits vier Tage nach Induktion des Differenzierungsprozesses. Zudem war die relative mRNA Expression des mesodermalen Progenitorfaktors fetale Leber Kinase 1 (Flk1, *fetal liver kinase 1*) sowohl in EC d4 als auch in terminal differenzierten EC d6 erhöht (Abbildung 3.3 B). Die im Vergleich zu mESC

erhöhte mRNA Expression der Endothelzellmarker vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin, *vascular endothelial cadherin*), *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (Pecam1) und *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1* (Tie1) in terminal differenzierten EC d6, zeigt die erfolgreiche Endothelzelldifferenzierung (Abbildung 3.3 B). Terminal differenzierte EC d6 zeigten im Vergleich zu EC d4 eine signifikant erhöhte Expression an Flk1, VE-Cadherin, Pecam1 und Tie1. EC d4 wiesen für die Gene Pecam1 und Tie1 eine relative mRNA Expression auf, die unterhalb der von mESC lag. Dies deutet darauf hin, dass EC d4 noch mesodermale Zelltypen aufweisen und EC d6 differenzierte EC sind.

Um zu zeigen, dass die aus mESC differenzierten EC auch auf Proteinebene Endothelzell-zugehörige Marker exprimieren, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Die Expression der Marker Flk1, VE-Cadherin und Pecam1 wurde in EC d6 Zellen nachgewiesen (Abbildung 3.3 C).

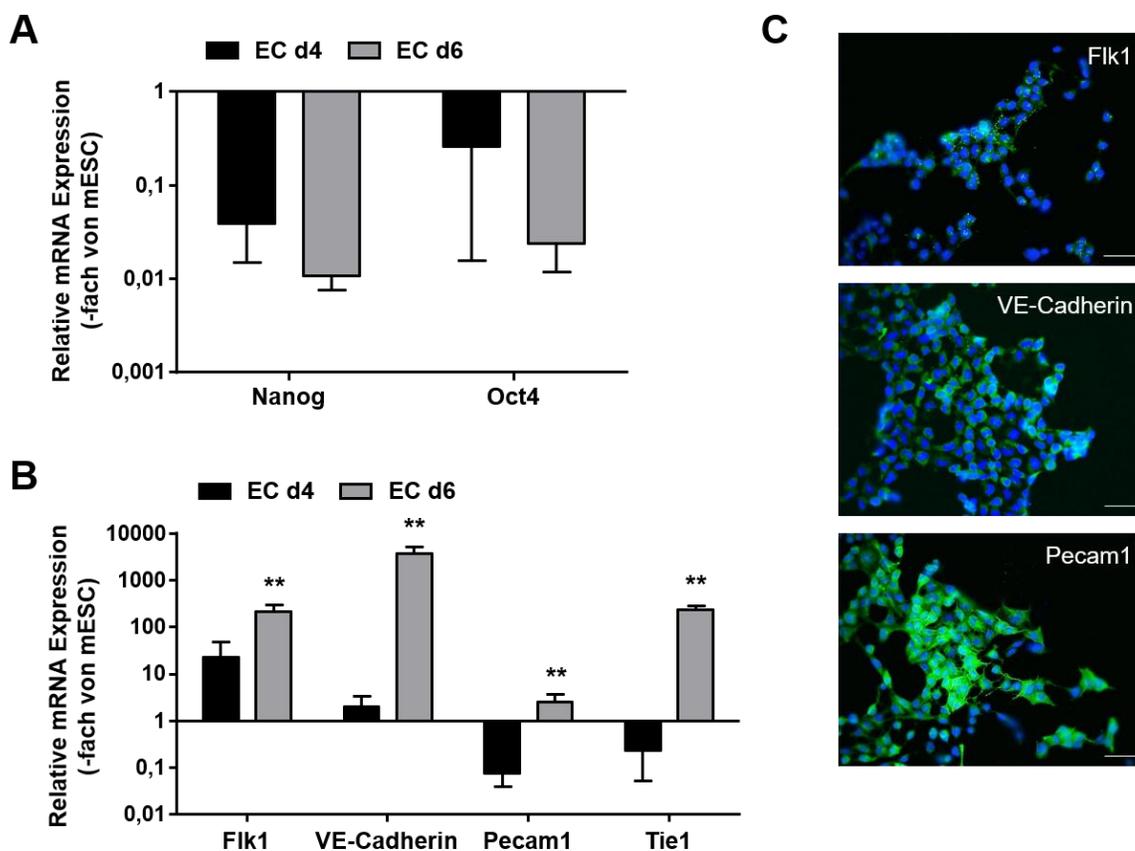


Abbildung 3.3: Charakterisierung der Endothel-ähnlichen Zellen auf mRNA- und Proteinebene.

(A) Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) Analyse der mRNA Expression der Stammzellfaktoren Nanog und Oct4 in undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus (mESC), Endothel-

ähnlichen Progenitorzellen an Tag vier (EC d4) und differenzierten Endothel-ähnlichen Zellen an Tag sechs (EC d6) der Differenzierung. Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). **(B)** qRT-PCR Analyse der mRNA Expression des mesodermalen Progenitorfaktors Flk1, und der Endothelzellmarker VE-Cadherin, Pecam1 sowie Tie1 in EC d4 und EC d6. Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). *One-way ANOVA*, **, $p \leq 0,01$ verglichen zu EC d4. **(C)** Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1, VE-Cadherin und Pecam1 in terminal differenzierten EC d6. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau). FITC (grün) zeigt die Proteinexpression der Endothelzell-zugehörigen Marker auf. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 40 x Vergrößerung. Der Maßstab balken repräsentiert 50 μm . PCR: Polymerasekettenreaktion, d: Tag, Nanog: *Nanog homeobox*, Oct4: *octamer binding transcription factor 4*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, Tie1: *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1*, ANOVA: *Analysis of variance*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

Die Daten der Charakterisierung der terminal differenzierten EC d6 stimmen mit den Beobachtungen von Hennicke und Kollegen überein (Hennicke *et al.*, 2015) und zeigen, dass die Endothelzelldifferenzierung erfolgreich war.

3.1.2 Kardiomyozytendifferenzierung

Die *in vitro* Differenzierung von mESC in CM basiert auf einem modifizierten Protokoll von Yang und Kollegen (Yang *et al.*, 2008) und wurde für die hier verwendeten mESC angepasst (Jahn *et al.*, 2020). Das Differenzierungsprotokoll ist schematisch in Abbildung 3.4 dargestellt. mESC wurden mit einer Zelldichte von $0,15 \times 10^5$ Zellen/6-Well in ein serumfreies Differenzierungsmedium (Präinkubationsmedium) in Fibronectin-beschichtete 6-Well Platten ausgesät. Wie bei der Endothelzelldifferenzierung (Abschnitt 3.1.1) wurde die Differenzierung durch die Entfernung von LIF aus dem Kultivierungsmedium initiiert und durch die Zugabe definierter Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Verbindungen in die kardiale Richtung gelenkt. Zunächst wurde das mesodermale Schicksal der Zellen durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren Activin A, bFGF, BMP4 und GSKi zum Differenzierungsmedium an Tag zwei geprägt. An Tag vier wurde zu dem Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1 mit den Wachstumsfaktoren VEGF und *wingless inhibitor* (WNT-C59) gewechselt. Weitere Mediumwechsel mit dem Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2 erfolgten an Tag sechs, acht und elf der Differenzierung. Dabei wurde VEGF als einziger Wachstumsfaktor hinzugegeben. Durch mikroskopisch nachweisbare pulsierende Zellbereiche ab Tag acht (d8) der Differenzierung war erkennbar, dass CM aus mESC abgeleitet wurden.

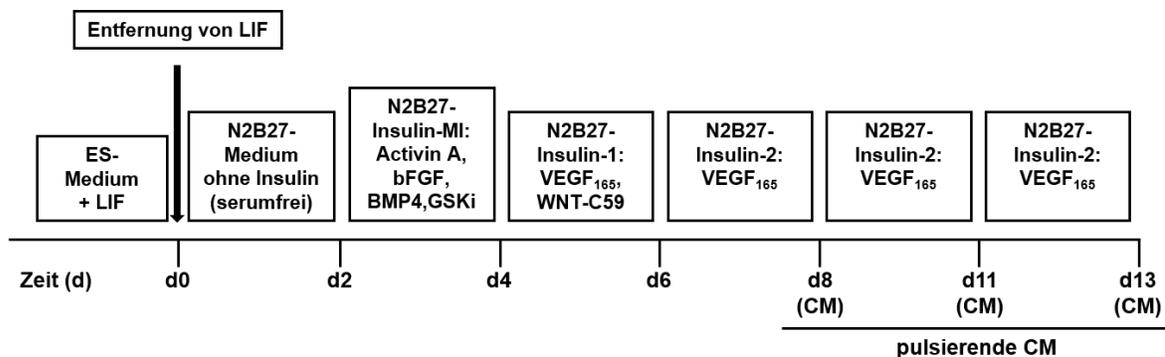


Abbildung 3.4: Protokoll zur Differenzierung von mESC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM).

Schematische Darstellung des modifizierten Differenzierungsprotokolls nach Yang und Kollegen (Yang *et al.*, 2008), um embryonale Stammzellen der Maus (mESC) in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM) zu differenzieren. d: Tag, LIF: *leukemia inhibitory factor*, N2B27-Medium ohne Insulin: Präinkubationsmedium, N2B27-Insulin-MI: Mesoderm-Induktionsmedium, N2B27-Insulin-1: Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1, N2B27-Insulin-2: Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2, bFGF: *basic fibroblast growth factor*, BMP4: *bone morphogenic protein 4*, GSKi: Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor, VEGF₁₆₅: *vascular endothelial growth factor*, WNT-C59: *wingless inhibitor*.

3.1.2.1 Charakterisierung der differenzierten Kardiomyozyten

Die Morphologie der aus mESC differenzierten CM veränderte sich im Laufe der Differenzierung deutlich (Abbildung 3.5 A). So sahen die sich differenzierenden CM an Tag sechs (d6) der Differenzierung mit ihrer kopfsteinpflaster-ähnlichen Morphologie den in Abschnitt 3.1.1.1 beschriebenen differenzierten EC d6 (Abbildung 3.2 A) sehr ähnlich. An Tag acht (d8) der Differenzierung waren erste kleine pulsierende Zellbereiche (weiß eingekreist) zu sehen. An den weiteren Tagen der Differenzierung hat sowohl die Anzahl als auch die Größe der pulsierenden Zellbereiche zugenommen. Zum Vergleich der aus mESC differenzierten Kardiomyozyten wurde die arterielle Kardiomyozyten-Tumorzelllinie HL-1 hinzugezogen (Abbildung 3.5 B). HL-1 Zellen wiesen pulsierende Zellbereiche in Monoschichten auf, während die hier differenzierten CM überwiegend pulsierende Zellbereiche bei übereinander wachsenden Zellen aufwiesen.

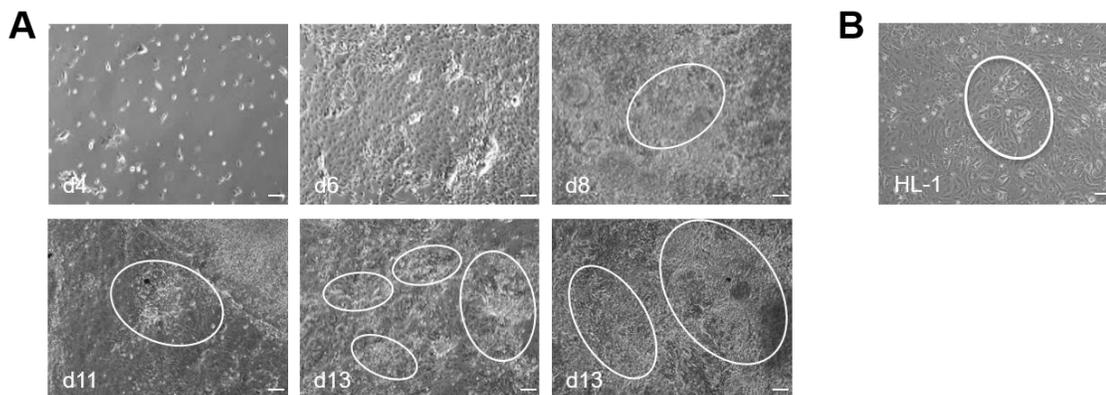


Abbildung 3.5: Morphologische Veränderungen während der Kardiomyozytendifferenzierung von mESC.

(A) Veränderung der Morphologie im Differenzierungsverlauf von embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (CM). Die Abbildung zu Tag vier (d4) zeigt die Morphologie der Zellen nach der Mesoderm-Induktion, während die Abbildungen zu den darauffolgenden Tagen die der Kardiomyozyten-Induktion zeigen. Die weiß eingekreisten Zellbereiche markieren pulsierende Zellareale. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . **(B)** Phänotyp einer arteriellen Kardiomyozyten-Tumorzelllinie (HL-1) zum morphologischen Vergleich. Der weiß eingekreiste Zellbereich markiert ein pulsierendes Zellareal. 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . d: Tag.

Zur weiteren Charakterisierung der aus mESC differenzierten CM wurden Stammzell- und Kardiomyozyten-zugehörige Marker im Differenzierungsverlauf in Genexpressionsanalysen untersucht. Dabei wurden mESC, Progenitor CM (CM d7), die noch nicht pulsierten sowie pulsierende und terminal differenzierte CM (CM d8-10, d12, d13) analysiert. Zusätzlich wurde zu Kontrollzwecken die mRNA aus einem Stück Mäuseherzgewebe mitgeführt.

Die relative mRNA Expression des Stammzellfaktors Nanog war, verglichen zu mESC, in allen untersuchten aus mESC differenzierten CM und der Mäuseherzkontrolle deutlich herunterreguliert (Abbildung 3.6 A). Flk1, als mesodermaler Progenitorfaktor, war im Differenzierungsverlauf nahezu gleichbleibend erhöht exprimiert. Die Expression der Kardiomyozytenmarker ist dagegen mit fortschreitender Differenzierung stärker geworden. Die Kardiomyozytenmarker der leichten Kette Myosin 2 (*Myl2*, *myosin light chain 2*), der schweren Kette Myosin 6 (*Myh6*, *myosin heavy chain 6*), des kardialen Troponin T2 (*Tnnt2*, *troponin T2, cardiac*) und von NK2 Homöobox 5 (*Nkx2-5*, *NK2 homeobox 5*) wurden im Vergleich zu mESC auf mRNA-Ebene sehr deutlich hochreguliert. Eine Ausnahme bildete der Kardiomyozytenmarker Aktinin alpha 1 (*Actn1*, *actinin alpha 1*), dessen mRNA Expression herunterreguliert wurde, ähnlich der Mäuseherzkontrolle. Auch die relative mRNA Expression der Kardiomyozyten-zugehörigen Calciumkanalmarker, nämlich des

spannungs-abhängigen Calciumkanals Typ P/Q der alpha 1A Untereinheit (*Cacna1 α* , *calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit*) und des Ryanodinrezeptors 2 (*Ryr2*, *ryanodine receptor 2*), war bereits in CM d7 hochreguliert und nahm mit Fortschreiten des Differenzierungsprozesses weiter zu (Abbildung 3.6 B).

Durch immunzytochemische Analysen wurde zudem die Proteinexpression des kardialen Troponin I in terminal differenzierten CM d13 nachgewiesen (Abbildung 3.6 C). mESC zeigten dagegen wie erwartet keine Expression des kardialen Troponin I Proteins.

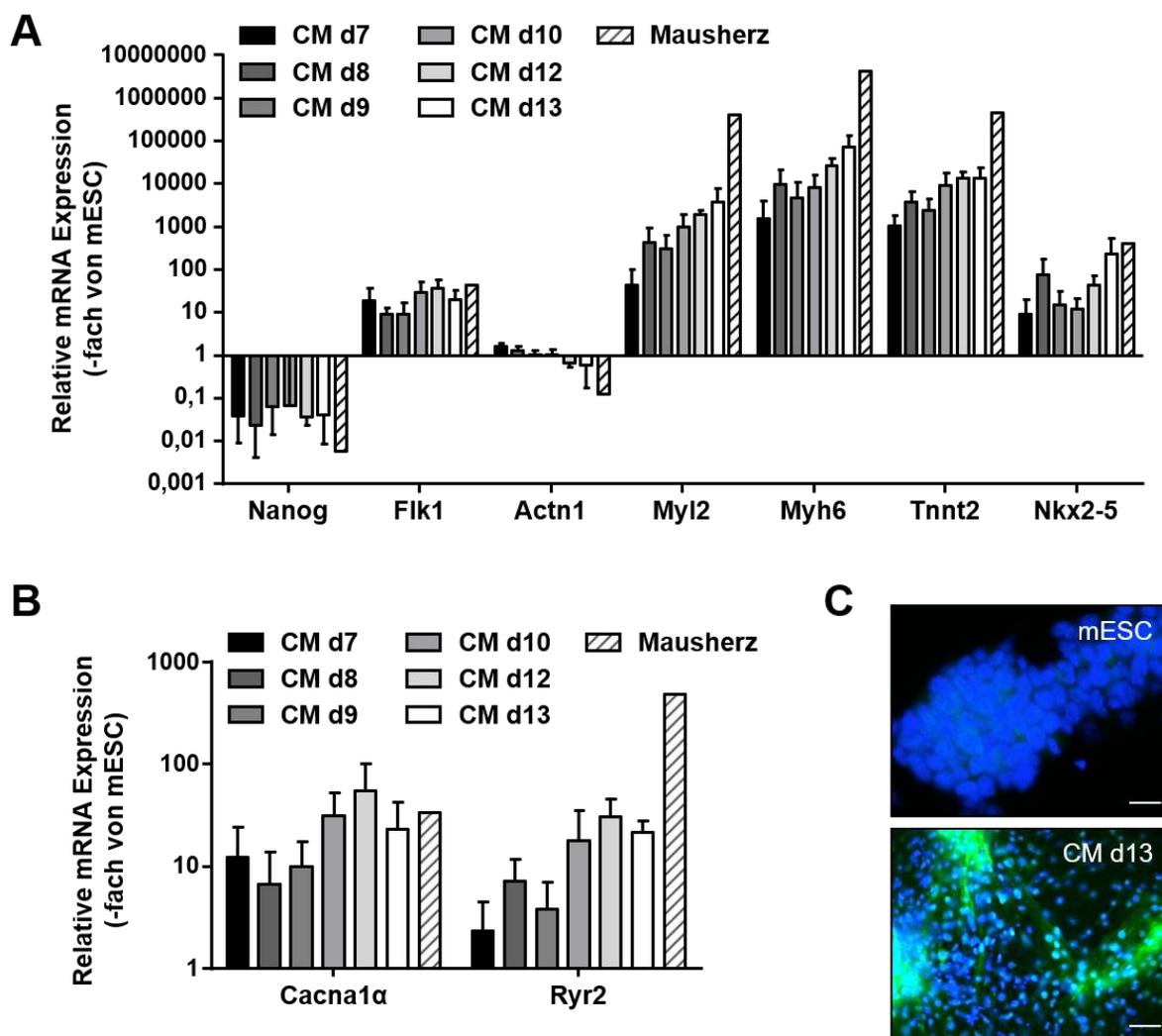


Abbildung 3.6: Charakterisierung der differenzierten Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (CM) auf mRNA- und Protein-Ebene.

(A) Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) Analyse der mRNA Expression von Stammzellfaktor (Nanog), mesodermalem Progenitorfaktor (Fik1) und verschiedenen Kardiomyozytenmarkern (Actn1, Myl2, Myh6, Tnnt2, Nkx2-5) in undifferenzierten embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) und Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen (CM) an unterschiedlichen Tagen der Differenzierung. Als Kontrolle wurde die isolierte mRNA von einem Stück Mäuseherzgewebe mitgeführt (n = 1). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind

Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). **(B)** qRT-PCR Analyse der mRNA Expression von Kardiomyozyten-zugehörigen Calciumkanalmarkern (*Cacna1 α* , *Ryr2*) in mESC und differenzierenden CM. Als Kontrolle wurde die isolierte mRNA von einem Stück Mäuseherzgewebe mitgeführt ($n = 1$). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). **(C)** Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression des Kardiomyozytenmarkers kardiales Troponin I in mESC und terminal differenzierten CM d13. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Farbe). FITC (grüne Farbe) zeigt die Proteinexpression von Troponin I auf. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 40 x Vergrößerung. Der Maßstababalken repräsentiert 50 μm . PCR: Polymerasekettenreaktion, d: Tag, *Nanog*: *Nanog homeobox*, *Fik1*: *fetal liver kinase 1*, *Actn1*: *actinin alpha 1*, *Myl2*: *myosin light chain 2*, *Myh6*: *myosin heavy chain 6*, *Tnnt2*: *cardiac troponin T2*, *Nkx2-5*: *NK2 homeobox 5*, *Cacna1 α* : *calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit*, *Ryr2*: *ryanodine receptor 2*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluorescein-isothiocyanat.

Die Daten der CM Charakterisierung zeigen, dass mit dem verwendeten Differenzierungsprotokoll kontraktile CM aus mESC abgeleitet wurden.

3.1.3 Genexpressionsvergleich basaler differenziell exprimierter Suszeptibilitätsfaktoren in kardiovaskulären Zelltypen

In den vorangegangenen Abschnitten konnte nachgewiesen werden, dass sich mit den hier beschriebenen Differenzierungsprotokollen sowohl EC als auch pulsierende CM aus mESC ableiten lassen. Die beiden differenzierten kardiovaskulären Zelltypen, die den gleichen genetischen Hintergrund haben, wurden im Folgenden auf ihre basalen Genexpressionsmuster von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren untersucht. Diese Suszeptibilitätsfaktoren sind in Stress-induzierbaren Signalwegen, dem Zelltod, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur beteiligt. Hierzu wurde ein in Zusammenarbeit mit der Firma Sigma-Aldrich erstellter, auf 96-Well basierender, *real-time* PCR-Array verwendet (Fritz *et al.*, 2011). Es wurden ausschließlich Gene dargestellt, welche die Qualitätskriterien erfüllt haben (siehe Abschnitt 2.2.6.4). Des Weiteren wurden für die kommenden Darstellungen nur signifikante Unterschiede, die als biologisch relevant angesehen werden (mRNA Expression $\geq 2,0$ oder $\leq 0,5$ verglichen zu mESC), gezeigt. Zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen konnten differenzierungsbedingte Unterschiede in der mRNA Expression einiger Gene beobachtet werden. So waren nach der Endothelzell- und der Kardiomyozytendifferenzierung 12 Gene in beiden Zelltypen im Vergleich zu undifferenzierten mESC hochreguliert und ein Gen herunterreguliert (Abbildung 3.7 A und B). Zusätzlich exprimierten EC spezifisch 6 Gene hoch und 9 herunter.

CM hingegen zeigten zusätzlich eine spezifisch hochregulierte mRNA Expression von 19 Genen und eine reduzierte mRNA Expression von 2 Genen (Abbildung 3.7 A und B).

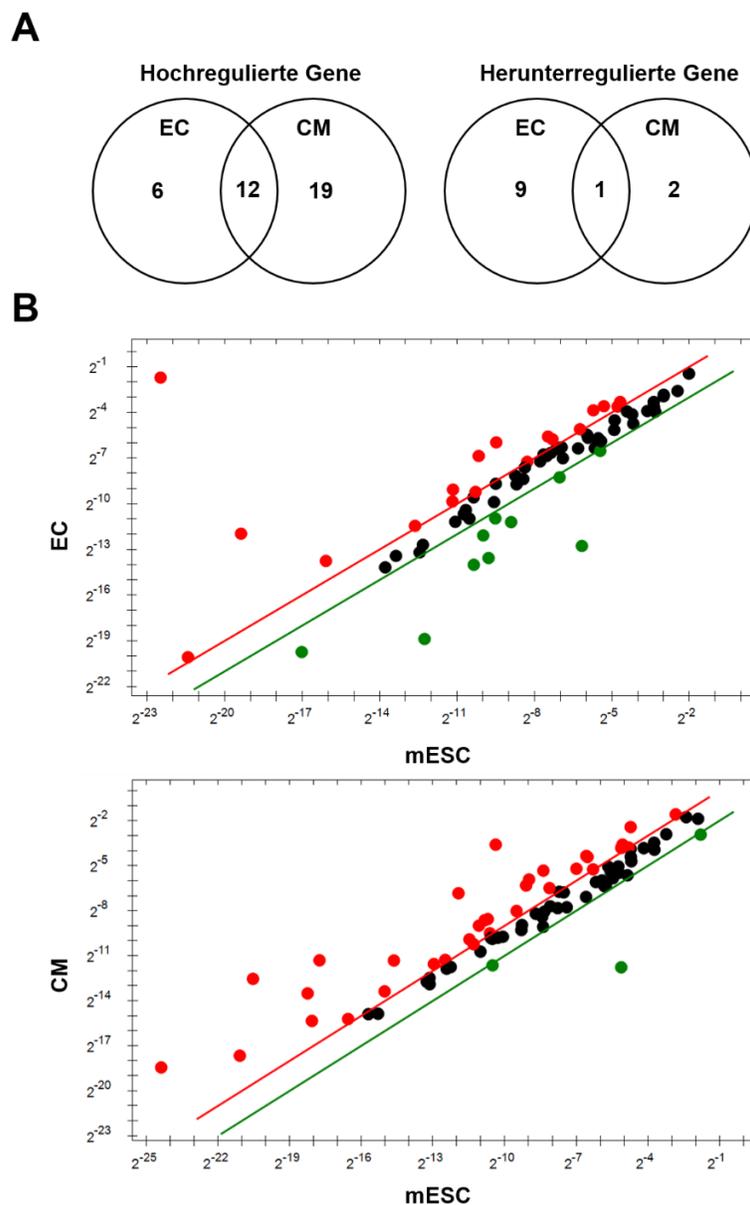


Abbildung 3.7: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.

Analyse basaler Unterschiede in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktorgenen, die in Stress-induzierbaren Signalwegen, dem Zelltod, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur beteiligt sind, zwischen EC, CM und mESC. Die Genexpression auf mRNA-Ebene wurde mittels eines auf 96-Well basierenden *real-time* PCR-Arrays (Fritz *et al.*, 2011) analysiert. Die relative mRNA Expression von undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind die (Mittel-) Werte von ein bis vier unabhängigen Experimenten (EC: $n = 1-4$, CM: $n = 1-4$). Als biologisch relevante mRNA Expressionsänderung wurden Werte von $\geq 2,0$ und $\leq 0,5$ im Vergleich zu mESC betrachtet. **(A)** Das Venn Diagramm zeigt die Anzahl der differenziell hoch- bzw. herunterregulierten Gene in EC und CM zusammen oder alleine

im Vergleich zu undifferenzierten mESC. **(B)** Streudiagramm der basalen Unterschiede zwischen EC und mESC, sowie zwischen CM und mESC. mRNA Expressionsänderungen von $\geq 2,0$ (rote Punkte) und $\leq 0,5$ (grüne Punkte) von Genen sind hervorgehoben. Die schwarzen Punkte stehen für Gene, die keine biologisch relevante Expressionsänderung aufweisen. EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, mESC: embryonale Stammzellen der Maus, PCR: Polymerasekettenreaktion.

Die differentiell exprimierten Gene sind namentlich in der nachfolgenden Tabelle 3.1 aufgelistet.

Tabelle 3.1: Differenzierungsabhängige Änderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.

In der Tabelle sind die basalen, im Vergleich zu mESC differentiell exprimierten Gene der EC und CM aus Abbildung 3.7 dargestellt. Es wurden nur signifikante Unterschiede, die als biologisch relevant angesehen werden (mRNA Expression $\geq 2,0$ oder $\leq 0,5$ verglichen zu mESC), aufgelistet. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. #: Cq > 35 Zyklen, *: Cq > 35 Zyklen in undifferenzierten mESC. EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, mESC: embryonale Stammzellen der Maus.

Hochregulierte Gene			Herunterregulierte Gene		
EC + CM	EC	CM	EC + CM	EC	CM
Akt1	Ccnb1 *	Apex1	Ccna1	Ccne1	Nox1
Bcl2	Cyp1a1 *	ATM		Chk2	Sod1
C-Jun	Ddit3	Becn1		Fos	
Cxcr4	Hmox1	Casp2		Gstm1	
Hif1a	Hus1	Cdkn1a		Hspa1b	
Itgb1	Nos3 *	Cdkn1b		Icam-1	
Pten		C-IAP1		Rad51	
Rac1		Fas-L		Trp63 #	
Rev1		Fas-R		Wrnip1	
Tiam1		Fos			
Topo II b		Hspa1b			
Xrcc4		Lamp1			
		Lig4			
		Sele			
		Timp2			
		Trex			
		Vcam-1			
		Wrn *			
		Xrcc3			

Mit Hilfe der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Analyse konnten die differenziell exprimierten Gene biologischen Signalwegen, den sogenannten *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Pathways, zugeordnet werden (Tabelle 3.2). Unter den 12 gemeinsam hochregulierten Genen (Abbildung 3.7, Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2) befanden sich unter anderem die Gene *Thymoma viral proto-oncogene 1* (Akt1) und *B-Zell Lymphom 2* (Bcl2), welche eine Rolle in der Apoptose spielen. Weiterhin ist *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4* (Xrcc4) bei der DNA-Reparatur über die nicht-homologe End-Verknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*) beteiligt. Ebenfalls hochreguliert waren die Gene *RAS-related C3 botulinum substrate 1* (Rac1), *T-cell lymphoma invasion and metastasis 1* (Tiam1), Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor 4 (Cxcr4) und Akt1 die im Chemokin Signalweg beteiligt sind. Rac1 und Tiam1 wurden auch dem Signalweg der Regulierung des Aktin-Zytoskeletts mit Integrin beta 1 (Itgb1) zugeschrieben, welcher ebenfalls hochreguliert wurde. Zusätzlich gehören Rac1, Itgb1 und Cxcr4 dem Signalweg der transendothelialen Migration von Leukozyten an. Das einzig gemeinsame herunterregulierte Gen von EC und CM im Vergleich zu mESC war CyclinA1 (Ccna1), welches eine Rolle im Zellzyklus spielt.

Tabelle 3.2: Zuordnung der in beiden Differenzierungen (EC + CM) einheitlich hoch- und herunterregulierten Gene zu Signalwegen.

Die in ihrer mRNA Expression signifikant hoch- und herunterregulierten Gene wurden nach der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Analyse biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, mESC: embryonale Stammzellen der Maus.

	KEGG Pathway	Zugeordnete Gene
EC + CM ↑ (mESC ↓)	<i>Pathway in cancer</i>	Akt1, Bcl2, C-Jun, Cxcr4, Hif1a, Itgb1, Pten, Rac1
	<i>Chemokine signaling pathway</i>	Rac1, Tiam1, Cxcr4, Akt1
	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	Rac1, Tiam1, Itgb1
	<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	Rac1, Itgb1, Cxcr4
	<i>Apoptosis</i>	Akt1, Bcl2
	<i>Non-homologous end-joining</i>	Xrcc4
EC + CM ↓ (mESC ↑)	<i>Cell cycle</i>	Ccna1

Nicht nur diejenigen Gene, welche nach einer kardiovaskulären Differenzierung, sowohl in EC als auch in CM, im Vergleich zu undifferenzierten mESC verändert exprimiert waren sind relevant. Expressionsunterschiede zwischen den beiden differenzierten kardiovaskulären Zelltypen sind ebenfalls von Interesse. Unter den spezifisch nach der Endothelzelldifferenzierung hochregulierten Genen befanden sich *Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1* (Cyp1a1), *heme oxygenase (decycling) 1* (Hmox1) und Stickstoffmonoxid-Synthase 3 (Nos3), welche zu metabolischen Signalwegen gehören (Abbildung 3.7, Tabelle 3.1 und Tabelle 3.3). Cyclin B1 (Ccnb1) spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, bei der Mitose. Das DNA-Schaden induzierbare Transkript 3 (Ddit3) ist am Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg beteiligt. Nach einer erfolgreichen Kardiomyozytendifferenzierung wurden die bei der Apoptose beteiligten Gene Fas-Ligand (Fas-L), Fas-Rezeptor (Fas-R), Serin/Threonin-Kinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *Baculoviral IAP repeat-containing 3* (C-IAP1) stärker exprimiert. Auch Gene, die für Faktoren der DNA-Reparatur kodieren, wurden im Vergleich zu undifferenzierten mESC hochreguliert. So wurde als Vertreter der Basenexzisionsreparatur (BER, *base excision repair*) die *apurinic/apyrimidinic endonuclease 1* (Apex1), *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3* (Xrcc3) als Vertreter der homologen Rekombination (HR, *homologous recombination*) und die DNA-Ligase IX (Lig4) der NHEJ verstärkt exprimiert. Auch die Expression des Gens Beclin 1 (Becn1), welches eine Rolle in der Regulation der Autophagie spielt, wurde hochreguliert. Ebenso wurden Gene, die am Zellzyklus (ATM, Cyclin-abhängiger Proteinkinaseinhibitor 1A (Cdkn1a) und Cyclin-abhängiger Proteinkinase-inhibitor 1B (Cdkn1b)) sowie am MAPK Signalweg (*FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog* (Fos), Fas-L, Fas-R und Hitzeschockprotein 1B (Hspa1b)) beteiligt sind hochreguliert. Gleiches gilt für die Zelladhäsionsmoleküle endotheliales Selektin (Sele) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (Vcam-1, *vascular cell adhesion molecule 1*).

Tabelle 3.3: Zuordnung der lediglich in EC oder CM hochregulierten Gene zu Signalwegen.

Die in ihrer mRNA Expression signifikant hochregulierten Gene wurden nach der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Analyse biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, mESC: embryonale Stammzellen der Maus.

	KEGG Pathway	Zugeordnete Gene
EC ↑ (mESC ↓)	<i>Metabolic pathway</i>	Cyp1a1, Hmox1, Nos3
	<i>Cell cycle</i>	Ccnb1
	<i>MAPK signaling pathway</i>	Ddit3
CM ↑ (mESC ↓)	<i>Apoptosis</i>	Fas-L, Fas-R, ATM, C-IAP1
	<i>Cell cycle</i>	ATM, Cdkn1a, Cdkn1b
	<i>Cell adhesion molecules</i>	Sele, Vcam-1
	<i>MAPK signaling pathway</i>	Fos, Fas-L, Fas-R, Hspa1b
	<i>Base excision repair</i>	Apex1
	<i>Homologous recombination</i>	Xrcc3
	<i>Non-homologous end-joining</i>	Lig4
	<i>Regulation of autophagy</i>	Becn1
<i>Pathway in cancer</i>	Fos, Fas-L, Fas-R, C-IAP1, Cdkn1a, Cdkn1b	

Nach der Endothelzellendifferenzierung waren die Gene CyclinE1 (Ccne1) und Checkpointkinase 2 (Chk2), welche sowohl dem Zellzyklus als auch dem p53 Signalweg zugeordnet werden, im Vergleich zu undifferenzierten mESC herunterreguliert (Abbildung 3.7, Tabelle 3.1 und Tabelle 3.4). Die Gene Fos und interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 (Icam-1), die dem Tumornekrosefaktor (TNF) Signalweg angehören, wurden ebenfalls verringert exprimiert. Während die dem MAKP Signalweg zugeordneten Gene Hspa1b und Fos in differenzierten CM hochreguliert wurden, wurden sie in differenzierten EC im Vergleich zu undifferenzierten mESC herunterreguliert. Auch RAD51 Homolog (Rad51), als zentrales Gen der DNA-Reparatur durch Homologe Rekombination (HR), sowie zusammen mit Ccne1 und Fos zugehörig zu verschiedenen Signalwegen in Krebserkrankungen, wurde ebenfalls verringert exprimiert. Nach der Kardiomyozytendifferenzierung waren jedoch nur das Osteoklastdifferenzierungs-zugehörige Gen Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase 1 (Nox1) und die Peroxisomen-zugehörige Superoxid-Dismutase 1 (Sod1) herunterreguliert.

Tabelle 3.4: Zuordnung der lediglich in EC oder CM herunterregulierten Gene zu Signalwegen.

Die in ihrer mRNA Expression signifikant herunterregulierten Gene wurden nach der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Analyse biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, mESC: embryonale Stammzellen der Maus.

	KEGG Pathway	Zugeordnete Gene
EC ↓ (mESC ↑)	<i>Cell cycle</i>	Ccne1, Chk2
	<i>P53 signaling pathway</i>	Ccne1, Chk2
	<i>Pathway in cancer</i>	Ccne1, Fos, Rad51
	<i>TNF signaling pathway</i>	Fos, Icam-1
	<i>Homologous recombination</i>	Rad51
	<i>Glutathione metabolism</i>	Gstm1
	<i>MAPK signaling pathway</i>	Hspa1b, Fos
CM ↓ (mESC ↑)	<i>Osteoclast differentiation</i>	Nox1
	<i>Peroxisome</i>	Sod1

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hohe Anzahl an differenziell exprimierten Suszeptibilitätsfaktoren auf Unterschiede in Stress-induzierbaren Signalwegen, in der Zelltodregulation, der Zellzykluskontrolle sowie der Art und Weise der Reparatur von DNA-Schäden in den untersuchten Modellsystemen EC, CM und mESC hindeuten. Die beobachteten Effekte weisen nicht nur auf Unterschiede zwischen undifferenzierten und differenzierten Zellen hin, sondern auch zwischen den beiden differenzierten kardiovaskulären Zelltypen EC und CM.

3.2 Einfluss von Doxorubicin auf mESC und aus mESC differenzierte kardiovaskuläre Zellen

Das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin wird zur Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen, wie beispielsweise soliden Tumoren, zu denen u.a. Mammakarzinome sowie Weichteilsarkome gehören, und bei Leukämien eingesetzt (Wang *et al.*, 1971; Blum and Carter, 1974). Eine irreversible und Dosis-abhängige Typ I Kardiotoxizität ist eine der gravierendsten und oft lebensbedrohlichen Nebenwirkungen von Anthrazyklinen (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014). Die genauen molekularen Mechanismen, die der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität zu Grunde liegen, sind noch weitgehend unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten und Endothelzellen die

Reaktion des Herzens auf Anthrazykline beeinflussen (Wolf and Baynes, 2006; Wilkinson *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2016; Gambardella *et al.*, 2017).

Nachdem die erfolgreiche Differenzierung von mESC in EC (Abschnitt 3.1.1) und CM (Abschnitt 3.1.2) gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss von Doxorubicin auf kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse untersucht. Dazu wurden mESC, sich differenzierende Progenitorzellen und terminal differenzierte EC, sowie CM durch eine zwei Stunden Pulsbehandlung (Abschnitt 2.2.3) mit Doxorubicin geschädigt. Diese Behandlungsbedingung wurde gewählt, da Doxorubicin in der Klinik zur Krebstherapie als schnelle Infusion verabreicht wird (Gewirtz, 1999). Dabei wird von initialen Plasmakonzentrationen von 0,3–5 μM Doxorubicin berichtet, welche innerhalb einer Stunde auf 25–250 nM absinken (Gewirtz, 1999). Aus diesem Grund wurden für die folgenden Versuche Doxorubicin-Konzentrationen von bis zu 0,5 μM gewählt, um die klinische Situation zu berücksichtigen.

In Abbildung 3.8 sind die Behandlungs- und Analysezeitpunkte der aus mESC differenzierten EC und CM dargestellt. Vier Tage nach Beginn der Differenzierung wurden Progenitor EC (EC d4) mit Doxorubicin pulsbehandelt und 48 h später an Tag sechs analysiert (Abbildung 3.8 A). Zu Kontrollzwecken wurden mESC 24 h nach der Aussaat und terminal differenzierte EC an Tag sechs (EC d6) behandelt. Progenitor CM wurden an Tag sechs der Differenzierung (CM d6) einer 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung unterzogen (Abbildung 3.8 B). Zur vergleichenden Analyse wurden mESC 24 h nach Aussaat sowie differenzierte CM an Tag acht (CM d8) und Tag elf (CM d11) behandelt. Alle Zellen wurden nach einer Postinkubationsphase von 48 h analysiert. Nach diesem Behandlungsschema (2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung, 48 h später die Analyse) wurde die Suszeptibilität von kardiovaskulären Progenitorzellen mit mESC und differenzierten EC bzw. CM vergleichend untersucht.

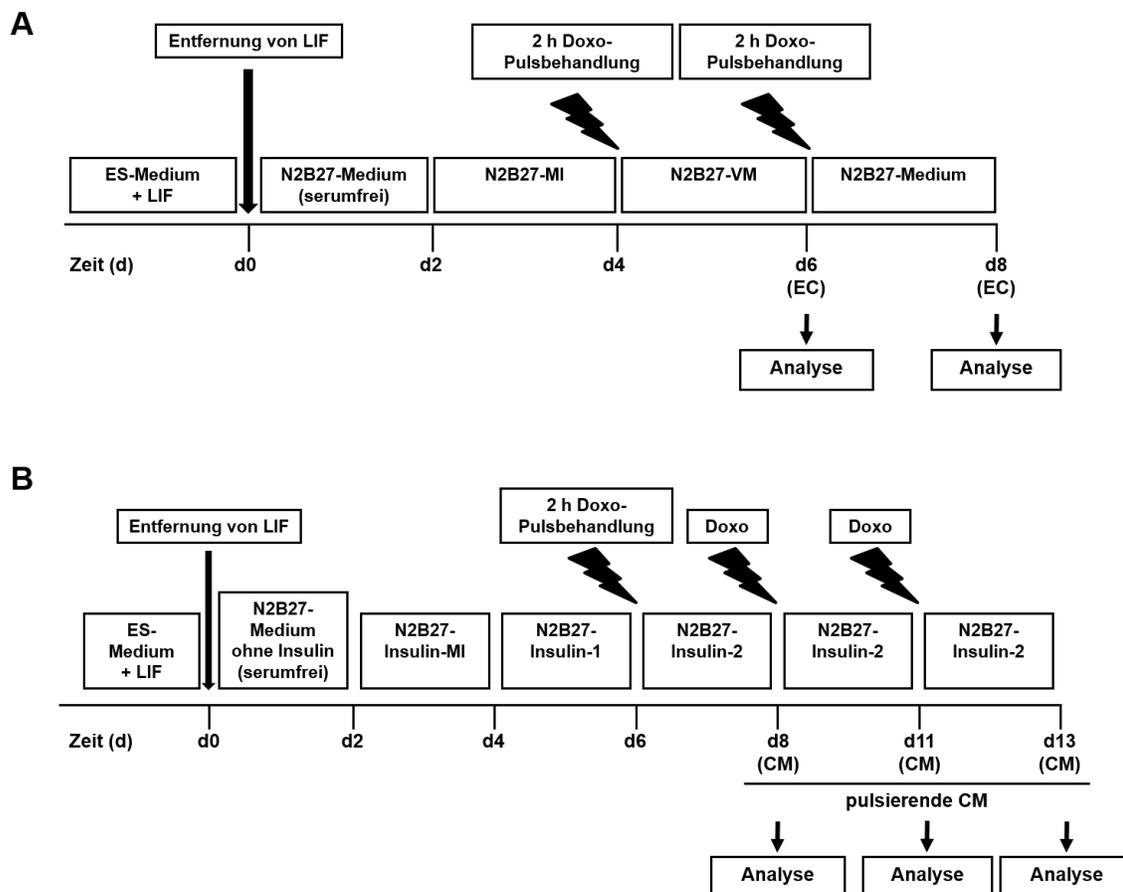


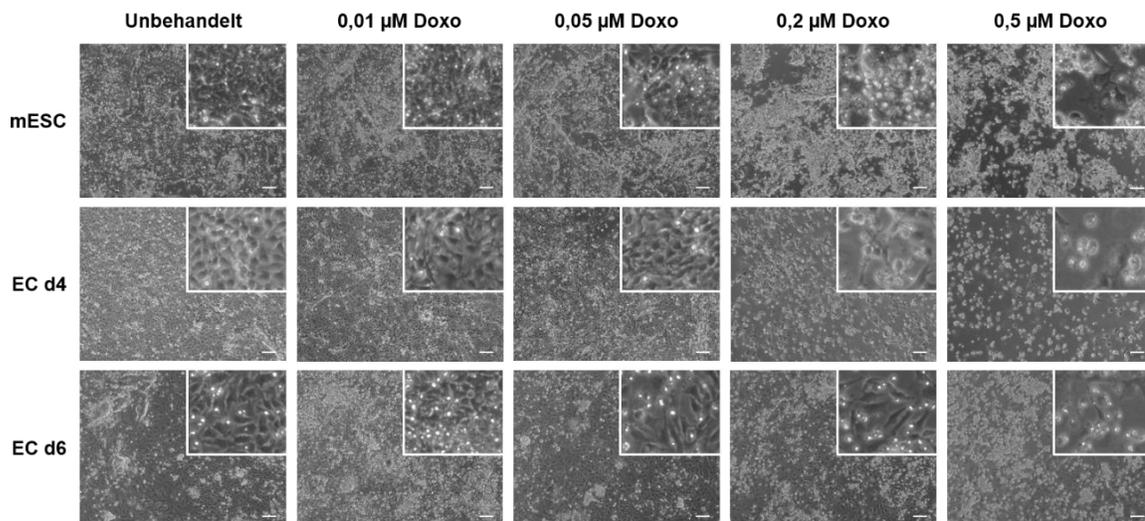
Abbildung 3.8: Behandlungs- und Analysezeitpunkte während den kardiovaskulären Differenzierungen.

Der Einfluss von Doxorubicin (Doxo) auf den Differenzierungsprozess von kardiovaskulären Zellen wurde jeweils 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxo analysiert. **(A)** Schematische Darstellung des verwendeten Differenzierungsprotokolls von murinen embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) in Endothel-ähnliche Zellen (EC) und die Zeitpunkte der 2 h Pulsbehandlung mit Doxo sowie die der Analyse. Vier (d4) und sechs Tage (d6) nach Beginn der Differenzierung wurden die Zellen mit Doxo behandelt. **(B)** Schematische Darstellung des genutzten Differenzierungsprotokolls von mESC in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM) sowie die Zeitpunkte der 2 h Doxo-Pulsbehandlung und die Analysezeitpunkte. Sechs (d6), acht (d8) und elf Tage (d11) nach Beginn der Differenzierung wurden die Zellen mit Doxo behandelt. d: Tag, LIF: *leukemia inhibitory factor*, N2B27-Medium: Präinkubationsmedium EC Differenzierung, N2B27-MI: Mesoderm-Induktionsmedium EC Differenzierung, N2B27-VM: Endothelzell-Induktionsmedium, N2B27-Medium ohne Insulin: Präinkubationsmedium CM Differenzierung, N2B27-Insulin-MI: Mesoderm-Induktionsmedium CM Differenzierung, N2B27-Insulin-1: Kardiomyozyten-Induktionsmedium 1, N2B27-Insulin-2: Kardiomyozyten-Induktionsmedium 2.

Bereits bei der makroskopischen Betrachtung der Zellen 48 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung fiel auf, dass sich mit steigender Doxorubicin-Konzentration mehr Zellen abgelöst hatten und sich im Medium (Überstand) befanden (Abbildung 3.9). Geringe Konzentrationen von 0,01 μM und 0,05 μM Doxorubicin zeigten keine Veränderung in der Morphologie der mESC, sowie der Endothelzell-typischen kopfsteinpflasterförmigen

Morphologie der EC d4 und EC d6. Während mESC erst nach einer Pulsbehandlung mit 0,5 μM Doxorubicin eine veränderte, flachere und größere Morphologie der Zellen aufwiesen, war dies bei den differenzierten EC bereits ab 0,2 μM Doxorubicin zu beobachten. Auch waren bei diesen hohen Doxorubicin-Konzentrationen kaum noch adhärenente Zellen vorhanden. EC d6 wiesen bei hohen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen vergleichsweise mehr adhärenente Zellen als EC d4 auf.

Die behandelten Progenitor CM (CM d6) zeigten hingegen erst ab einer Konzentration von 0,2 μM Doxorubicin erste sich ablösende und damit sterbende Zellen. Dies konnte ebenfalls 48 h nach der Pulsbehandlung von differenzierten CM (CM d8) beobachtet werden, die jedoch überwiegend Bereiche mit übereinander wachsenden Zellen und entsprechend mehr pulsierende Zellbereiche aufwiesen. Terminal differenzierte CM (CM d11) zeigten dagegen nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung kaum eine Veränderung in ihrer Morphologie. Die Kontraktilität der CM hat sich trotz einer Pulsbehandlung mit Doxorubicin auch bei höheren Konzentrationen nicht wesentlich verändert.



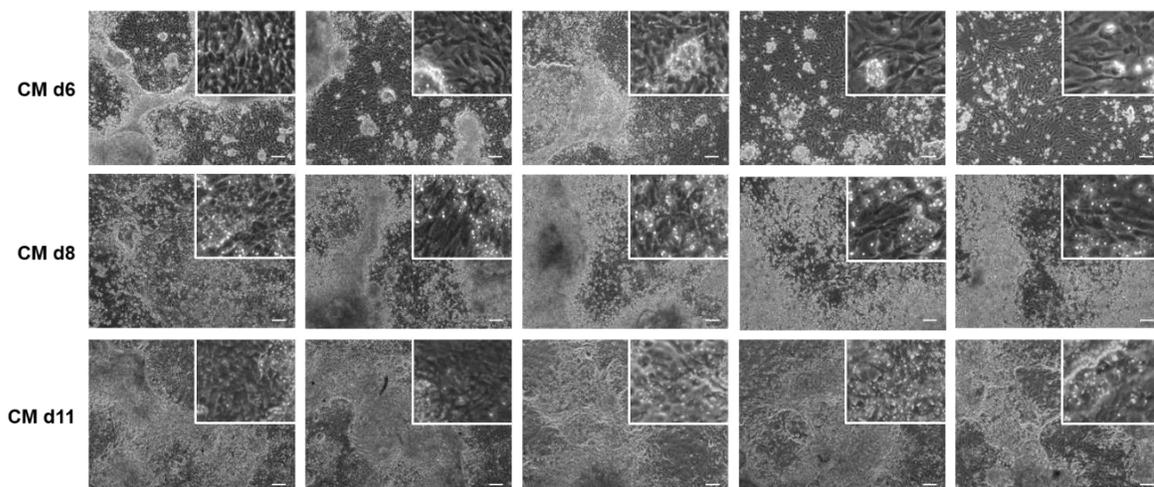


Abbildung 3.9: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Morphologie von mESC und aus mESC differenzierte kardiovaskuläre Zelltypen.

Morphologie von mESC, EC d4 und EC d6, sowie von CM d6, CM d8 und CM d11, 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin (Doxo). mESC wurden 24 h nach der Aussaat behandelt. Progenitorzellen wurden an Tag vier (EC d4) oder an Tag sechs (CM d6) der Differenzierung behandelt. Terminal differenzierte EC wurden an Tag sechs (EC d6) und terminal differenzierte CM an Tag acht (CM d8) und elf (CM d11) behandelt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten (EC: n = 3, CM: n = 4-5). 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . mESC: embryonale Stammzellen der Maus, EC: Endothel-ähnliche Zellen, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, d: Tag.

Um die Suszeptibilität der mESC und daraus differenzierten kardiovaskulären Zelltypen zu analysieren, wurde die Viabilität der Zellen mittels Alamar Blue-Assay bestimmt. Lebende Zellen reduzieren im Alamar Blue-Assay den blauen, wasserlöslichen, nicht-fluoreszierenden Farbstoff Rasazarin zu rosafarbenem, fluoreszierendem Resorufin. Dessen Fluoreszenz kann gemessen und als Maß für die Zellviabilität bzw. Zytotoxizität genutzt werden.

Sowohl mESC als auch Progenitor EC (EC d4) und differenzierte EC (EC d6) zeigten wie erwartet mit steigender Konzentration an Doxorubicin eine Abnahme der Viabilität (Abbildung 3.10). Progenitor EC (EC d4) zeigten die höchste Sensitivität gegenüber Doxorubicin. mESC und differenzierte EC (EC d6) wiesen eine ähnliche und geringere Sensitivität gegenüber Doxorubicin auf. Die inhibitorische Konzentration bei der 50 % der Zellen sterben (IC_{50}) war bei diesen beiden Zelltypen verglichen zu EC d4 um ca. das drei- bis vier-fache erhöht.

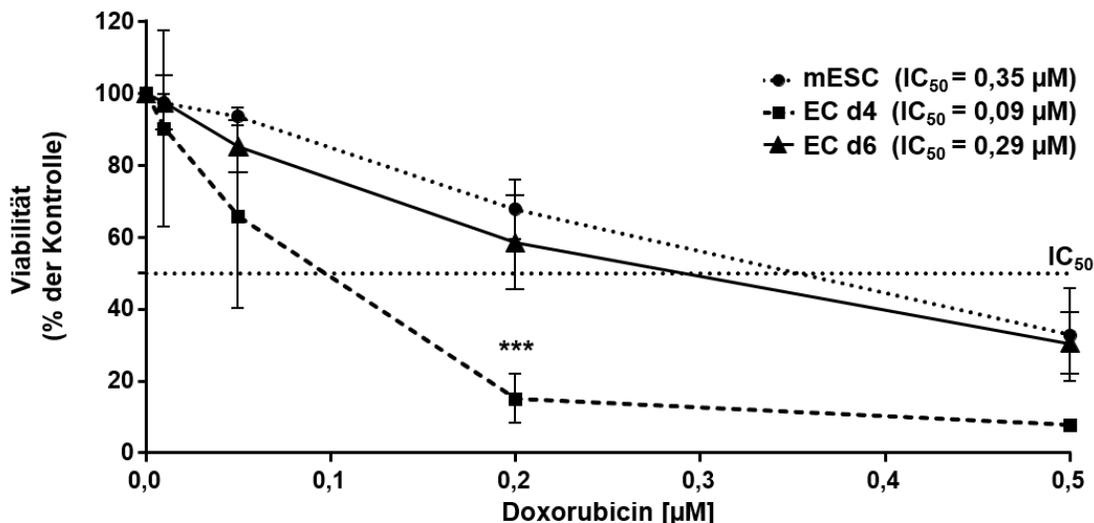


Abbildung 3.10: Viabilität von mESC und aus mESC differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Die Viabilität der murinen embryonalen Stammzellen (mESC), Endothel-ähnlichen Progenitorzellen (EC d4) und differenzierten EC (EC d6) wurde 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin (Doxo) mittels Alamar Blue-Assay gemessen. mESC wurden 24 h nach der Aussaat behandelt. Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung (EC d4) und differenzierte EC an Tag sechs (EC d6) behandelt. Die jeweiligen unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Quadruplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 4$). Die gepunktete Linie zeigt die inhibitorische Konzentration bei der 50 % der Zellen sterben (IC_{50}). *One-way ANOVA*, ***, $p \leq 0,001$ verglichen zu gleichbehandelten mESC. EC: Endothel-ähnliche Zellen, d: Tag, ANOVA: *Analysis of variance*.

Wie erwartet zeigten auch Progenitor CM (CM d6) und differenzierte CM eine Dosis-abhängige Abnahme der Viabilität 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung (Abbildung 3.11). Bei terminal differenzierten CM d11 war lediglich eine maximal 10 %ige Abnahme in der Viabilität zu sehen. Dies bedeutet, dass CM d11 eine hohe Resistenz gegenüber Doxorubicin haben. Die Sensitivität gegenüber Doxorubicin war in Progenitor CM (CM d6) ähnlich wie bei den differenzierten CM d8 und den undifferenzierten mESC. Der niedrigste IC_{50} Wert wurde bei den mESC beobachtet.

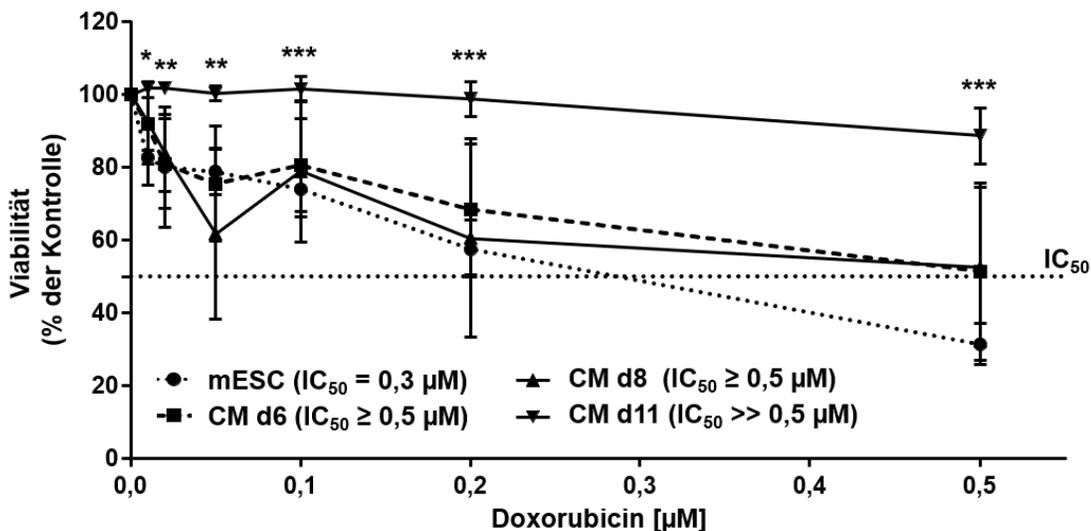


Abbildung 3.11: Viabilität von mESC und aus mESC differenzierten CM nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Die Viabilität der murinen embryonalen Stammzellen (mESC), Kardiomyozyten-ähnlichen Progenitorzellen (CM d6) und differenzierten CM (CM d8 und CM d11) wurde 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin (Doxo) mittels Alamar Blue-Assay gemessen. mESC wurden 24 h nach der Aussaat behandelt. Kardiomyozyten-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag sechs der Differenzierung (CM d6) und differenzierte CM an Tag acht (CM d8) und elf (CM d11) behandelt. Die jeweiligen unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von vier bis fünf unabhängigen Experimenten, die jeweils in Quadruplikaten durchgeführt wurden ($n = 4-5$, $N = 4$). Die gepunktete Linie zeigt die inhibitorische Konzentration bei der 50 % der Zellen sterben (IC_{50}). One-way ANOVA, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ verglichen zu gleichbehandelten mESC. d: Tag, CM: Kardiomyozyten-ähnliche Zellen, ANOVA: *Analysis of variance*.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es eine zelltypspezifische Sensitivität gegenüber Doxorubicin-induzierten Schäden gibt. Diese ist in aus mESC differenzierten Progenitor EC (EC d4) höher als in mESC, differenzierten EC (EC d6), sowie Progenitor CM (CM d6) und differenzierten CM (CM d8 und CM d11), die alle einen identischen genetischen Hintergrund haben.

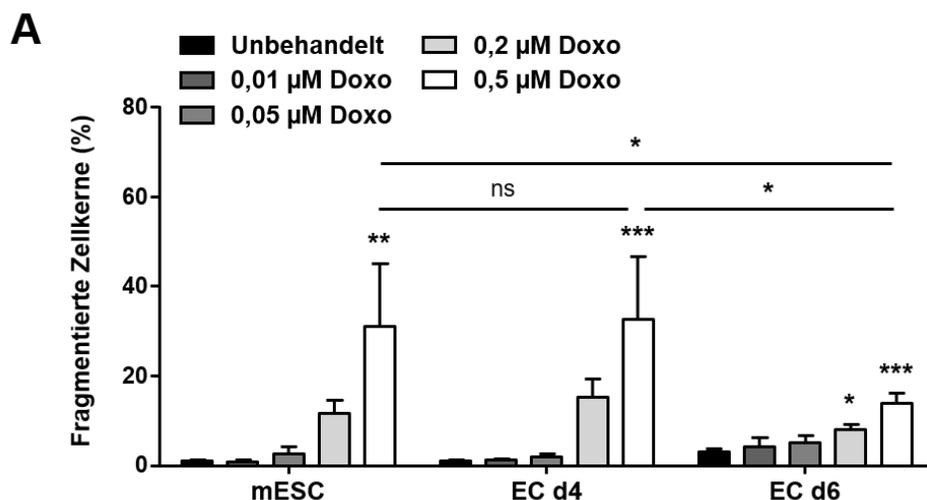
3.2.1 Analyse molekularer Mechanismen, die zur erhöhten Sensitivität von Endothel-ähnlichen Progenitorzellen gegenüber Doxorubicin beitragen

Im vorherigen Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass aus mESC differenzierte Progenitor EC, im Vergleich zu mESC, differenzierten EC und aus mESC differenzierte Progenitor CM sowie CM, eine höhere Sensitivität gegenüber Doxorubicin aufweisen. Daraufhin wurden die Progenitor EC (EC d4) genauer untersucht, um die molekularen Mechanismen, die hinter der erhöhten Sensitivität von Progenitor EC gegenüber Doxorubicin stehen, zu

charakterisieren. Zunächst wurde die Induktion des Zelltods nach Doxorubicin Exposition analysiert.

Der apoptotische Zelltod wurde zunächst durch seine charakteristische Bildung von fragmentierten Zellkernen 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung untersucht (Abbildung 3.12 A). Wie zu erwarten, nahm der prozentuale Anteil der fragmentierten Zellkerne nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung Dosis-abhängig in mESC, Progenitor EC (EC d4) und terminal differenzierten EC (EC d6) zu. Während die Zellkernfragmentierung bei 0,5 μM Doxorubicin in Progenitor EC (EC d4) und mESC ähnlich hoch war, wiesen differenzierte EC (EC d6) im Vergleich dazu einen signifikant reduzierten Prozentanteil apoptotischer Zellen auf.

Vergleichbare Beobachtungen konnten bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der SubG1 Fraktion, welche die apoptotische Zellpopulation widerspiegelt, gemacht werden. Die Induktion der SubG1 Fraktion in Progenitor EC (EC d4) war 48 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung vergleichbar mit der von mESC und EC d6 (Abbildung 3.12 B). Pulsbehandlungen mit hohen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM und 0,5 μM zeigten einen signifikanten Anstieg der SubG1 Fraktion in allen Zelltypen, verglichen zur Behandlung mit einer geringen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentration von 0,01 μM . Differenzierte EC d6 zeigten gegenüber EC d4 eine Tendenz ($p = 0,06$) zu einem geringeren prozentualen Anteil der SubG1 Fraktion nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,2 μM . Diese Daten deuten darauf hin, dass die Sensitivität der Progenitor EC gegenüber Doxorubicin nicht vorrangig auf einer Aktivierung von apoptotischen Zelltodmechanismen beruht.



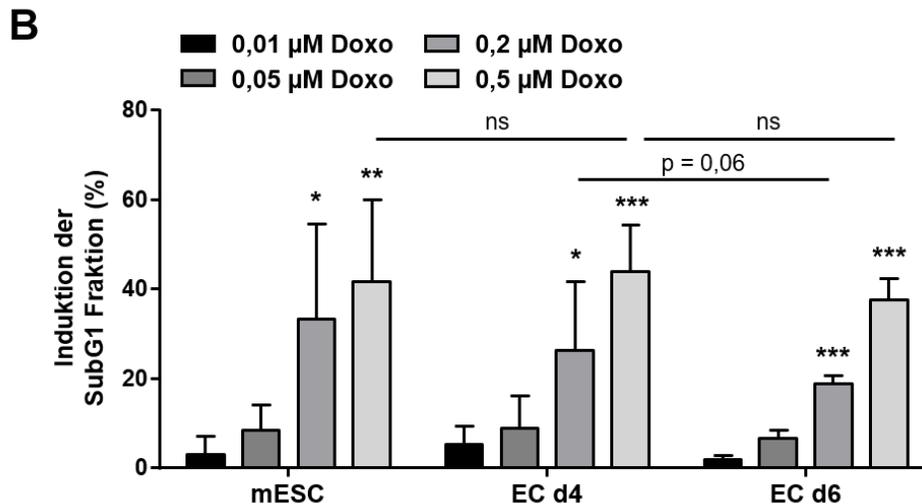
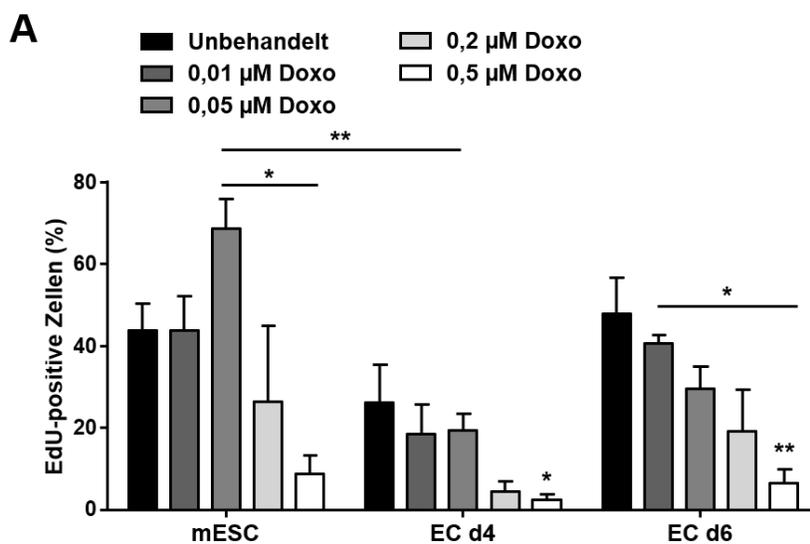


Abbildung 3.12: Stimulation von Zelltodmechanismen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von mESC und aus mESC differenzierten EC.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC), Endothel-ähnliche Progenitorzellen (EC d4) und differenzierte EC (EC d6) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt. Nach einer post-Inkubationsperiode von 48 h wurde die Apoptose durch mikroskopische Auswertung fragmentierter Zellkerne (A) und durch Ermittlung der SubG1 Population mittels Durchflusszytometrie (B) analysiert. mESC wurden 24 h nach Aussaat behandelt. EC wurden an Tag vier (EC d4) oder an Tag sechs (EC d6) des Differenzierungsprozesses behandelt. **(A)** Durch die Ermittlung des prozentualen Anteils der fragmentierten Zellkerne wurde die Apoptosefrequenz quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 100 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 3$, $N \geq 100$). *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ns, nicht signifikant verglichen zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. **(B)** Die apoptotische Zellpopulation wurde durch die Analyse der Doxo-induzierten SubG1 Fraktion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Um den prozentualen Anteil der induzierten SubG1 Fraktion zu errechnen, wurden die Daten der jeweiligen unbehandelten Kontrollzellen von den behandelten Proben subtrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 10.000 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 3$, $N \geq 10.000$). *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; ns, nicht signifikant verglichen zu den jeweiligen Zelltypen mit einer Behandlung von $0,01 \mu\text{M}$ Doxo. EC: Endothel-ähnliche Zellen, d: Tag, ANOVA: *Analysis of variance*.

Um zu überprüfen, ob eine Doxorubicin-Pulsbehandlung einen Einfluss auf die Proliferationsaktivität der verschiedenen Zelltypen hat, wurden EdU-Inkorporationsanalysen durchgeführt. EdU ist ein Nukleosid-Analog zu Thymidin, welches während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA inkorporiert (Yu *et al.*, 2009). Damit können Zellen, die sich in der S-Phase befinden, fluoreszenzmarkiert und mikroskopisch analysiert sowie ihr prozentualer Anteil quantifiziert werden. Unbehandelte mESC, Progenitor EC (EC d4) und differenzierte EC (EC d6) wiesen einen ähnlichen prozentualen Anteil an EdU-positiven Zellen auf und damit ein ähnliches Proliferationspotential (Abbildung 3.13 A). Zusätzliche Zellzählungen zur Bestimmung der Proliferationszeit zeigten ebenfalls ähnliche Verdopplungszeiten von

mESC, Progenitor EC (EC d4) und terminal differenzierten EC (EC d6) auf (Tabelle 3.5). Dies lässt darauf schließen, dass die individuelle Sensitivität der drei Zelltypen gegenüber Doxorubicin (Abbildung 3.10) nicht ausschließlich auf Unterschiede in der basalen Proliferationsrate zurückzuführen ist. 48 h nach einer 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung wurde eine Dosis-abhängige Reduktion der EdU-Inkorporation in mESC, Progenitor EC und differenzierten EC beobachtet (Abbildung 3.13 A und Abbildung 3.13 B). Eine Behandlung mit 0,05 μM Doxorubicin führte bei mESC sogar zu einer leichten Erhöhung des EdU-Einbaus. Im Vergleich zu behandelten mESC und behandelten EC d6 zeigten Doxorubicin-geschädigte Progenitorzellen (EC d4) generell einen geringeren Anteil an EdU-positiven und damit sich in der S-Phase befindenden Zellen.



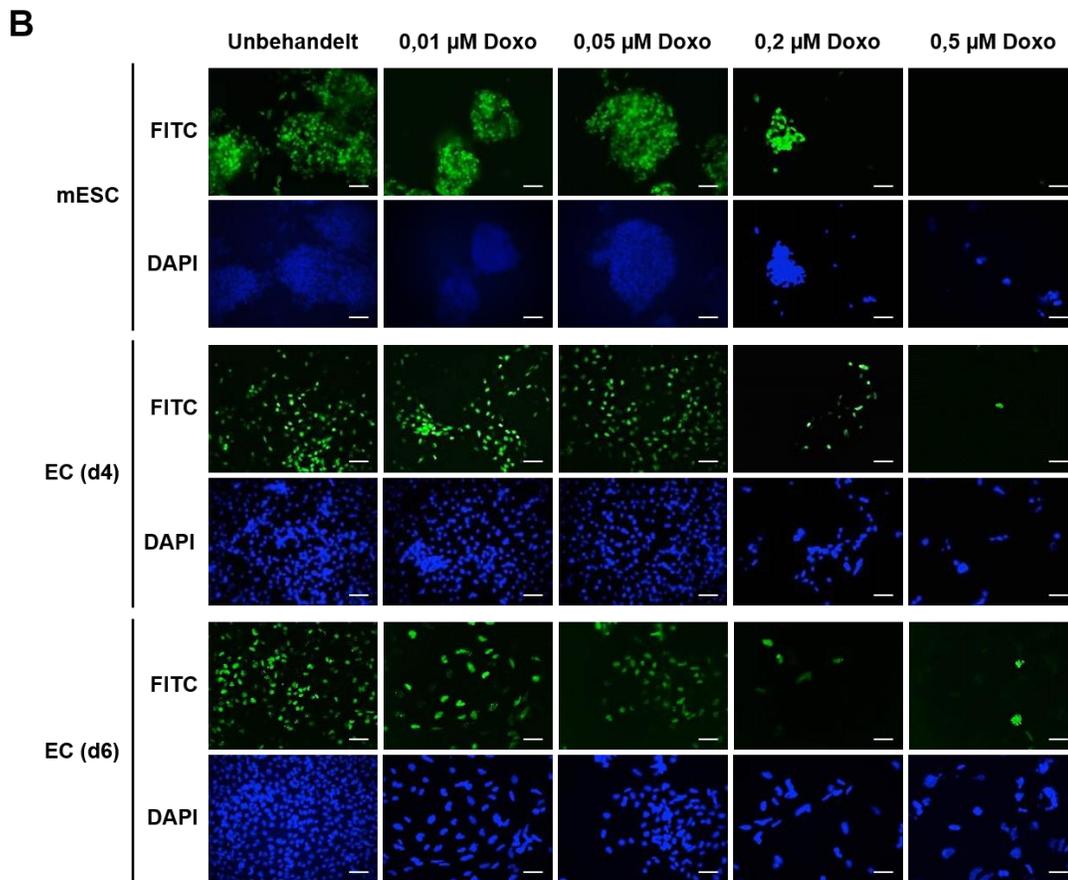


Abbildung 3.13: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Proliferation.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC), Endothel-ähnliche Progenitorzellen (EC d4) und differenzierte EC (EC d6) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt. Nach einer post-Inkubationsperiode von 48 h wurde die Proliferationsaktivität mittels EdU-Inkorporations-Assay analysiert. mESC wurden 24 h nach Aussaat behandelt. EC wurden an Tag vier (EC d4) oder an Tag sechs (EC d6) des Differenzierungsprozesses behandelt. **(A)** Der prozentuale Anteil an EdU-positiven Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 100 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 3$, $N \geq 100$). *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ verglichen zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle. **(B)** Repräsentative Bilder von EdU-positiven Zellen von unbehandelten und behandelten mESC, EC d4 und EC d6 aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). FITC (grün) zeigt die Inkorporation von EdU auf. 40 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μm . d: Tag, EC: Endothel-ähnliche Zellen, EdU: 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, ANOVA: *Analysis of variance*.

Diese Daten deuten darauf hin, dass bei einer Doxorubicin-Pulsbehandlung bevorzugt die Proliferation der sich im Differenzierungsprozess befindlichen Progenitor EC (EC d4) beeinträchtigt wird.

Tabelle 3.5: Verdopplungszeit von mESC und aus mESC differenzierten EC.

Verdopplungszeit von embryonalen Stammzellen der Maus (mESC), Progenitor EC (EC d4) und differenzierten EC (EC d6) während des experimentellen Zeitraums (n = 2). EC: Endothel-ähnliche Zellen.

Zelltyp	Proliferationszeit (Verdopplungszeit)
mESC	22,2 h ± 1,7 h
EC d4	17,3 h ± 1,4 h
EC d6	20,1 h ± 0,6 h

Anschließend wurden Progenitor EC auf beteiligte molekulare Mechanismen hin untersucht, die zu der beobachteten geringeren Proliferationsrate nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung führen könnten. Dazu wurde die mRNA Expression von Genen, deren Produkte an der Regulation von Seneszenz-assoziierten Mechanismen beteiligt sind, mittels quantitativer *real-time* PCR Analyse untersucht. Es konnte eine Dosis-anhängige Hochregulation der mRNA Expression des Seneszenz-assoziierten Zytokins Interleukin-8 (IL-8), der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p16 und p21, des Tumorsuppressors p53, sowie der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (β -Gal) mit steigender Doxorubicin-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 3.14). Die Expression dieser Gene unterschied sich nicht nur signifikant gegenüber unbehandelten Progenitorzellen, sondern auch im Vergleich zu Progenitorzellen, die mit 0,01 μ M Doxorubicin pulsbehandelt wurden. Auf die mRNA Expression von IL-6 hatte Doxorubicin keinen Einfluss. Diese Befunde zeigen, dass Doxorubicin bevorzugt Mechanismen der Seneszenz in differenzierenden Progenitor EC (EC d4) stimuliert.

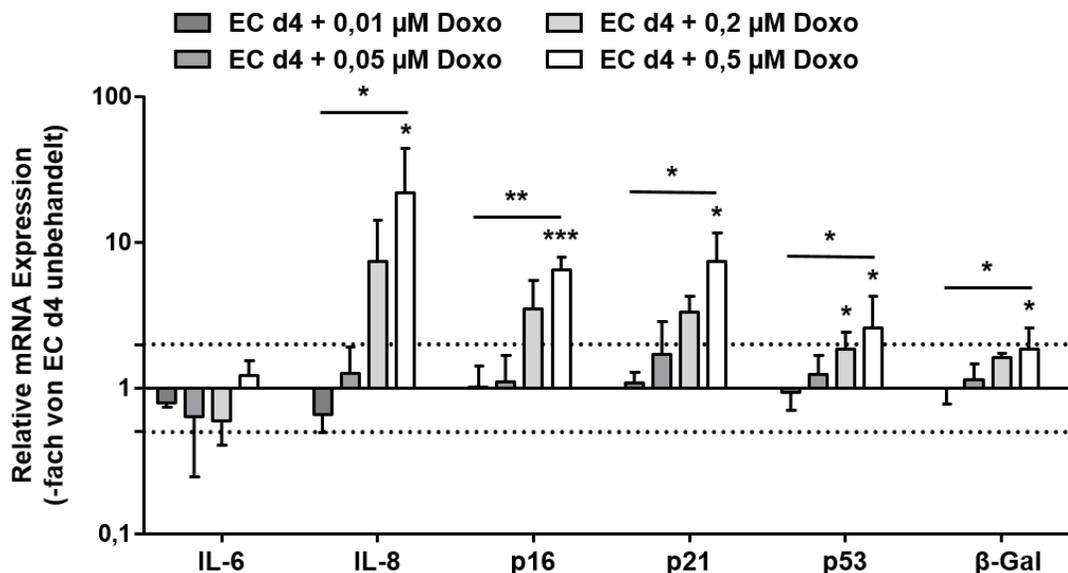


Abbildung 3.14: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Aktivierung Seneszenz-assoziiierter Mechanismen.

Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) Analyse der mRNA Expression von molekularen Markern der Seneszenz nach Doxorubicin (Doxo) -Pulsbehandlung in aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Zellen (EC) an Tag vier (EC d4) des Differenzierungsprozesses. Die qRT-PCR Analyse erfolgte 48 h nach einer 2 h Doxo-Pulsbehandlung, an Tag sechs. Analysiert wurde die mRNA Expression von Seneszenz-assoziierten Zytokinen (IL-6, IL-8) und Proteinen (p16, p21, p53), sowie der β -Galaktosidase (β -Gal). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in unbehandelten EC d4 wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei bis vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n = 3-4, N = 2). *One-way* ANOVA, *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,001 verglichen zu unbehandelten EC d4. PCR: Polymerasekettenreaktion, mESC: embryonale Stammzellen der Maus, d: Tag, IL: Interleukin, ANOVA: *Analysis of variance*.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Sensitivität von Progenitor EC (EC d4) gegenüber Doxorubicin vermutlich auf einer Doxorubicin-stimulierten Aktivierung von p53-abhängigen Seneszenz-Mechanismen beruht, welche zu einer Inhibierung der Proliferation führt.

3.2.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen

Die erhöhte Doxorubicin Sensitivität der aus mESC differenzierten Progenitor EC im Vergleich zu mESC und differenzierten EC wurde in den vorherigen Abschnitten 3.2 und 3.2.1 gezeigt. Nachfolgend wurde nunmehr überprüft, inwieweit sich eine Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential der aus mESC differenzierten Endothel-

ähnlichen Progenitorzellen (EC d4) auswirkt bzw. auf die Funktionalität der aus den behandelten überlebenden EC d4 Progenitorzellen entstandenen differenzierten EC.

3.2.2.1 Charakterisierung des Differenzierungspotentials aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung

Um den Einfluss von Doxorubicin auf den endothelialen Differenzierungsprozess zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von Endothelzell-zugehörigen Markergenen auf mRNA- und Protein-Ebene 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC (EC d4) in terminal differenzierten EC analysiert. Terminal differenzierte EC am Tag sechs der Differenzierung zeigten nur eine Endothelzell-typische kopfsteinpflasterförmige Morphologie, wenn die Progenitorzellen mit gering zytotoxischen Konzentrationen von 0,01 μM und 0,05 μM Doxorubicin behandelt wurden (Abbildung 3.9). Doxorubicin konnte die Expression von Pluripotenz- und Endothelzellmarkern auf mRNA-Ebene nicht beeinflussen. Es war weder eine Erhöhung in der Expression der Stammzellefaktoren Nanog und Oct4 durch eine Doxorubicin-Pulsbehandlung zu beobachten, noch eine Verringerung der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1, VE-Cadherin, Pecam1 und Tie1 (Abbildung 3.15 A). Auch zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM und 0,5 μM hatten keinen Einfluss auf die mRNA Mengen der untersuchten Markergene. Somit legen die mRNA Daten die Vermutung nahe, dass der endotheliale Differenzierungsprozess der überlebenden Progenitorzellen auch durch hohe Doxorubicin-Konzentrationen nicht beeinflusst wird.

Zur weiteren Abklärung wurde der Einfluss von Doxorubicin auf den endothelialen Differenzierungsprozess zusätzlich auf Proteinebene untersucht. Zunächst wurden Western Blot Analysen von behandelten Progenitor EC mit ausgewählten Konzentrationen an Doxorubicin, einer gering zytotoxischen (0,05 μM) und einer hohen zytotoxischen Konzentration (0,2 μM), durchgeführt. Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme in der Proteinexpressionsstärke der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1, VE-Cadherin (VE-Cad) und Pecam1 (Abbildung 3.15 B) nach 48 h. EC, die zuvor mit 0,05 μM Doxorubicin behandelt wurden (EC d4 + 0,05 μM Doxo) wiesen eine ähnliche Proteinexpressionsstärke der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1 und VE-Cadherin, im Vergleich zu unbehandelten EC d4 auf. Folglich haben hohe zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM einen Einfluss auf den endothelialen Differenzierungsprozess

bzw. auf die Expression von Endothelzell-zugehörigen Markergenen auf Proteinebene, jedoch nicht auf mRNA-Ebene.

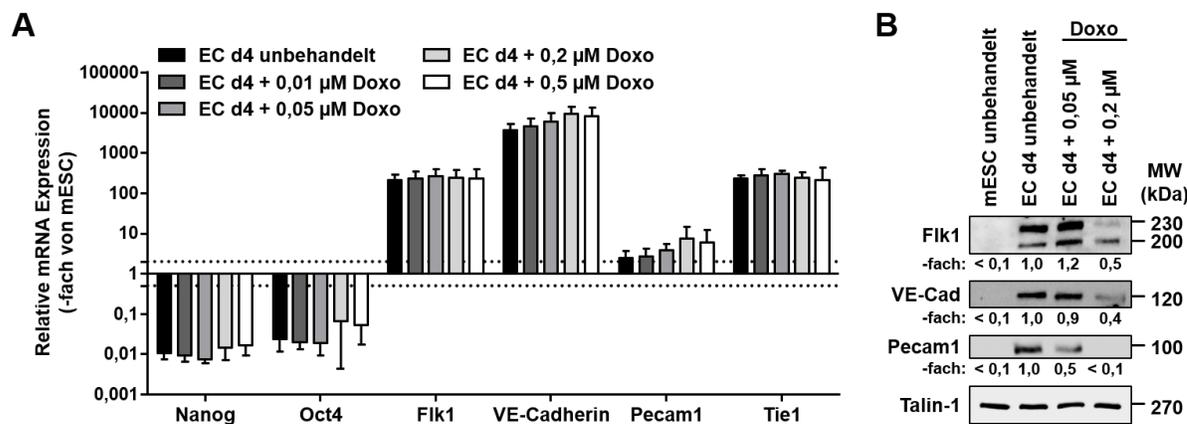
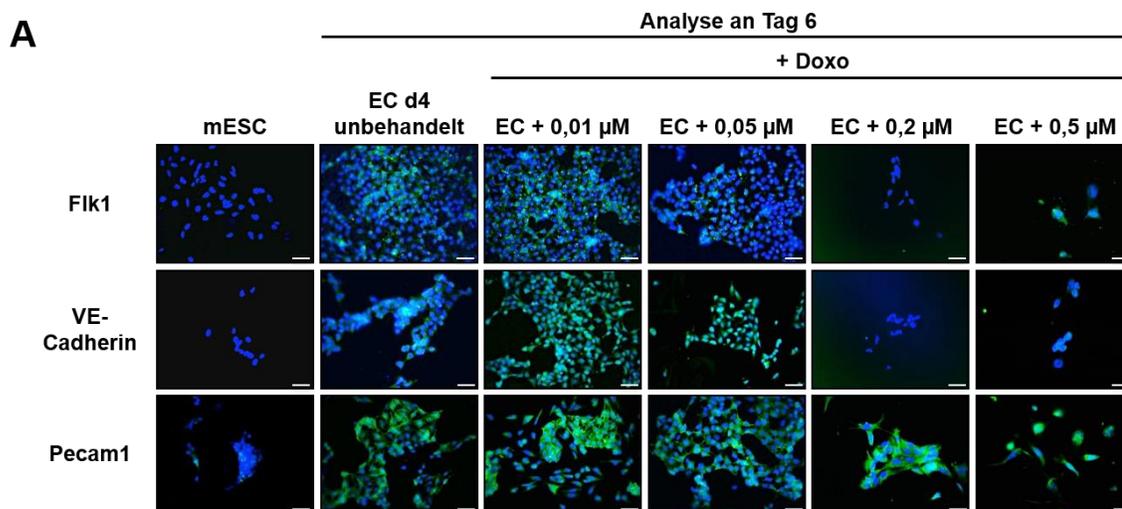


Abbildung 3.15: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA- und Proteinexpression von prototypischen Endothelzellmarkern.

Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung (EC d4) mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt und 48 h später, an Tag sechs der Differenzierung, mit unbehandelten Endothel-ähnlichen Zellen (EC) verglichen. **(A)** Quantitative *real-time* PCR Analyse von embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) und aus mESC differenzierten EC, die an Tag vier der Differenzierung mit Doxo behandelt und an Tag sechs analysiert wurden. Untersucht wurde die mRNA Expression von prototypischen Stammzellfaktoren (Nanog, Oct4) und Endothelzell-zugehörigen Markern (Flk1, VE-Cadherin, Pecam1, Tie1). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). **(B)** Western Blot Analyse zur Bestimmung der Proteinexpression von ausgewählten Endothelzell-zugehörigen Markern (Flk1, VE-Cadherin (VE-Cad), Pecam1) in unbehandelten mESC und EC d4 sowie 48 h nach einer Doxo-Pulsbehandlung von EC d4. Die relative Proteinexpression von unbehandelten EC d4 wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Talin-1 Proteinexpression wurde als Ladekontrolle verwendet. Gezeigt sind repräsentative Blots sowie quantitative Daten der Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$). Die Quantifizierung erfolgte mit der Image Lab Software von Bio-Rad. Nanog: *Nanog homeobox*, Oct4: *octamer binding transcription factor 4*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, Tie1: *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1*, MW: Molekulargewicht.

Um die Unterschiede zwischen mRNA- und Protein-Daten bezüglich der Expression von Endothelzell-Markergenen zu überprüfen, wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Diese sollten einen Aufschluss über die Proteinexpression der Endothelzellmarker auf Einzelzellebene geben. Auch bei dieser Analyse konnte eine Dosis-abhängige Abnahme in der Proteinexpression der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1 und VE-Cadherin mit steigender Doxorubicin-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 3.16 A und Abbildung 3.16 B). Die Proteinexpression von Pecam1 hingegen blieb konstant.

Insgesamt bestätigten die immunzytochemischen Färbungen die bereits im Western Blot gezeigten Ergebnisse und wichen lediglich in der Expression von Pecam1 ab. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung je nach verwendeter Konzentration die weitere Differenzierung von Progenitorzellen zu EC hinsichtlich der Expression von Endothelzell-zugehörigen Markern auf mRNA-Ebene nicht beeinflusst. Selektiv wird jedoch die Expression von individuellen Endothelzell-zugehörigen Markern auf Proteinebene durch Doxorubicin verändert.



B

	mESC	EC unbehandelt	EC + 0,01 μ M Doxo	EC + 0,05 μ M Doxo	EC + 0,2 μ M Doxo	EC + 0,5 μ M Doxo
Flk1	-	+	+	+	0	0
VE-Cadherin	-	+	++	+	0	-
Pecam1	0	++	++	++	++	++

Abbildung 3.16: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Proteinexpression von prototypischen Endothelzellmarkern auf Einzelzellebene.

Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung (EC d4) mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt und 48 h später, an Tag sechs der Differenzierung, mit unbehandelten mESC und Endothel-ähnlichen Zellen (EC) verglichen. **(A)** Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression von Endothelzell-zugehörigen Markern (Flk1, VE-Cadherin, Pecam1) von mESC und EC. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau) und die Endothelzell-zugehörigen Marker sind in grün mittels FITC dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten (n = 3). 40 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μ m. **(B)** Die Tabelle fasst die erhaltenen Ergebnisse aus Abbildungsteil A von drei unabhängigen immunzytochemischen Analysen semiquantitativ zusammen. -, sehr schwache Expression (\leq 20 % positive Zellen); 0, schwache Expression (20-50 % positive Zellen); +, starke Expression (50-80 % positive Zellen); ++, sehr starke Expression (\geq 80 % positive Zellen). Flk1: *fetal liver kinase 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, mESC: embryonale Stammzellen der Maus.

3.2.2.2 Funktionelle Analysen der aus Endothel-ähnlichen Progenitorzellen differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung

Nachdem der Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitorzellen (EC d4) auf den endothelialen Differenzierungsprozess im vorherigen Abschnitt 3.2.2.1 charakterisiert wurde, wird nun die Funktionalität der daraus differenzierten EC analysiert. Erste Hinweise auf Veränderungen der Funktionalität von Zellen sind Änderungen in ihrer Morphologie. Diese waren bereits bei der makroskopischen Betrachtung von behandelten mESC und aus mESC differenzierten EC mit hohen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM und 0,5 μM sichtbar (Abbildung 3.9). Ob es auch mikroskopische Veränderungen in der Morphologie 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung der aus EC d4 differenzierten EC gibt, wurde durch die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts mittels Fluoresceinisothiocyanat (FITC) -gekoppelter Phalloidin (FITC-Phalloidin) Färbung untersucht. Wie zu erwarten, wurde eine Dosis-anhängige Veränderung der Aktin-Zytoskelett Morphologie 48 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung von EC d4 im Vergleich zu unbehandelten EC d4 beobachtet (Abbildung 3.17 A). Schon eine Behandlung mit einer geringen zytotoxischen Konzentration von 0,01 μM Doxorubicin führte zu Änderungen in der Aktin-Organisation. Dies konnte ebenfalls bei Doxorubicin-behandelten mESC verglichen zu unbehandelten mESC beobachtet werden. Während mESC eher mit der Bildung von Aktin-Stressfasern auf eine Doxorubicin-Pulsbehandlung reagierten, bildeten Progenitor EC (EC d4) überwiegend Filopodien-ähnliche Aktin-Strukturen aus. Somit deutet die veränderte Organisation des Aktin-Zytoskeletts nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung von EC d4 auf einen Unterschied in der Funktionalität der überlebenden differenzierten EC hin.

Das Aktin-Zytoskelett ist an der Regulation zahlreicher Zellfunktionen, inklusive der Zelladhäsion und der Motilität, beteiligt (Symons, 1996; Hall, 1998). Bekannte Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts sind Ras-homologe Guanosintriphosphat-bindende Proteine (GTPasen) (Hall, 1998; Aspenstrom, 1999), welche auch Aktin-Zytoskelett-zugehörigen Prozesse wie die Migration und die Zelladhäsion regulieren (Takaishi *et al.*, 1997; Braga, 1999; Ridley, 2015). Daher wurde die mRNA Expression der kleinen GTPasen der Rho-Familie RhoA, Rac1 und Cdc42 in aus Doxorubicin-pulsbehandelten EC d4 differenzierten EC untersucht (Abbildung 3.17 B). Mit steigender Doxorubicin-Konzentration konnte ein leichter Dosis-abhängiger Anstieg der mRNA Expression der untersuchten Gene gemessen werden. Möglicherweise führte eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC (EC d4) zu einer veränderten Morphologie

und Aktin-Zytoskelett-zugehörigen Funktionen der differenzierten EC durch eine geänderte mRNA Expression von Rho GTPasen.

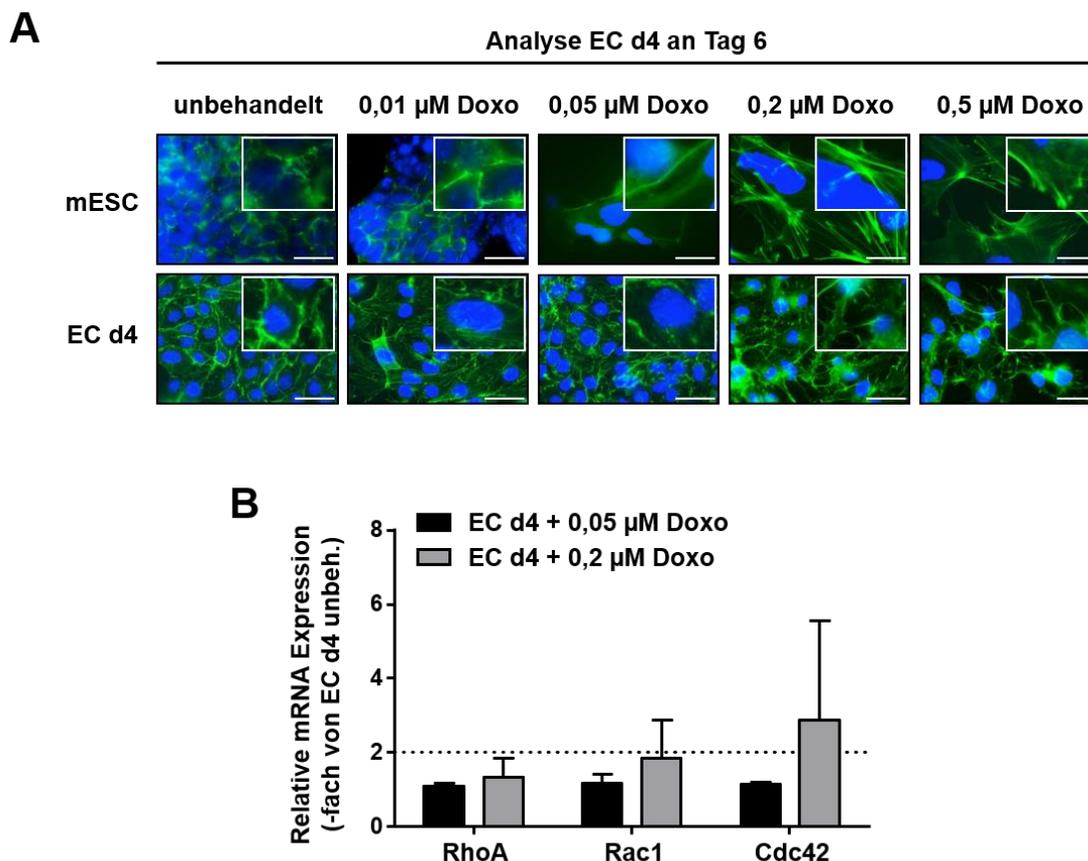


Abbildung 3.17: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Zellmorphologie von mESC und aus EC d4 differenzierten EC.

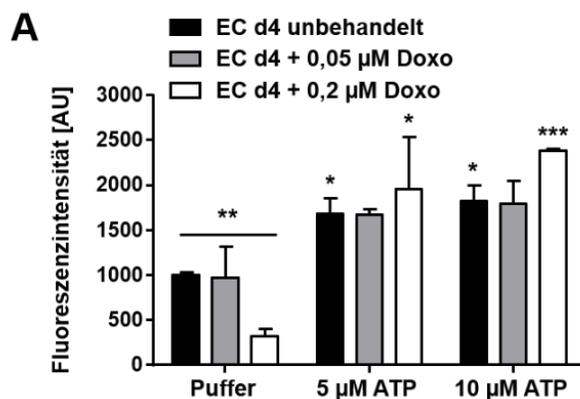
Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung (EC d4) mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt. Nach einer post-Inkubationsperiode von 48 h wurden die Zellen an Tag sechs der Differenzierung untersucht. **(A)** Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts wurden mittels FITC-Phalloidin-Färbung analysiert. Embryonale Stammzellen der Maus (mESC) wurden 24 h nach Aussaat behandelt und Endothel-ähnliche Progenitorzellen an Tag vier des Differenzierungsprozesses (EC d4). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). FITC-Phalloidin (grün) zeigt das Aktin-Zytoskelett auf. Gezeigt sind repräsentative Abbildungen aus zwei bzw. drei unabhängigen Experimenten (mESC: $n = 2$, EC d4: $n = 3$). 100 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μm . **(B)** Quantitative *real-time* PCR Analyse von aus mESC differenzierten EC, die an Tag vier der Differenzierung (EC d4) mit Doxo pulsbehandelt und an Tag sechs analysiert wurden. Untersucht wurde die mRNA Expression der kleinen GTPasen der Rho-Familie (RhoA, Rac1, Cdc42). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in unbehandelten EC d4 wurde gleich 1,0 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluorescein-isothiocyanat, PCR: Polymerasekettenreaktion, GTPasen: Guanosintriphosphat-bindende Proteine, RhoA: *Ras homolog family member A*, Rac1: *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, Cdc42: *Cell division control protein 42 homolog*.

Nachdem bereits die Resultate der morphologischen Analyse der differenzierten EC erste Hinweise auf eine veränderte Funktionalität der zuvor mit Doxorubicin geschädigten Progenitor EC ergaben, wurden im Folgenden Endothelzell-spezifische Funktionen analysiert. Eine Endothelzell-spezifische Funktion ist die intrazelluläre Calcium-Freisetzung nach Stimulation von purinergen Rezeptoren mit Adenosintriphosphat (ATP). Zu diesem Zweck wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration mittels eines Calcium-Assay bestimmt (Kassack *et al.*, 2002). Durch Zugabe des membranpermeablen Fluoreszenzfarbstoffs Oregon Green® 488 BAPTA-1/AM, welcher in intakten Zellen Calcium nach Spaltung des Acetoxymethyl (AM) -Esters bindet, wurde die basale Fluoreszenzintensität unter der basalen Calcium-Menge gemessen. Die Fluoreszenzintensität wird durch Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration, z.B. infolge einer Calcium-Freisetzung, verstärkt. Somit ist die gemessene Fluoreszenzintensität proportional zur intrazellulären Calcium-Konzentration. Progenitor EC (EC d4) wurden mit Doxorubicin pulsbehandelt. Nach 48 h wurden die daraus differenzierten EC hinsichtlich ihres Potenzials der Calcium-Freisetzung nach ATP-Stimulation analysiert. Eine Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,2 µM von EC d4 führte zur Abnahme der basalen intrazellulären Calcium-Konzentration in den differenzierten EC (Abbildung 3.18 A). Nach einer 30 s Inkubationsperiode mit ATP konnte in unbehandelten, sowie in zuvor mit 0,2 µM Doxorubicin pulsbehandelten EC ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration beobachtet werden. Differenzierte EC, deren Progenitorzellen zuvor mit 0,2 µM Doxorubicin pulsbehandelt wurden, wiesen trotz einer geringeren basalen Calcium-Konzentration einen leicht höheren Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration als unbehandelte EC nach ATP-Stimulation auf. Somit führte eine Pulsbehandlung mit Doxorubicin in Progenitor EC zu keinem Funktionsverlust in den daraus differenzierten EC in Bezug auf deren Fähigkeit einer Calcium-Freisetzung nach ATP-Stimulation.

Eine weitere Endothelzell-spezifische Funktion ist es, im Rahmen der Immunantwort bzw. nach der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen verstärkt Adhäsionsmoleküle zu exprimieren (Peltz, 1993; Carlos and Harlan, 1994; Nourse *et al.*, 2010). Um den Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf diese endotheliale Funktion zu überprüfen, wurden die differenzierten EC der unbehandelten bzw. Doxorubicin-pulsbehandelten Progenitor EC (EC d4) an Tag sechs der Differenzierung einem inflammatorischen Zytokincocktail für eine Stunde exponiert. Der Zytokincocktail bestand aus den proinflammatorischen Zytokinen Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β). Die basale mRNA Expression des intrazellulären Zelladhäsionsmolekül 1 (Icam-1, *intercellular adhesion molecule 1*) und des

Cystein-Cystein Chemokinligand 2 (CCL2) war in differenzierten EC, deren Progenitorzellen mit 0,2 μM Doxorubicin pulsbehandelt wurden, auf mehr als das Doppelte erhöht (Abbildung 3.18 B). Die Doxorubicin-Pulsbehandlung zeigte keinen Einfluss auf die basale mRNA Expression des endothelialen Selektins (E-Selektin), des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls 1 (Vcam-1), der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Die Zytokin-Stimulation bewirkte in den zuvor mit Doxorubicin pulsbehandelten EC eine verstärkte mRNA Expression von Icam-1 und CCL2. Daraus lässt sich schließen, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC keine längerfristige negative Auswirkung auf die inflammatorische Stressantwort der überlebenden daraus differenzierten EC hat.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit von Endothelzellen Lipoproteine geringer Dichte (LDL, *low-density lipoprotein*) aufzunehmen untersucht (Voyta *et al.*, 1984). Die Aufnahme von LDL wurde durch einen fluoreszierenden (Dil) acetylierten (ac) LDL (Dil-ac-LDL) -Komplex sichtbar gemacht und 48 h nach Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC mittels immunzytochemischer Färbung untersucht. Wie erwartet waren mESC und Progenitor EC (EC d4) nicht in der Lage LDL aufzunehmen, während differenzierte EC (EC d4 unbehandelt) dies konnten (Abbildung 3.18 C). Eine Pulsbehandlung der Progenitor EC (EC d4) mit Doxorubicin beeinträchtigte die Fähigkeit der LDL-Aufnahme der überlebenden, differenzierten EC an Tag sechs nicht. Selbst hoch zytotoxische Konzentrationen von 0,5 μM Doxorubicin bewirkten keine Veränderung dieser Fähigkeit in den überlebenden EC.



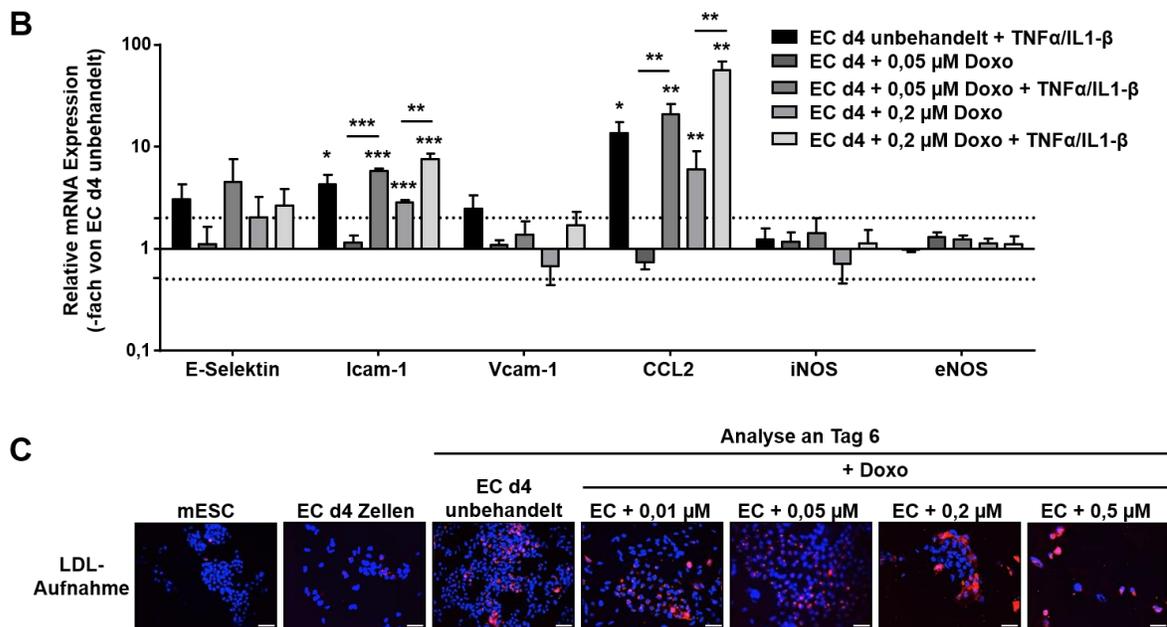


Abbildung 3.18: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf Endothelzell-spezifische Funktionen.

Endothel-ähnliche Progenitorzellen (EC d4) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt. Nach einer post-Inkubationsperiode von 48 h wurden die Zellen auf ihre Funktionalität hin analysiert. **(A)** Calcium (Ca^{2+})-Freisetzung von unbehandelten und zuvor mit Doxo behandelten Endothel-ähnliche Zellen (EC) unter basalen Bedingungen (Puffer) und nach Stimulation von purinergen Rezeptoren mit Adenosintriphosphat (ATP) an Tag sechs der Differenzierung. Nach einer 30 s Inkubationsperiode wurde die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration anhand der Fluoreszenzintensität detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden ($n = 2$, $N = 3$). Student's t-Test, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ verglichen zur jeweiligen Pufferkontrolle. **(B)** Progenitor EC wurden an Tag vier der Differenzierung mit Doxo pulsbehandelt und an Tag sechs unbehandelt oder mit proinflammatorischen Zytokinen ($\text{TNF}\alpha/\text{IL-1}\beta$) (10 ng/ml) für 1 h exponiert. Anschließend wurde die mRNA Expression der Endothelzellmarker E-Selektin, Icam-1, Vcam-1, CCL2, iNOS und eNOS durch quantitative *real-time* PCR Analyse untersucht. Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in unbehandelten EC d4 wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). Student's t-Test, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ verglichen zu unbehandelten EC d4. **(C)** Die Aufnahme von acetyliertem (ac)-LDL wurde mittels Immunzytochemie in embryonalen Stammzellen der Maus (mESC), Progenitor EC (EC d4) und in mit Doxo behandelten EC d4 48 h nach einer Pulsbehandlung analysiert. Die rote Farbe zeigt die Aufnahme des fluoreszierenden ac-LDL mittels TRITC-Färbung. Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 10 x Vergrößerung. Der Maßstabsbalken repräsentiert 50 μm . $\text{TNF}\alpha$: Tumornekrosefaktor- α , $\text{IL-1}\beta$: Interleukin-1 β , E-Selektin: endotheliales Selektin, Icam-1: *intercellular adhesion molecule 1*, Vcam-1: *vascular cell adhesion molecule 1*, CCL2: Cystein-Cystein Chemokinligand 2, iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, PCR: Polymerasekettenreaktion. LDL: Lipoprotein geringer Dichte, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC unterschiedliche funktionale Auswirkungen auf die überlebenden,

differenzierten EC hat. Die Fähigkeit der differenzierten EC nach der Stimulation purinerge Rezeptoren mit ATP Calcium freizusetzen sowie die Aufnahme von ac-LDL wurde durch eine vorangegangene Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitorzellen nicht beeinträchtigt. Eine Doxorubicin-Behandlung der Progenitorzellen führte in EC zu einer veränderten Organisation des Aktin-Zytoskeletts sowie zu einer verstärkten Expression von Icam-1 und CCL2 nach Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA-Ebene.

3.2.2.3 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mitochondriale Funktionen

Zellen besitzen neben der nukleären DNA auch mitochondriale DNA. Somit könnten Genotoxine wie Doxorubicin mitochondriale Funktionen über die mitochondriale DNA direkt oder indirekt über die nukleäre DNA beeinträchtigen. Da Mitochondrien die Energie für den zellulären Metabolismus bereitstellen und in der Fachliteratur diskutiert wird, dass Doxorubicin mitochondriale Schäden auslöst (Gewirtz, 1999; Cappetta *et al.*, 2017), wurde der Einfluss der Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mitochondriale Funktionen hier näher untersucht. Dabei wurde sowohl die mögliche Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion durch Doxorubicin über eine direkte Schädigung der mitochondrialen DNA als auch einer Schädigung nukleärer Gene, die für eine ordnungsgemäße mitochondriale Funktion benötigt werden, eruiert.

Hierzu wurde zunächst das Verhältnis von mitochondrialer DNA (mtDNA) zu genomischer DNA (gDNA) mittels quantitativer genomischer *real-time* PCR untersucht. Bei mESC hatte eine Doxorubicin-Pulsbehandlung keinen Einfluss auf die Gesamtmenge der mtDNA (Abbildung 3.19 A). Im Gegensatz dazu zeigte eine Pulsbehandlung der Progenitor EC mit 0,2 μM Doxorubicin in den differenzierten EC einen signifikanten Anstieg der Menge an mtDNA (Abbildung 3.19 B). Dabei unterschieden sich unbehandelte mESC und Progenitor EC (EC d4) nicht in ihrem Verhältnis von mtDNA zu gDNA. Zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM erhöhten somit die Menge an mtDNA in differenzierten EC von zuvor behandelten Progenitor EC.

Weiterhin wurde die Proteinexpression von phosphorylierten Metabolismus-assoziierten Kinasen analysiert, um Informationen über deren Aktivierungsstatus zu erhalten. Differenzierte EC zeigten eine niedrigere Expression der phosphorylierten Proteinkinasen Ribosomale Protein S6 Kinase beta-1 (p-p70S6), 5' Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (p-AMPK α) sowie der Glykogensynthase-Kinase 3 α (p-GSK-3 α) und p-GSK-3 β als mESC (Abbildung 3.19 C). Eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von 0,05 μM bewirkte

in mESC eine Verringerung der Proteinexpression aller untersuchten Kinasen. Bei den aus zuvor behandelten Progenitorzellen differenzierten EC hingegen, führte diese niedrige Doxorubicin-Konzentration lediglich zu einer Abnahme der Proteinexpression von p-GSK-3 α und p-GSK-3 β . Hohe zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μ M bewirkten im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle keine Veränderung der Proteinexpression von p-AMPK α in mESC und EC. Zusätzlich bewirkte diese Doxorubicin-Konzentration keine Änderung der Proteinkonzentration von p-GSK-3 α und p-GSK-3 β in den überlebenden differenzierten EC.

Zudem wurde die mRNA-Expression von Genen, die an der Kontrolle von Mitochondrienfunktionen, wie der Biogenese (Peroxisom Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma Coaktivator 1 α (PGC1 α , *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*)), der äußeren Mitochondrienmembranfusion (Mitofusin-2 (MFN2)) und an Stoffwechselwegen (Sirtuin 4 (Sirt4)) beteiligt sind, untersucht. Eine Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC führte in den daraus differenzierten EC zu einer signifikanten Hochregulation der analysierten Gene (Abbildung 3.19 D). Für die Gene PGC1 α und MFN2 wurde nach Doxorubicin-Pulsbehandlung eine Dosis-abhängige Zunahme in ihrer mRNA Expression beobachtet.

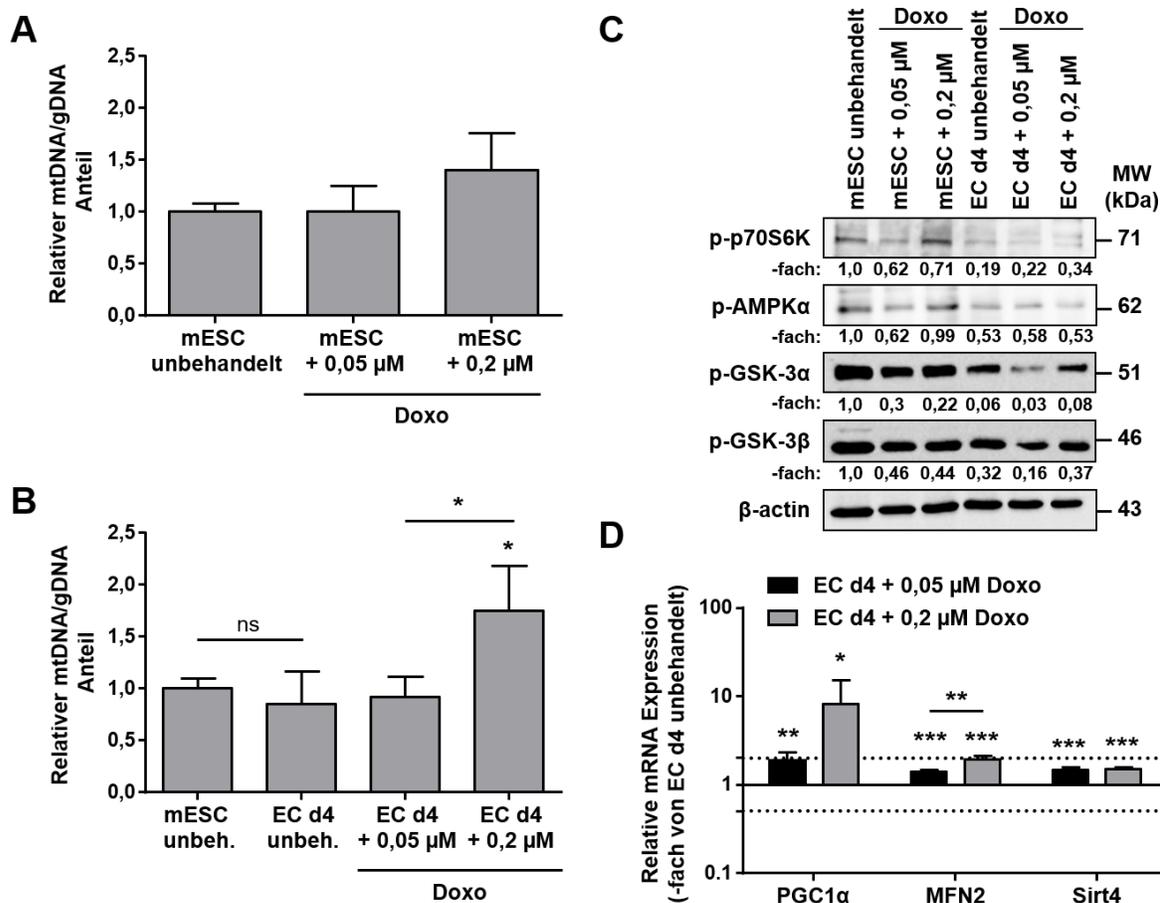


Abbildung 3.19: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mitochondriale Funktionen.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC) und Endothel-ähnliche Progenitorzellen (EC d4) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt und 48 h später analysiert. **(A)** Quantitative genomische *real-time* PCR (qPCR) Analyse von unbehandelten und Doxo behandelten mESC. Der relative Anteil der mitochondrialen DNA (mtDNA) im Verhältnis zur genomischen DNA (gDNA) wurde in unbehandelten mESC gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 4$, $N = 2$). **(B)** Genomische qPCR Analyse von unbehandelten und Doxo behandelten Progenitor EC (EC d4). Der relative Anteil der mtDNA/gDNA wurde in unbehandelten mESC gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 2$). *One-way* ANOVA, *, $p \leq 0,05$; ns, nicht signifikant verglichen zu unbehandelten EC d4. **(C)** 48 h nach einer 2 h Doxo-Pulsbehandlung von mESC und EC d4 wurde die Proteinexpression von phosphorylierten Metabolismus-assoziierten Kinasen (p-p70S6K, p-AMPK α , p-GSK-3 α , p-GSK-3 β) mittels Western Blot Analyse untersucht. Die relative Proteinexpression in unbehandelten mESC wurde gleich 1,0 gesetzt. Die β -Aktin Proteinexpression diente als Ladekontrolle. Gezeigt sind quantitative Daten aus einem repräsentativen Experiment. Die Quantifizierung erfolgte mit der Image Lab Software von Bio-Rad. **(D)** qRT-PCR Analyse von Suszeptibilitäts-zugehörigen Genen, die eine Rolle bei Mitochondrienfunktionen ausüben. Dargestellt sind Mittelwerte + SD von drei (Sirt4) bis vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3-4$, $N = 2$). Student's *t*-Test, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ verglichen zu unbehandelten EC d4. PCR: Polymerasekettenreaktion, p70S6K: Ribosomale Protein S6 Kinase beta-1, AMPK α : 5' Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase, GSK-3: Glykogensynthase-Kinase 3, MW: Molekulargewicht, PGC1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*, MFN2: Mitofusin-2, Sirt4: Sirtuin 4, ANOVA: *Analysis of variance*.

Des Weiteren wurde der zelluläre ATP-Gehalt mit einer Luciferase-basierenden Methode gemessen, um den Einfluss von Doxorubicin auf mitochondriale Funktionen aufzuklären. Bei dieser Methode nimmt das durch den Luciferaseumsatz entstehende emittierte Licht proportional zu der ATP-Konzentration der Zelle zu. Aus Progenitor EC (EC d4) differenzierte EC wiesen gegenüber mESC einen signifikant höheren basalen zellulären ATP-Gehalt auf (Abbildung 3.20 A). Auch differenzierte EC, deren EC d4 zuvor mit Doxorubicin pulsbehandelt wurden, zeigten dies im Vergleich zu gleichbehandelten mESC. mESC wiesen nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung einen Dosis-abhängigen Anstieg des zellulären ATP-Gehalts auf. Diesbezüglich wurde bei differenzierten EC hingegen eine signifikante Dosis-abhängige Verringerung nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC (EC d4) beobachtet. Da bei dieser Methode der ATP-Messung nicht zwischen ATP unterschieden werden kann, das von Mitochondrien produziert wurde oder während der Glykolyse im Zytoplasma entstanden ist, wurde das *Seahorse* Verfahren hinzugezogen. Durch die Verwendung des Mito Stress Kits wurden ausschließlich mitochondriale Parameter, die im Bezug zur mitochondrialen Atmungskette stehen, erfasst. Differenzierte EC aus unbehandelten EC d4 zeigten eine signifikant höhere Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, *oxygen consumption rate*) der basalen Respiration, der freien respiratorischen Kapazität, der ATP Produktion und der nicht-mitochondrialen Respiration gegenüber unbehandelten mESC (Abbildung 3.20 B). 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC zeigten die differenzierten EC eine signifikante Dosis-anhängige Abnahme dieser mitochondrialen Parameter. Mit Doxorubicin-pulsbehandelte mESC wiesen hingegen nur eine geringfügige Dosis-abhängige Reduktion in der freien respiratorischen Kapazität und der nicht-mitochondrialen Respiration auf. Die basale Respiration und die ATP Produktion der mESC verringerte sich nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung minimal, nahm jedoch mit steigender Doxorubicin-Konzentration nicht weiter ab. Durch die gewonnenen ATP Produktions-Daten der *Seahorse* Messung kann die Doxorubicin-bedingte Verringerung des gemessenen zellulären ATP-Gehalts in differenzierten EC (Abbildung 3.20 A) auf eine Abnahme der mitochondrialen ATP Produktion zurückgeführt werden.

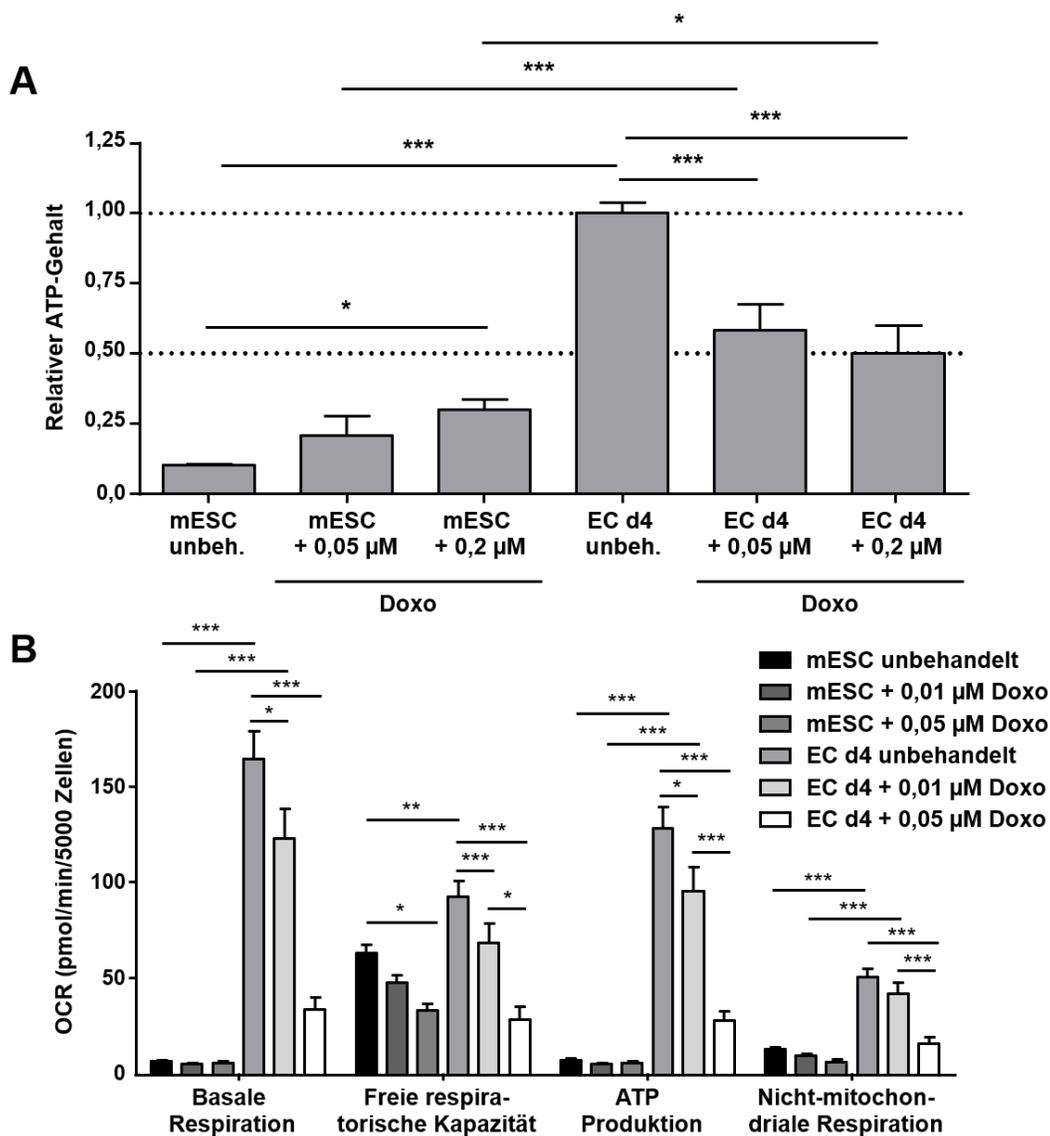


Abbildung 3.20: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf den zellulären ATP-Gehalt und mitochondriale Funktionen.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC) und Endothel-ähnliche Progenitorzellen (EC d4) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt und 48 h später analysiert. mESC wurden 24 h nach Aussaat behandelt und EC d4 an Tag vier der Differenzierung. **(A)** Der zelluläre Adenosintriphosphat (ATP) -Gehalt wurde mit Hilfe einer Luciferase-basierenden Messung ermittelt. Der relative ATP-Gehalt wurde in unbehandelten EC d4 an Tag sechs der Differenzierung gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, standard deviation) von einem Experiment, welches in Triplikaten durchgeführt wurde ($n = 1$, $N = 3$). *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; ***, $p \leq 0,001$. **(B)** Vergleich der mitochondrialen basalen Respiration, freien respiratorischen Kapazität, ATP Produktion und nicht-mitochondrialen Respiration 48 h nach einer Doxo-Pulsbehandlung von mESC und EC d4 mittels *Seahorse* Messung und dem Mito Stress Kit. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) von einem Experiment mit $N = 5-13$. *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$, ***, $p \leq 0,001$. EC: Endothel-ähnliche Zellen, OCR: Sauerstoffverbrauchsrate, ANOVA: *Analysis of variance*.

Zusammenfassend deuten die Daten auf eine selektiv erhöhte Suszeptibilität der differenzierten EC gegenüber durch Doxorubicin ausgelöste Schädigungen der Mitochondrien in Progenitor EC hin.

3.2.2.4 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren

Nachdem gezeigt wurde, dass in Abhängigkeit der Konzentration der Doxorubicin-Pulsbehandlung der weitere Differenzierungsprozess der EC d4 bzgl. Endothelzellcharakteristika und -funktionen beeinflusst ist, wurde die Genexpression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren auf mRNA-Ebene nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung analysiert. Die untersuchten Gene gehören zu Prozessen oxidativer Stressantworten (Antioxidative Prozesse), der Autophagie, der Apoptose und der DNA-Reparatur. In den meisten Fällen wurde eine signifikante Veränderung der Genexpression in differenzierten EC beobachtet, deren Progenitor EC (EC d4) mit der hohen Konzentration von 0,2 μ M Doxorubicin pulsbehandelt wurden (Abbildung 3.21). Die Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC führte in den differenzierten EC zu einer signifikanten Hochregulation von Genen, die an der Regulation der Autophagie (Autophagie-zugehöriges 7 Homolog (Atg7, *autophagy related 7 homolog*)) und der Apoptose (B-Zell Lymphoma 2 (Bcl2, *B-cell lymphoma 2*) und Caspase 2 (Casp2)) beteiligt sind. Die relative mRNA Expression der Thioredoxin Reduktase 1 (Txnrd1, *thioredoxin reductase 1*), die antioxidativen Mechanismen zugeordnet wird, wurde nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung ebenfalls signifikant hochreguliert.

Im Gegensatz zu dieser nahezu einheitlichen Tendenz einer Hochregulation der untersuchten Gene der Autophagie, Apoptose und von antioxidativen Mechanismen, war die Expression der Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, unterschiedlich beeinflusst. So wurde bei den Genen *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1* (Ercc1) und *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1* (Xrcc1) eine signifikante Hochregulation der mRNA Expression nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung beobachtet. Das Schadens-spezifische DNA-bindende Protein 2 (Ddb2, *damage-specific DNA binding protein 2*) und die (DNA) Topoisomerase II- α (TopoII α) zeigten hingegen eine signifikant verminderte mRNA Expression in den aus EC d4 differenzierten EC.

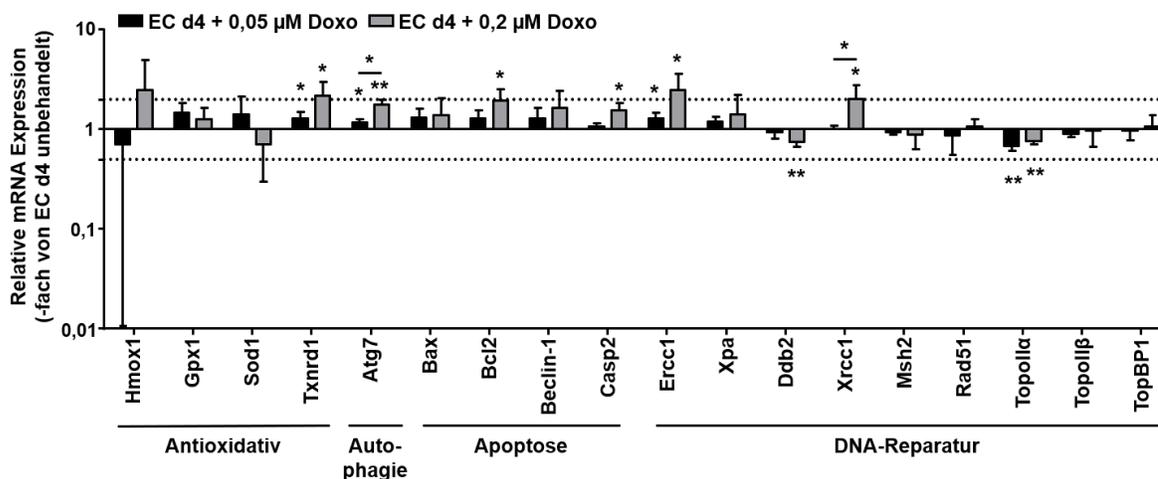


Abbildung 3.21: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitäts-zugehöriger Markergene.

Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier (EC d4) der Differenzierung mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin (Doxo) für 2 h pulsbehandelt. Nach einer post-Inkubationsperiode von 48 h wurde die mRNA der Zellen mittels quantitativer *real-time* PCR Analyse untersucht. Die analysierten Gene sind an Antioxidativen-, Autophagie-, Apoptose- und DNA-Reparatur-bezogenen Prozessen beteiligt. Die relative mRNA Expression der Gene wurde in unbehandelten EC d4 gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei bis vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden ($n = 3-4$, $N = 2$). Student's t-Test, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ verglichen zu unbehandelten EC d4. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. EC: Endothel-ähnliche Zellen, PCR: Polymerasekettenreaktion.

Die Beobachtung, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC die mRNA Expression verschiedener Suszeptibilitätsfaktoren, die bei der Regulation von antioxidativen Prozessen, Autophagie, Apoptose und der DNA-Reparatur beteiligt sind, beeinflusst, deutet auf bleibende pleiotrope Änderungen der Genexpression in differenzierten EC hin.

3.2.2.5 Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in mESC, Progenitor EC und EC

Nachdem der Einfluss von Doxorubicin auf das Differenzierungspotential von Progenitor EC untersucht wurde, wird im Folgenden die differenzierungsabhängige zelluläre Reparaturfähigkeit gegenüber induzierten DNA-Schäden analysiert. Während der DNA-Schadensantwort (DDR, *DNA-damage response*) wird das Histon H2AX an seinem Serin 139 durch die Proteinkinasen ATM/*ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related* (ATR) phosphoryliert (Harper and Elledge, 2007). Das phosphorylierte H2AX (γ H2AX) dient als prototypischer Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) (Rogakou *et al.*, 1998; Olive, 2004; Lobrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013). Auch das P53-bindende Protein 1 (53BP1) stellt einen weiteren DNA-DSB-Indikator dar (Schultz *et al.*, 2000;

Mochan *et al.*, 2004; Panier and Boulton, 2014), weil es als Folge eines DSBs an das Chromatin nahe des DNA-Schadens bindet. Mittels immunzytochemischer Färbung von γ H2AX- und 53BP1-Foci wurde die Induktion von DSBs und der DDR in mESC, Progenitor EC (EC d4) und differenzierten EC (EC d6), die mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin für 2 h pulsbehandelt wurden, zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen mit einem weiteren Genotoxin, der ionisierenden Strahlung (IR, *ionizing irradiation*) als prototypische Noxe für die Induktion von DSBs und die Aktivierung der DDR (Vignard *et al.*, 2013), behandelt.

Die Quantifizierung der nukleären Foci zeigte in mESC nach der 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung eine Zeit- und Dosis-abhängige Zunahme in der Anzahl der γ H2AX-, 53BP1- und der kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci (Abbildung 3.22 A und Abbildung 3.22 B). Bei der Dosis-abhängigen Zunahme von γ H2AX-Foci pro Zelle unmittelbar (0 h) nach einer 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,5 μ M wurde die höchste Anzahl an Foci und damit an DSBs beobachtet. 6 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung wurde bei jeder untersuchten Konzentration eine Zunahme der γ H2AX-Foci pro Zelle beobachtet, welche sich bei den hohen zytotoxischen Konzentrationen von 0,5 μ M und 1 μ M signifikant von unbehandelten mESC unterschied. Eine Zunahme der Anzahl an kolokalisierten Foci 6 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung zeigte sich nur bei einer Behandlung mit 0,05 μ M nicht. 48 h nachdem mESC mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen pulsbehandelt wurden, war bis auf bei den mit 0,05 μ M behandelten mESC, die maximale Anzahl an Foci zu beobachten. Die geringere Anzahl an Foci 48 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,05 μ M, im Vergleich zur Foci-Anzahl direkt nach der Pulsbehandlung (0 h), reflektiert die Reparaturfähigkeit der DSBs. Die zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen von 0,5 μ M und 1 μ M wiesen zu diesem Zeitpunkt signifikante Zunahmen in der Anzahl der untersuchten Foci im Vergleich zu unbehandelten mESC auf. Die Anzahl der 53BP1-Foci war bei diesen Konzentrationen zusätzlich signifikant gegenüber der Foci-Anzahl pro Zelle 0 h und 6 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung erhöht. Bei der Kontrollbehandlung von mESC mit IR wurde hingegen eine Zeit-abhängige Abnahme in der Anzahl an γ H2AX- und kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci beobachtet (Abbildung 3.22 A und Abbildung 3.22 B), was die Reparaturfähigkeit der DSBs reflektiert. Die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle 30 min nach der Bestrahlung war signifikant gegenüber unbehandelten mESC erhöht. Somit besitzen mESC eine DNA-Reparaturkapazität für IR-induzierte DSBs und Doxorubicin-induzierte DSBs von geringen zytotoxischen Konzentrationen von 0,05 μ M.

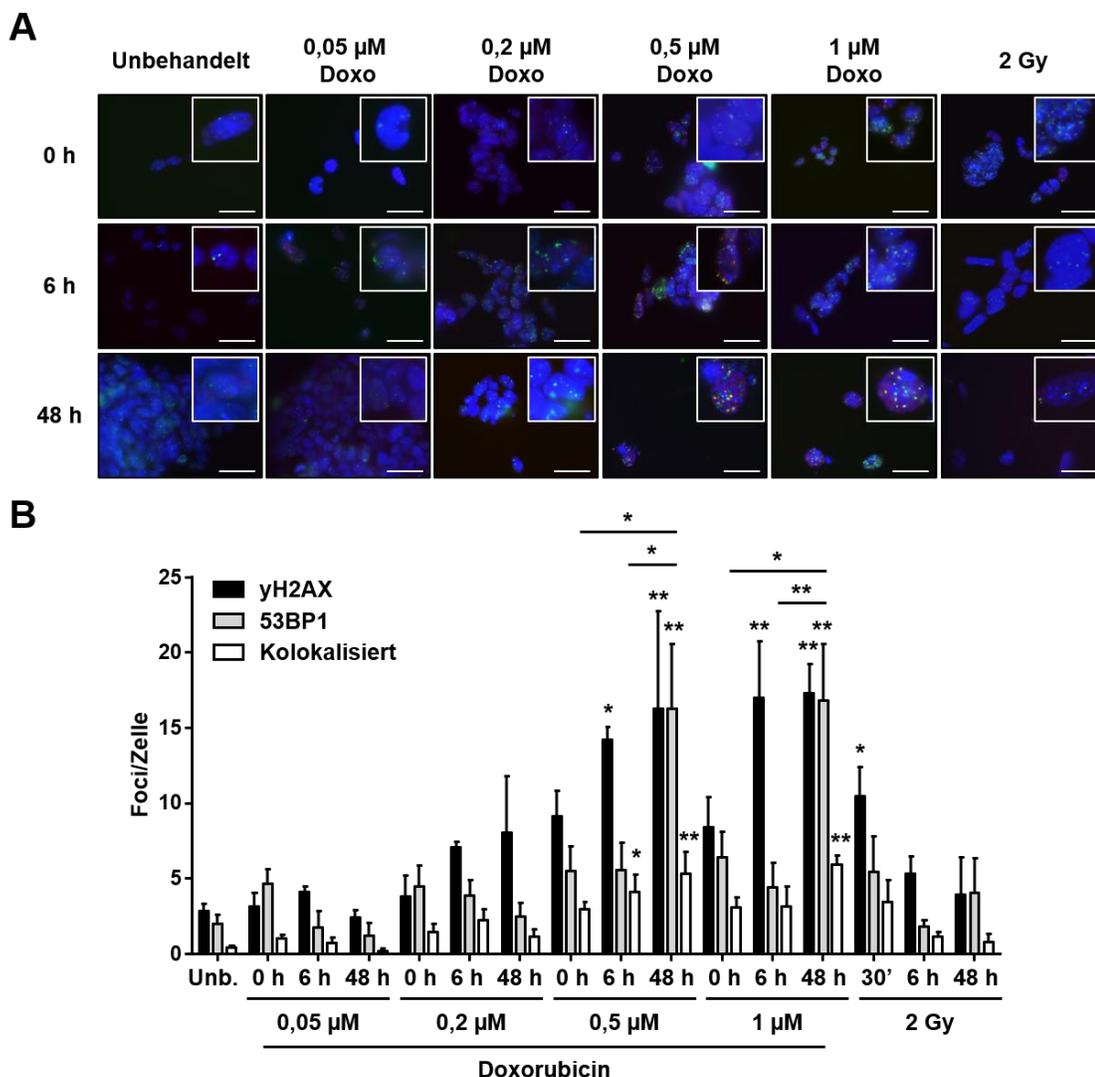
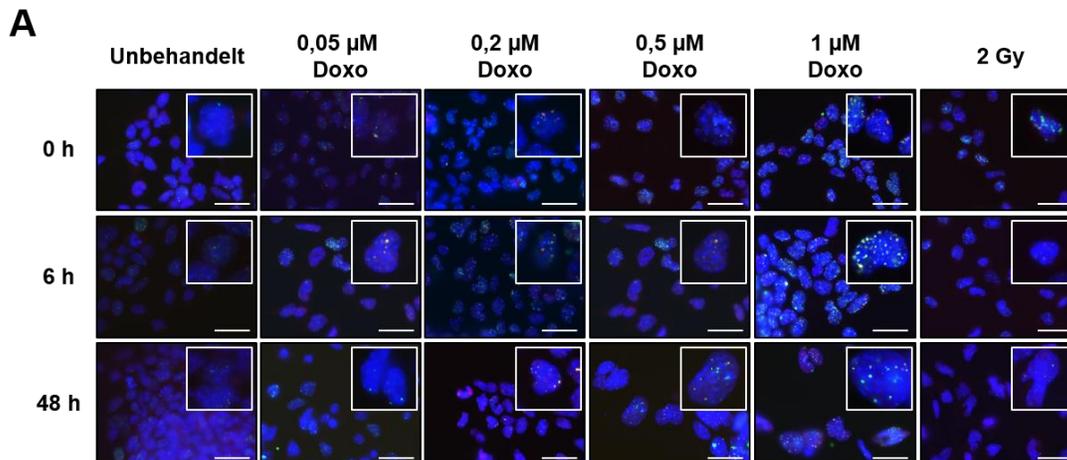


Abbildung 3.22: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in mESC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC) wurden 24 h nach der Aussaat für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin behandelt. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung (IR, 2 Gy) behandelt. Die Analyse der DSBs erfolgte nach einer post-Inkubationsperiode von 0 h (IR: 30 min), 6 h und 48 h über die Ermittlung der Anzahl an nukleären γ H2AX- und 53BP1-Foci mittels immunzytochemischer Färbung. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). γ H2AX-Foci sind in grün (FITC-Färbung) und 53BP1-Foci in rot (TRITC-Färbung) dargestellt. Eine Kolokalisierung ist als gelber Foci sichtbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. 100 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μ m. **(B)** Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) der Anzahl an γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 50 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 3$, $N \geq 50$). One-way ANOVA, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$ verglichen zur Kontrolle von unbehandelten mESC. Unb.: Unbehandelt, DPAI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat, γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert, 53BP1: P53-bindendes Protein 1, ANOVA: *Analysis of variance*.

Bei Progenitor EC (EC d4) wurde eine Dosis-abhängige Zunahme bis 0,5 μM Doxorubicin in der Anzahl der γH2AX -, 53BP1- und der kolokalisierten $\gamma\text{H2AX}/53\text{BP1}$ -Foci pro Zelle nach einer post-Inkubationsperiode von 0 h und 48 h beobachtet (Abbildung 3.23 A und Abbildung 3.23 B). γH2AX -Foci waren nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit zytotoxischen Konzentrationen von 0,5 μM und 1 μM , für alle Zeitpunkte signifikant erhöht, sowie 6 h nach einer Pulsbehandlung mit 0,2 μM und 30 min nach der Bestrahlung mit 2 Gy. Die größte Anzahl an γH2AX -Foci wurde 6 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit 1 μM Doxorubicin ermittelt. Nach einer 48 h post-Inkubationsperiode wurde bei Progenitor EC, die mit 0,05 μM , 0,2 μM und 1 μM Doxorubicin sowie mit 2 Gy behandelt wurden, eine verringerte Anzahl an residualen γH2AX -, 53BP1- und kolokalisierten Foci ermittelt. Die verringerte Foci-Anzahl im Vergleich zur Foci-Anzahl unmittelbar (0 h) nach der Genotoxin-Behandlung spiegelt die Reparatur von DSBs wider. Die effektivste Reparatur von DSBs erfolgte nach der Bestrahlung. Somit weisen Progenitor EC eine DNA-Reparaturkapazität für IR-induzierte DSBs sowie für Doxorubicin-induzierte DSBs, mit Ausnahme der Konzentration von 0,5 μM , auf.



B

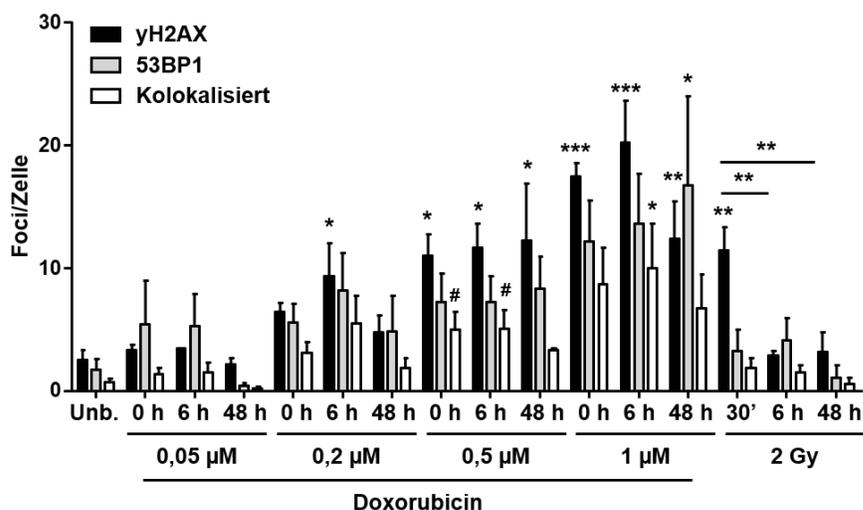


Abbildung 3.23: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in Progenitor EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung (EC d4) für 2 h mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen behandelt. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen mit 2 Gy ionisierender Strahlung (IR) behandelt. Über die Ermittlung der Anzahl an nukleären γ H2AX- und 53BP1-Foci mittels immunzytochemischer Färbung erfolgte die Analyse der DSBs nach einer post-Inkubationsperiode von 0 h (IR: 30 min), 6 h und 48 h. **(A)** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). γ H2AX-Foci sind in grün (FITC-Färbung) und 53BP1-Foci in rot (TRITC-Färbung) dargestellt. Eine Kolokalisierung ist als gelber Foci sichtbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. 100 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μ m. **(B)** Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) der Anzahl an γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci von zwei (0,5 μ M) bzw. drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 50 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 2-3$, $N \geq 50$). *One-way ANOVA*, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$; #, $p \leq 0,07$ verglichen zur Kontrolle von unbehandelten EC d4. Unb.: Unbehandelt, DPAI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat, γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert, 53BP1: P53-bindendes Protein 1, ANOVA: *Analysis of variance*.

Die Quantifizierung der nukleären Foci von terminal differenzierten EC (EC d6) zeigte bis auf wenige Ausnahmen, ebenfalls wie bei mESC, eine Zeit- sowie Dosis-abhängige Zunahme in der Anzahl der untersuchten Foci nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung (Abbildung 3.24 A und Abbildung 3.24 B). Die höchste Anzahl an Foci pro Zelle wurde 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 1 μ M gemessen. Wie bei den Progenitor EC wurde nach der Bestrahlung eine signifikante Zeit-abhängige Abnahme in der Anzahl der Foci, welche indikativ für eine Reparatur der DSBs ist, beobachtet. Signifikant erhöht waren zudem die Anzahl der Foci pro Zelle, verglichen zu jeweils unbehandelten EC d6, 48 h nach einer Pulsbehandlung mit 0,5 μ M und 1 μ M Doxorubicin, sowie 30 min nach einer Bestrahlung mit 2 Gy und 6 h nach einer 1 μ M Doxorubicin-Pulsbehandlung. Eine Reparatur von Doxorubicin-induzierten DSBs anhand einer verringerten Anzahl an Foci 48 h nach

einer Pulsbehandlung konnte nicht ermittelt werden. Somit scheinen EC d6 nur IR-induzierte DSBs reparieren zu können und nicht die hier untersuchten Doxorubicin-induzierten DSBs.

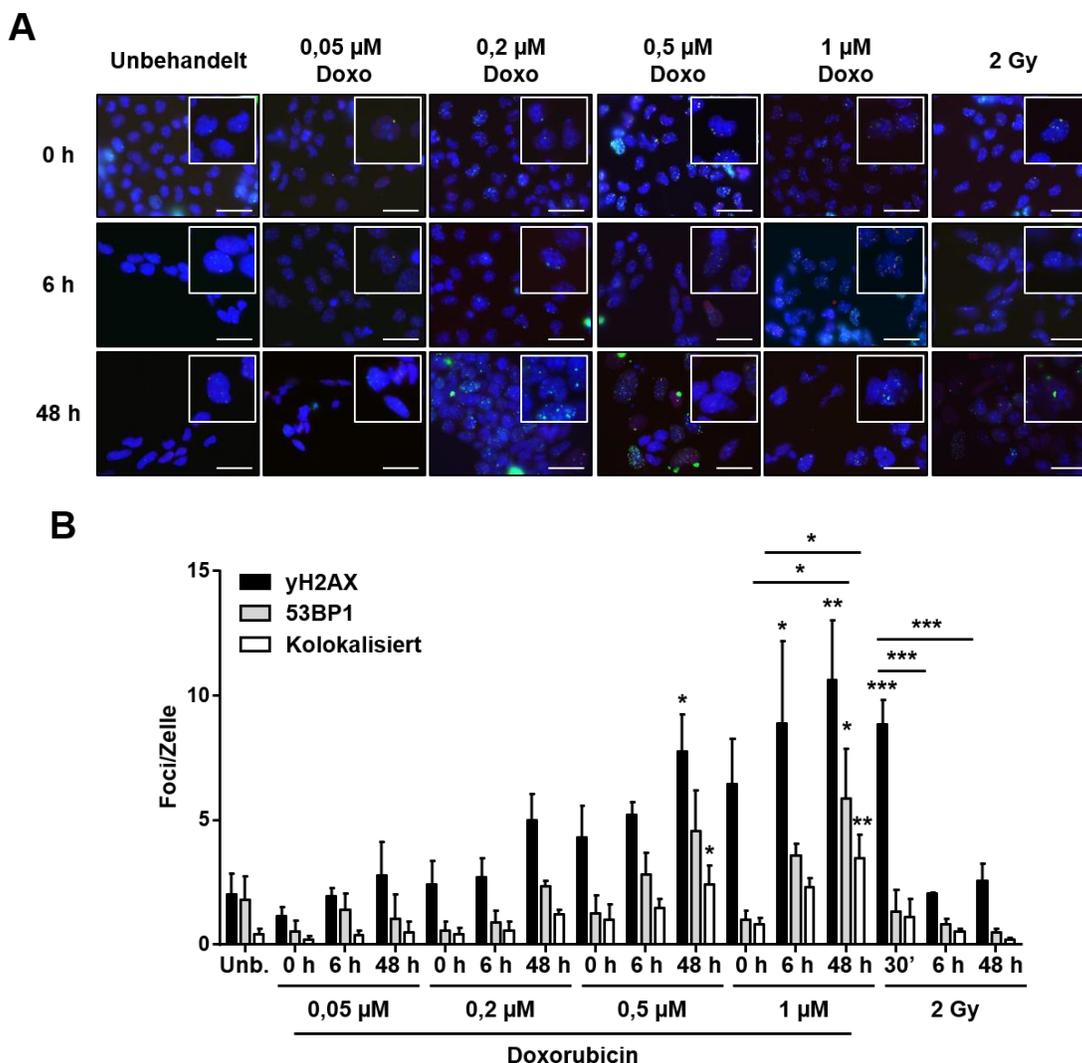
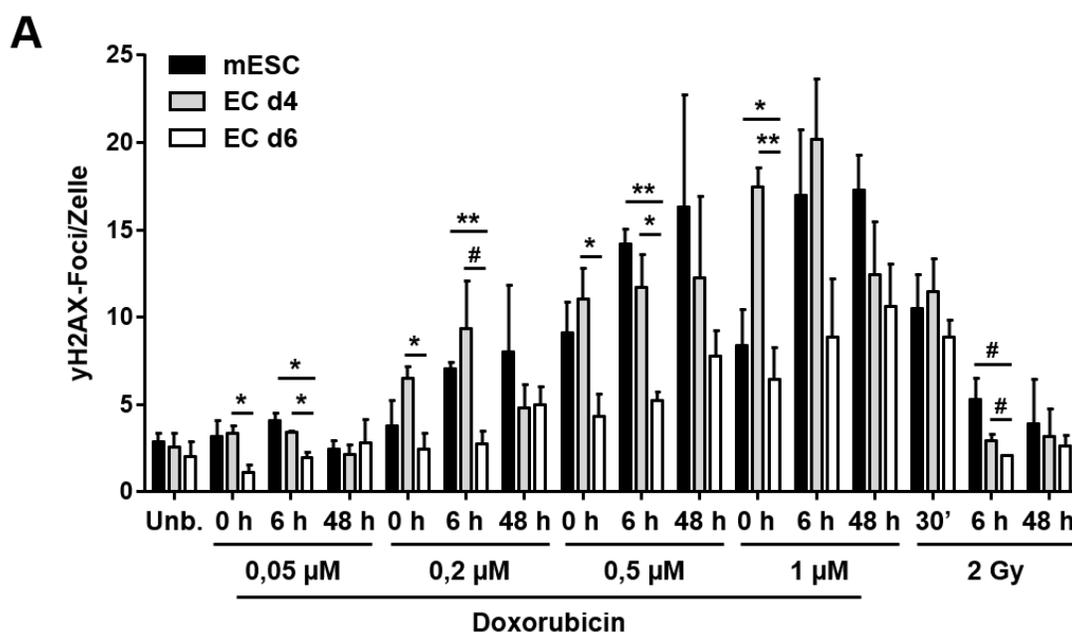


Abbildung 3.24: Fluoreszenzbasierte Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in differenzierten EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Endothel-ähnliche Zellen (EC) wurden an Tag sechs der Differenzierung (EC d6) für 2 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Doxorubicin behandelt. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung (IR, 2 Gy) behandelt. Die Analyse der DSBs erfolgte nach einer post-Inkubationsperiode von 0 h (IR: 30 min), 6 h und 48 h über die Ermittlung der Anzahl an nukleären γ H2AX- und 53BP1-Foci mittels immunzytochemischer Färbung. **(A)** Gezeigt sind repräsentative Fluoreszenzaufnahmen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). γ H2AX-Foci sind in grün (FITC-Färbung) und 53BP1-Foci in rot (TRITC-Färbung) dargestellt. Eine Kolokalisierung ist als gelber Foci sichtbar. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. 100 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μ m. **(B)** Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) der Anzahl an γ H2AX-, 53BP1- und kolokalisierten Foci von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 50 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 3$, $N \geq 50$). One-way ANOVA, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$ verglichen zur Kontrolle von unbehandelten EC d6. Unb.: Unbehandelt, DPAl: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, TRITC: Tetramethylrhodaminisothiocyanat, γ H2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert, 53BP1: P53-bindendes Protein 1, ANOVA: *Analysis of variance*.

Abbildung 3.25 zeigt die vergleichende Analyse der Suszeptibilität von mESC und aus mESC differenzierten EC gegenüber den Genotoxinen Doxorubicin und IR sowie ihre DNA-Reparaturfähigkeit von DSBs anhand der Anzahl von γ H2AX-Foci (Abbildung 3.25 A) sowie kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci (Abbildung 3.25 B). Die Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an basal vorhandenen γ H2AX- und kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci, auch wenn mESC geringfügig mehr γ H2AX-Foci aufwiesen. Direkt nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung (0 h) zeigten Progenitor EC (EC d4) eine höhere Anzahl an γ H2AX- und kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci als mESC und terminal differenzierte EC (EC d6). Bis auf wenige Ausnahmen wiesen EC d4 auch zu den analysierten Zeitpunkten nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung die höchste Anzahl der untersuchten Foci auf. Die höchste Anzahl an Foci pro Zelle wurde 6 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 1 μ M in EC d4 ermittelt. Diese Anzahl unterschied sich signifikant von der gemessenen Anzahl an γ H2AX-Foci in EC d6 und zusätzlich zu der Anzahl kolokalisierter Foci in mESC und EC d6. Eine Reduktion der Anzahl an Foci von 6 h nach einer Genotoxin-Behandlung, sowohl mit Doxorubicin als auch IR, zu 48 h nach Behandlung und damit eine indikative Reparatur von DSBs, wurde in allen Bedingungen ausschließlich für EC d4 beobachtet. mESC zeigten diese Reparaturfähigkeit bei hohen zytotoxischen Konzentrationen von 0,5 μ M und 1 μ M Doxorubicin nicht. Bei EC d6 wurde nur eine Reparatur von DSBs anhand einer geringeren Anzahl an Foci 48 h nach IR beobachtet.



B

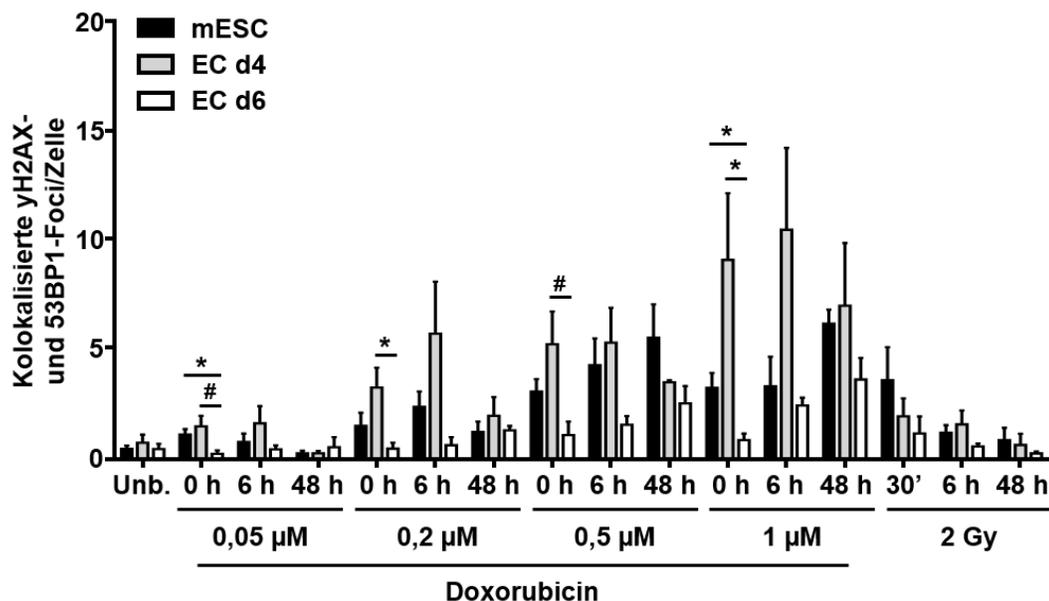


Abbildung 3.25: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Bildung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in mESC und aus mESC differenzierten EC.

Embryonale Stammzellen der Maus (mESC) und daraus differenzierte Endothel-ähnliche Zellen (EC; EC d4 und EC d6) wurden für 2 h mit unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen behandelt. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen ebenfalls mit 2 Gy ionisierender Strahlung (IR) behandelt. Die Behandlung von mESC erfolgte 24 h nach Aussaat, die von Progenitor EC an Tag vier der Differenzierung (EC d4) und von differenzierten EC an Tag sechs (EC d6). Mittels immunzytochemischer Färbung erfolgte die Analyse der DNA-Doppelstrangbrüche nach einer post-Inkubationsperiode von 0 h (IR: 30 min), 6 h und 48 h über die Ermittlung von (A) γH2AX-Foci und (B) kolokalisierten nukleären γH2AX- und 53BP1-Foci. Gezeigt sind Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwerts (SEM, *standard error of the mean*) von zwei (EC d4, 0,5 μM) bzw. drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils über 50 Zellen pro Experiment ausgewertet wurden ($n = 2-3$, $N \geq 50$). Student's t-Test, *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; #, $p \leq 0,07$. d: Tag, Unb.: Unbehandelt, γH2AX: *H2A histone family, member X* an Serin 139 phosphoryliert, 53BP1: P53-bindendes Protein 1.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mESC, Progenitor EC und terminal differenzierte EC trotz ähnlicher basaler Ausgangslage eine unterschiedliche Suszeptibilität sowie Reparaturfähigkeit gegenüber Genotoxinen aufweisen. Während die IR-induzierten DSBs von allen drei Zelltypen repariert wurden, waren ausschließlich EC d4 in der Lage die bis zur höchsten Doxorubicin-Konzentration induzierten DSBs zu reparieren. mESC konnten nur die induzierten DSBs von geringen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen reparieren. Terminal differenzierte EC konnten in der vorliegenden Arbeit ausschließlich IR-induzierte DSBs reparieren.

3.3 Endothelzellendifferenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen

Um auch Differenzierungsmodelle in einem humanisierten System untersuchen zu können, sollte eine Endothelzellendifferenzierung von hiPSC etabliert werden. Dazu wurde ein *in vitro* Differenzierungsmodell, basierend auf der Grundlage des Protokolls von Liu und Kollegen (Liu *et al.*, 2016a), benutzt und für die verwendete humane induzierte pluripotente Stammzelllinie b4 angepasst. Die Stammzelllinie b4 (Wang and Adjaye, 2011) wurde von dem Institut für Stammzellforschung und Regenerative Medizin Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Fortan werden die verwendeten Zellen der Stammzelllinie b4 als hiPSC bezeichnet.

Das Differenzierungsprotokoll ist schematisch in Abbildung 3.26 dargestellt. Es wurden mit Wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel (Matrigel GFR, *growth factor reduced matrigel*) -beschichtete 6-Well⁺ Platten verwendet. Zum besseren Anwachsen wurden hiPSC in Stammzell-Medium mit *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase* (ROCK) -Inhibitor (Y-27632) und mit einer Zelldichte von $0,3 \times 10^5$ Zellen/6-Well ausgesät. Nach einer Anwachszeit von 24 h wurde neues Stammzell-Medium hinzugegeben. Auch die direkte Differenzierung von hiPSC wurde durch die Zugabe definierter Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Verbindungen erreicht. Ab Tag zwei der Differenzierung wurden mesodermale Zellen durch einen Mediumwechsel zu DMEM/F12 mit GSKi generiert. Anschließend wurde durch einen Mediumwechsel zu Endothelzellen Basalmedium (ECBM, *endothelial cell basal medium*) mit den Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF das endotheliale Schicksal der Zellen geprägt. Humane Endothel-ähnliche Zellen (hEC) wurden nach sechs Tagen der Differenzierung aus hiPSC abgeleitet. Im Folgenden werden die generierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen als hEC bezeichnet.

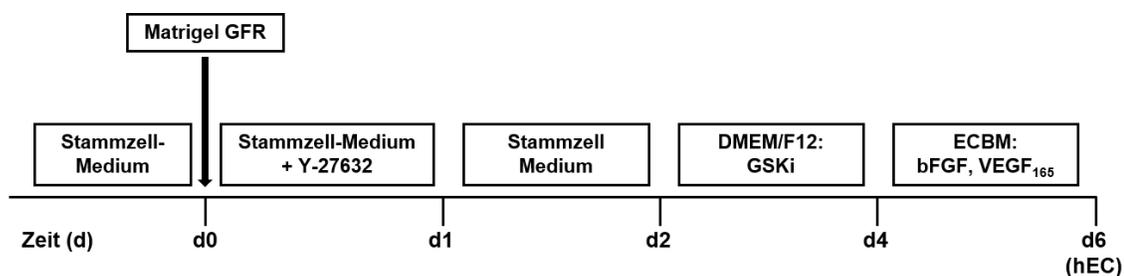


Abbildung 3.26: Verwendetes Protokoll zur Differenzierung von hiPSC zu hEC.

Schematische Darstellung des angepassten Differenzierungsprotokolls nach Liu und Kollegen (Liu *et al.*, 2016a) um humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) in humane Endothel-ähnliche Zellen (hEC) zu differenzieren. d: Tag, Matrigel GFR: *growth factor reduced matrigel*, Y-27632: ROCK-Inhibitor, ROCK: *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*, DMEM/F12: Mesoderm-Induktionsmedium, GSKi: Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitor, bFGF: *basic fibroblast growth factor*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*, ECBM: *endothelial cell basal medium* als Endothelzell-Induktionsmedium.

3.3.1 Charakterisierung der differenzierten Endothelzellen

Der Differenzierungsprozess von hiPSC in hEC ging wie erwartet mit deutlichen morphologischen Änderungen einher (Abbildung 3.27 A). An Tag sechs der Differenzierung (d6) zeigten die differenzierten hEC eine für Endothelzellen typische kopfsteinpflasterförmige Morphologie, wie sie auch bei humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) zu finden ist (Abbildung 3.27 B).

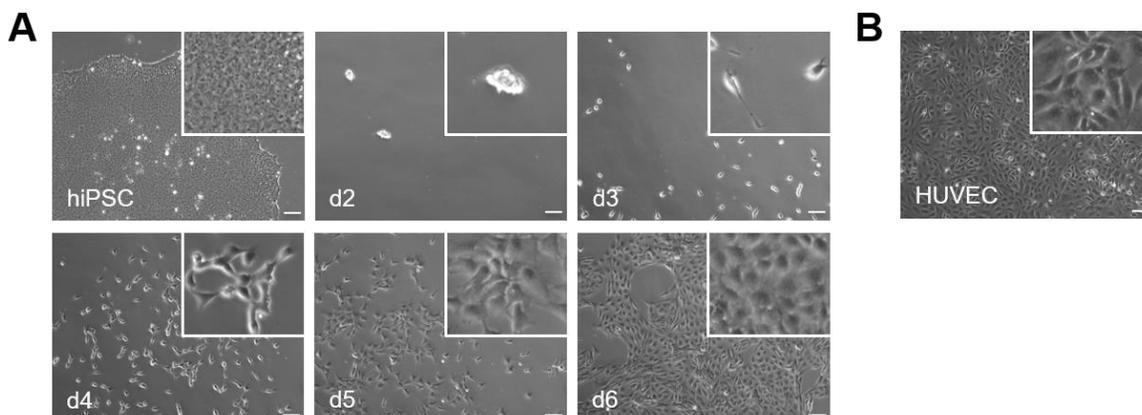


Abbildung 3.27: Morphologie während der Endothelzeldifferenzierung von hiPSC.

(A) Veränderung der Morphologie im Differenzierungsverlauf von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) zu Endothel-ähnlichen Zellen (hEC). Die Abbildungen zu Tag zwei bis vier (d2–d4) zeigen die Morphologie der Zellen nach der Mesoderm-Induktion, während die Abbildungen zu Tag fünf und sechs (d5, d6) die der Endothelzell-Induktion zeigen. 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . (B) Phänotyp von humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) zum morphologischen Vergleich. 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . d: Tag.

Zur weiteren Charakterisierung der differenzierten hEC wurde zunächst die Expression von Stamm- und Endothelzell-zugehörigen Markern auf mRNA-Ebene untersucht. Mittels quantitativer *real-time* PCR Analyse wurde die Genexpression in hiPSC, terminal differenzierten hEC an Tag sechs der Differenzierung (hEC d6) und zu Kontrollzwecken in primären HUVEC analysiert. Die relative mRNA Expression der Stammzellfaktoren Nanog und Oct3/4 war sowohl in hEC d6 als auch in HUVEC im Vergleich zu hiPSC stark herunterreguliert (Abbildung 3.28 A), was für einen differenzierten Zustand der hEC spricht. Die erhöhte relative mRNA Expression des mesodermalen Progenitorfaktors Flk1 in hEC d6 unterstützt diese Aussage (Abbildung 3.28 B). Des Weiteren zeigten hEC d6, sowie HUVEC, eine stark erhöhte relative mRNA Expression der Endothelzellmarker Pecam1, VE-Cadherin (VE-Cad) und von Willebrand Faktor (vWF) (Abbildung 3.28 B). Zudem war der arterielle Endothelzellmarker Ephrin B2 (Efnb2) deutlich stärker als der venöse Marker

Ephrin Typ-B Rezeptor 4 (Ephb4) in hEC d6 exprimiert (Abbildung 3.28 C). Als weitere Endothelzell-zugehörige Marker wurde die Expression des *tight junction* Markers Claudin5 und des *gap junction* Markers Connexin40 untersucht. Diese wurden im Vergleich zu hiPSC in hEC d6 erhöht exprimiert (Abbildung 3.28 D).

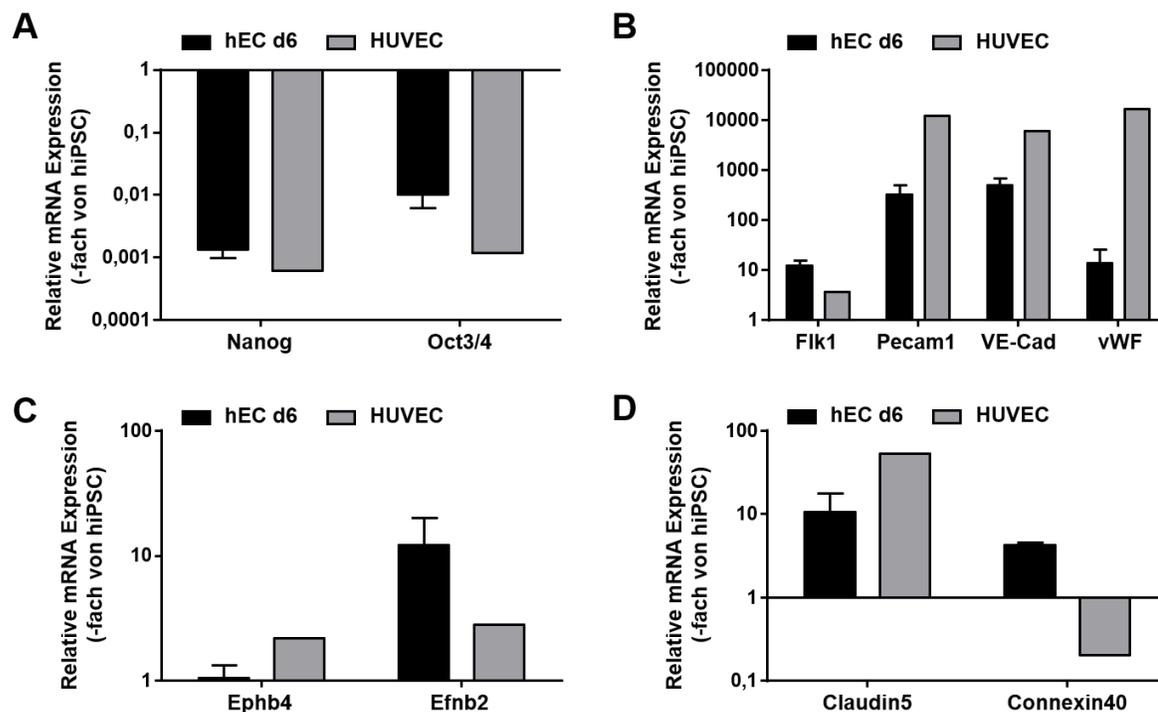


Abbildung 3.28: Charakterisierung der humanen differenzierten Endothel-ähnlichen Zellen auf mRNA-Ebene.

Humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) und differenzierte humane Endothel-ähnliche Zellen (hEC) an Tag sechs ihrer Differenzierung (hEC d6) wurden auf die Expression verschiedener Markergene auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *real-time* PCR (qRT-PCR) Analyse untersucht. Als Kontrolle wurde die isolierte mRNA von primären humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) mitgeführt (n = 1). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten hiPSC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden (n = 3, N = 2). **(A)** Relative mRNA Expression der Stammzellfaktoren Nanog und Oct3/4. **(B)** qRT-PCR Analyse der mRNA Expression des mesodermalen Progenitorfaktors Flk1, und der Endothelzellmarker Pecam1, VE-Cadherin (VE-Cad), und vWF. **(C)** mRNA Expression des venösen Endothelzellmarkers Ephb4 und des arteriellen Markers Efnb2. **(D)** qRT-PCR Analyse der mRNA Expression des *tight junction* Markers Claudin5 und des *gap junction* Markers Connexin40. PCR: Polymerasekettenreaktion, Nanog: *nanog homeobox*, Oct3/4: *octamer binding transcription factor 3/4*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, vWF: von Willebrand Faktor, Ephb4: Ephrin Typ-B Rezeptor 4, Efnb2: Ephrin B2.

Mittels immunzytochemischer Färbung konnte gezeigt werden, dass differenzierte hEC den Stammzellmarker Oct4 auch auf Proteinebene nicht exprimierten, die Endothelzellmarker Pecam1 und VE-Cadherin hingegen deutlich nachweisbar waren (Abbildung 3.29). hiPSC

zeigten wie zu erwarten eine Proteinexpression des Stammzellmarkers Oct4 auf, aber keine der Endothelzellmarker.

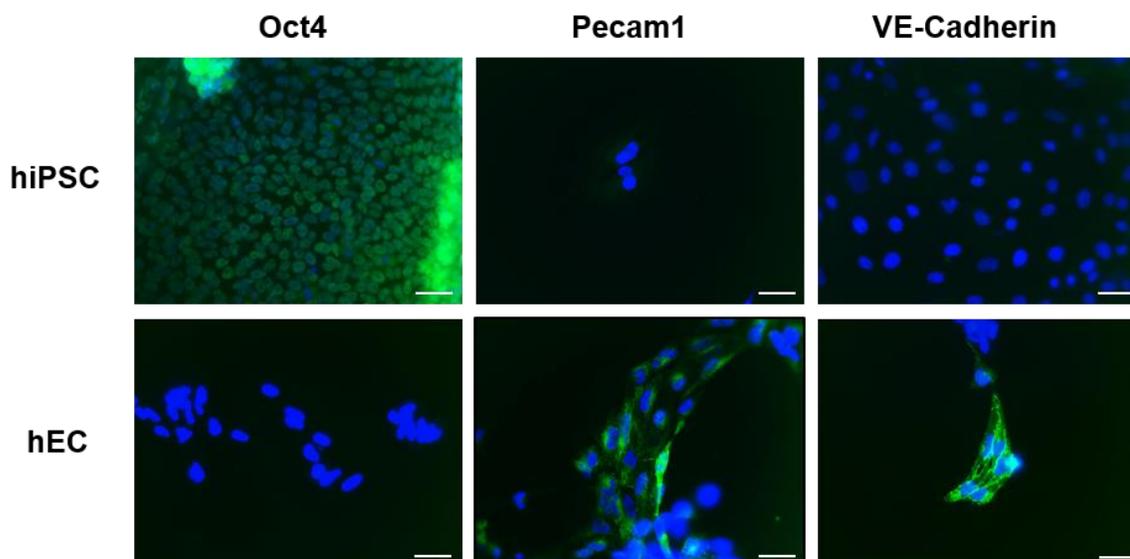


Abbildung 3.29: Charakterisierung der differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen auf Proteinebene.

Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression des Stammzellmarkers Oct4 sowie der Endothelzellmarker Pecam1 und VE-Cadherin in humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und terminal differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen (hEC) an Tag sechs der Differenzierung. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blaue Farbe) und die spezifischen Proteine wurden mittels FITC-Färbung (grüne Farbe) gezeigt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen aus drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$). 40 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 50 μm . Oct4: *octamer binding transcription factor 4*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

Diese Daten zeigen, dass das verwendete Differenzierungsprotokoll für eine erfolgreiche Endothelzellendifferenzierung von hiPSC in hEC genutzt werden kann.

3.3.2 Basale Expression von Suszeptibilitätsfaktoren in humanen Endothel-ähnlichen Zellen

Um Aussagen über die differentielle Expression von Genen in undifferenzierten und differenzierten Zellen zu treffen, bietet sich in einem ersten Schritt die Analyse der Genexpression mittels Microarray an. Bei diesem *high throughput* Verfahren können mit geringem Probenvolumen über 10.000 Gene auf ihre Expression untersucht werden. Bei Betrachtung der exprimierten Gene in hiPSC und hEC mittels *heatmap* unterschieden sich 46 Gene in den beiden Zelltypen um den Faktor 100 (Abbildung 3.30). Des Weiteren konnte aus der *heatmap* abgelesen werden, dass ca. drei Viertel der Gene über den Faktor 100 in

hEC erhöht (rot eingefärbt) exprimiert wurden. Ca. ein Viertel der Gene wurde um den Faktor 100 verringert (grün eingefärbt) in hEC exprimiert. Zu den in hEC im Vergleich zu hiPSC deutlich erhöht exprimierten Genen gehörten beispielsweise das Endothelzell-spezifische Molekül 1 (ESM1) und *Ankyrin Repeat Domain 1* (ANKRD1), welches eine wichtige Rolle bei der Endothelzell-Aktivierung übernimmt. Auch diverse Homöobox Proteine (HOXC6, HOXB3, HOXB2), die in der Entwicklung involviert sind und *R-Spondin 3* (RSPO3), ein Schlüsselregulator der Angiogenese wurden deutlich erhöht exprimiert. *SRY* (*Sex Determining Region Y*)-*Box 17* (SOX17), welches eine wichtige Rolle bei der postnatalen vaskulären Entwicklung sowie der Entwicklung von Arterien spielt, wurde ebenfalls erhöht in hEC exprimiert. Die erhöhte SOX17 Expression wurde durch die bereits in Abbildung 3.28 C gezeigte erhöhte Expression des arteriellen Markers Efnb2 bekräftigt.

Die Stammzellfaktoren Nanog und Oct4 (POU5F1), die eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz übernehmen, wurden in hEC im Vergleich zu hiPSC deutlich verringert exprimiert. Dies stimmt mit den bereits generierten Daten aus Abbildung 3.28 A überein. Auch der *apelin receptor early endogenous ligand* (LOC100506013), der für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von humanen embryonalen Stammzellen (hESC) verantwortlich ist, wurde in hEC wie zu erwarten verringert exprimiert. Somit konnten die bereits gezeigten Daten aus Abbildung 3.28 durch die Microarray-Daten bestätigt werden. Zusätzlich konnten weitere sehr stark bzw. schwach exprimierte Gene identifiziert werden, welche die erfolgreiche Endothelzelldifferenzierung der hiPSC festigen.

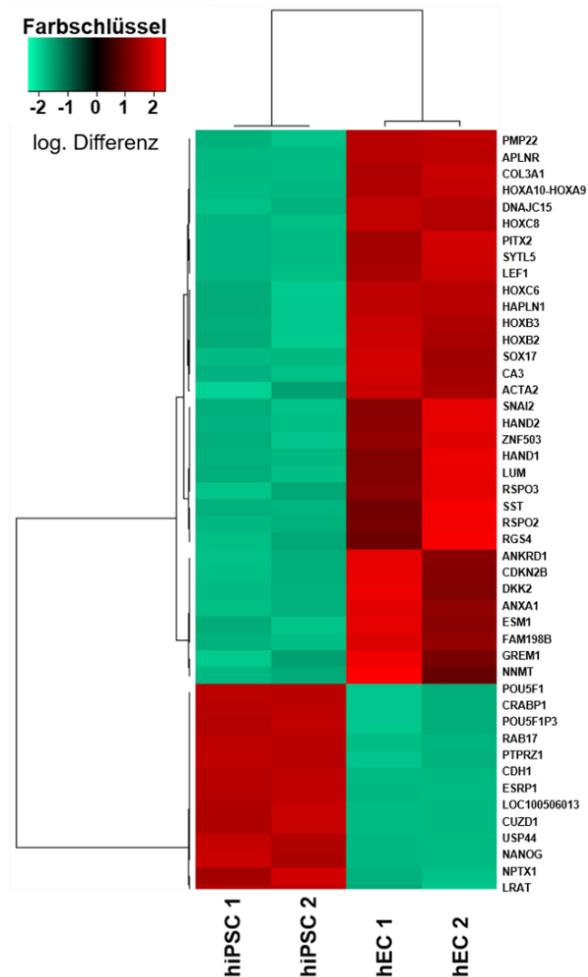


Abbildung 3.30: Mikroarray Analyse von HUVEC, hiPSC und hEC.

Heatmap der Gene, die sich in undifferenzierten humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Zellen (hEC) um den Faktor ≥ 100 unterscheiden. Die gewonnenen Daten aus der Microarray Analyse wurden einer Hintergrundkorrektur unterzogen, normalisiert und in eine logarithmische Skala (auf der Basis von 10) übertragen. Der Farbschlüssel zeigt die Expressionsstärke der Gene auf. Eine rote Farbe steht dabei für einen erhöhten Expressionswert eines Gens und wird durch den Farbgradienten von Schwarz nach Rot dargestellt. Eine verringerte Expression eines Gens wird entsprechend aus dem Farbgradienten von Schwarz nach Grün dargestellt, bei dem Grün für einen verringerten Expressionswert eines Gens steht. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten ($n = 2$), die einzeln abgebildet wurden (hiPSC 1 und hiPSC 2 sowie hEC 1 und hEC 2). Log.: logarithmisch.

Die Untersuchung der basalen Genexpressionsmuster von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren, die in Stress-induzierbaren Signalwegen, dem Zelltod, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur beteiligt sind, wurde mittels 96-Well basierenden *real-time* PCR-Array (Fritz *et al.*, 2011) durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, genauere Aussagen über Veränderungen der Genexpression der oben genannten

Faktoren in differenzierten hEC, im Vergleich zu hiPSC, zu ermöglichen. Es wurden ausschließlich Gene dargestellt, welche die Qualitätskriterien erfüllt haben (siehe Abschnitt 2.2.6.4) und als biologisch relevant angesehen werden (mRNA Expression $\geq 2,0$ oder $\leq 0,5$ verglichen zu hiPSC). Zwischen den hEC und hiPSC konnten differentiell exprimierte Gene auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. So wurden nach der Endothelzellendifferenzierung 34 Gene im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC hochreguliert und 5 Gene herunterreguliert (Abbildung 3.31).

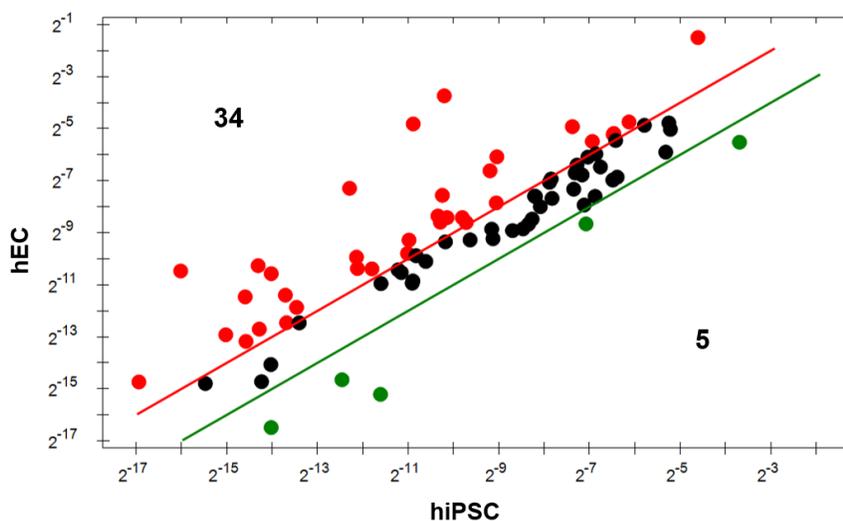


Abbildung 3.31: Differenzierungsabhängige Veränderung in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.

Streudiagramm der basalen Unterschiede der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktorgenen, die in Stress-induzierbaren Signalwegen, dem Zelltod, der Zellzyklusregulation und der DNA-Reparatur beteiligt sind, zwischen hEC und hiPSC. Die Genexpression auf mRNA-Ebene wurde mittels eines 96-Well basierenden *real-time* PCR-Arrays (Fritz *et al.*, 2011) analysiert. Als biologisch relevante Expressionsänderung wurden Werte von $\geq 2,0$ (rote Punkte) und $\leq 0,5$ (grüne Punkte) betrachtet. Schwarze Punkte repräsentieren Gene, die keine biologisch relevante Expressionsänderung aufweisen. Die Anzahl der hoch- bzw. herunterregulierten Gene ist auf der jeweilig relevant exprimierten Seite dargestellt. Die relative mRNA Expression von undifferenzierten hiPSC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Versuchen, bei denen die RNA gepoolt und in eine cDNA umgeschrieben wurde. Diese wurde jeweils in Duplikaten gemessen ($n = 2$, $N = 2$). PCR: Polymerasekettenreaktion, hEC: humane Endothel-ähnliche Zellen, hiPSC: humane induzierte pluripotente Stammzellen.

Eine namentliche Auflistung der differentiell exprimierten Gene ist in Tabelle 3.6 zu finden.

Tabelle 3.6: Differenzierungsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren.

In der Tabelle sind die basalen, im Vergleich zu hiPSC differenziell exprimierten Gene der hEC aus Abbildung 3.31 dargestellt. Es wurden nur signifikante Unterschiede, die als biologisch relevant angesehen werden (mRNA Expression $\geq 2,0$ oder $\leq 0,5$ verglichen zu hiPSC), aufgelistet. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. #: Cq > 35 Zyklen, *: Cq > 35 Zyklen in undifferenzierten hiPSC. hiPSC: humane induzierte pluripotente Stammzellen, hEC: humane Endothel-ähnliche Zellen.

Hochregulierte Gene		Herunterregulierte Gene
Akt1	Hif1a	Ccna1 #
Arhgdia	Icam-1	Hmox1
Bax *	Itgb1	Msh2
Bcl2 *	Lig4	Parp1
Becn1	Mgmt	Trp73
Casp2	Mpg	
CD44	Rev3	
Cdkn1a *	RhoA	
C-Jun	RhoB	
Cxcr4	Sele	
Cyp1a1	Sod1	
Ddit3	Tiam1	
Ercc1	Timp2	
Fancc *	Vcam-1	
Fos	Wee1	
Gadd45a	Xpa	
Gstm1 *	Xrcc4	

Mittels DAVID Analyse konnten die differenziell exprimierten Gene biologischen Signalwegen (*KEGG Pathways*) zugeordnet werden. Unter den hochregulierten Genen (Abbildung 3.31, Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7) befanden sich Gene, die in der DNA-Reparatur beteiligt sind. Ercc1 und *Xeroderma pigmentosum, complementation group A* (Xpa) codieren für Faktoren, die in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) involviert sind. Lig4 und Cxcr4 spielen eine Rolle in der NHEJ und *N-methylpurine-DNA glycosylase* (Mpg) in der BER. Ebenfalls hochreguliert wurden Akt1, Bcl2-assoziiertes X Protein (Bax), Bcl2 (und Casp2), die eine Rolle während der Apoptose spielen sowie Becn1, welches in der Regulation der Autophagie involviert ist. Die im Zellzyklus beteiligten Gene WEE 1

Homolog 1 (Wee1), Cdkn1a und *Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha* (Gadd45a) wurden ebenfalls im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC hochreguliert.

Des Weiteren wurden auch Gene hochreguliert, die den Signalwegen von TNF (Akt1, Fos, Jun Onkogen (C-Jun), Icam-1, Sele, Vcam-1), MAPK (Akt1, Ddit3, Fos, C-Jun, Gadd45a), Hypoxie-induzierter Faktor 1 (Hif1) (Akt1, Bcl2, Cdkn1a, Hypoxie-induzierter Faktor 1 α (Hif1a)), Chemokinen (Akt1, Cxcr4, Tiam1, RhoA) und metabolischen Signalwegen (*REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta* (Rev3), Cyp1a1) zugeordnet werden können. Die Gene Cxcr4 und Itgb1, die dem Signalweg der transendothelialen Migration von Leukozyten angehören, sowie die Zelladhäsionsmoleküle Icam-1, Sele und Vcam-1 wurden ebenfalls verstärkt in differenzierten hEC exprimiert.

Unter den herunterregulierten Genen der differenzierten hEC waren Gene, die eine Rolle in der DNA-Reparatur über BER (Poly (ADP-Ribose) -Polymerase 1 (Parp1)) oder der Mismatch-Reparatur (MutS Homolog 2 (Msh2)) spielen. Auch das in der Zellzyklusregulation beteiligte Gen Ccna1 wurde in hEC verringert exprimiert. Die Gene Trp73, welches im p53 Signalweg und Hämoxygenase 1 (Hmox1), welches im Hif1 Signalweg beteiligt ist, wurden ebenfalls, im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC, in hEC herunterreguliert.

Tabelle 3.7: Zuordnung der in der Differenzierung hoch- und herunterregulierten Gene zu Signalwegen.

Die in ihrer mRNA Expression signifikant hoch- und herunterregulierten Gene wurden nach der *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) Analyse biologischen Signalwegen (*KEGG pathways, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) zugeordnet. Ein Gen kann mehreren Signalwegen zugeordnet werden. Die vollständigen Genbezeichnungen sind dem Abkürzungsverzeichnis dieser Arbeit zu entnehmen. hEC: humane Endothel-ähnliche Zellen, hiPSC: humane induzierte pluripotente Stammzellen.

	KEGG Pathway	Zugeordnete Gene
hEC \uparrow (hiPSC \downarrow)	<i>Pathway in cancer</i>	Akt1, Bax, Bcl2, Cxcr4, Fos, C-Jun, Cdkn1a, Hif1a, Itgb1, RhoA
	<i>TNF signaling pathway</i>	Akt1, Fos, C-Jun, Icam-1, Sele, Vcam-1
	<i>Hif1 signaling pathway</i>	Akt1, Bcl2, Cdkn1a, Hif1a
	<i>MAPK signaling pathway</i>	Akt1, Ddit3, Fos, C-Jun, Gadd45a
	<i>Metabolic pathway</i>	Rev3, Cyp1a1
	<i>Chemokine signaling pathway</i>	Akt1, Cxcr4, Tiam1, RhoA
	<i>Cell cycle</i>	Wee1, Cdkn1a, Gadd45a
	<i>Apoptosis</i>	Akt1, Bax, Bcl2, (Casp2)
	<i>Regulation of autophagy</i>	Becn1

	<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	Cxcr4, Itgb1
	<i>Cell adhesion molecules</i>	Icam-1, Sele, Vcam-1
	<i>BER</i>	Mpg
	<i>NHEJ</i>	Lig4, Xrcc4
	<i>NER</i>	Ercc1, Xpa
hEC ↓ (hiPSC ↑)	<i>P53 signaling pathway</i>	Trp73
	<i>Mismatch repair</i>	Msh2
	<i>BER</i>	Parp1
	<i>Cell cycle</i>	Ccna1
	<i>Hif1 signaling pathway</i>	Hmox1

Zusammenfassend weist die hohe Anzahl an differenziell exprimierten Suszeptibilitätsfaktoren nicht nur auf Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität und der Zelltodregulation hin, sondern auch auf Veränderungen in der Zellzykluskontrolle und in Stress-induzierbaren Signalwegen zwischen undifferenzierten hiPSC und differenzierten hEC.

3.3.3 Einfluss von Doxorubicin auf hiPSC und aus hiPSC differenzierte Endothel-ähnliche Zellen

Nachdem die erfolgreiche Differenzierung von hiPSC in hEC bereits dargestellt wurde, wird in diesem Abschnitt der Einfluss von Doxorubicin auf das endotheliale Differenzierungspotential untersucht. Dazu wurden hiPSC und sich differenzierende Progenitor EC mit einer zwei Stunden Pulsbehandlung durch Doxorubicin geschädigt. Wie bereits in Abschnitt 3.2 erwähnt, wurde dieses Pulsbehandlungsschema incl. der gewählten Konzentrationen verwendet, um sich an die klinische Situation zu richten. Abbildung 3.32 zeigt den Zeitpunkt der 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC an Tag vier der Differenzierung und den der Analyse 48 h später an Tag sechs. Zu Kontrollzwecken wurden hiPSC 48 h nach der Aussaat ebenfalls mit Doxorubicin pulsbehandelt und 48 h später analysiert.

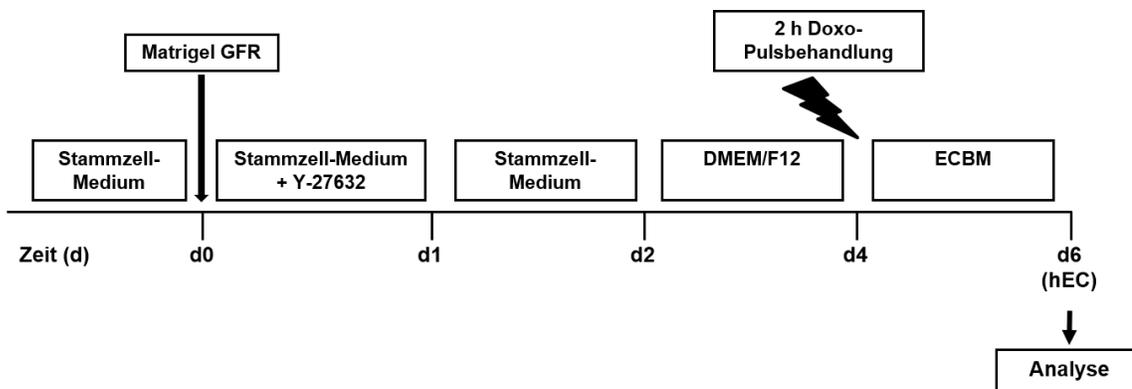


Abbildung 3.32: Behandlungs- und Analysezeitpunkt während der humanen Endothelzellendifferenzierung.

Schematische Darstellung des Zeitpunktes für die 2 h Pulsbehandlung mit Doxorubicin (Doxo) und die Analyse im verwendeten Differenzierungsprotokoll von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) zu Endothel-ähnlichen Zellen (hEC). Vier Tage (d4) nach Beginn der Differenzierung wurden die Zellen mit Doxo behandelt. Der Einfluss von Doxo auf den Differenzierungsprozess wurde 48 h nach der Pulsbehandlung an Tag sechs analysiert. d: Tag, Matrigel GFR: *growth factor reduced matrigel*, Y-27632: ROCK-Inhibitor, ROCK: *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*, DMEM/F12: Mesoderm-Induktionsmedium, ECBM: Endothelzell-Induktionsmedium.

Bereits 48 h nach der Doxorubicin-Pulsbehandlung fiel bei der makroskopischen Betrachtung der Zellen auf, dass sich mit steigender Doxorubicin-Konzentration mehr Zellen abgelöst haben und sich im Medium (Überstand) befanden (Abbildung 3.33). Geringe Doxorubicin-Konzentrationen von 0,01 μM bewirkten keine Veränderung in der Morphologie der undifferenzierten hiPSC. Bereits ab einer Konzentration von 0,05 μM Doxorubicin zeigten die hiPSC größere Zwischenräume am Rand ihrer Kolonie. Mit höheren Doxorubicin-Konzentrationen wiesen die hiPSC eine größere, flachere und längere Morphologie auf. Mit 0,01 μM Doxorubicin pulsbehandelte Progenitor hEC (hEC d4) zeigten eine Endothelzell-typische kopfsteinpflasterförmige Morphologie. Ab einer Doxorubicin-Konzentration von 0,05 μM wiesen hEC d4 48 h nach der Pulsbehandlung eine veränderte Morphologie und viele abgelöste Zellen auf, die sich im Medium befanden. Sowohl in hiPSC als auch in aus hiPSC differenzierten hEC konnten ab Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM nur wenige bis gar keine adhären Zellen mehr detektiert werden.

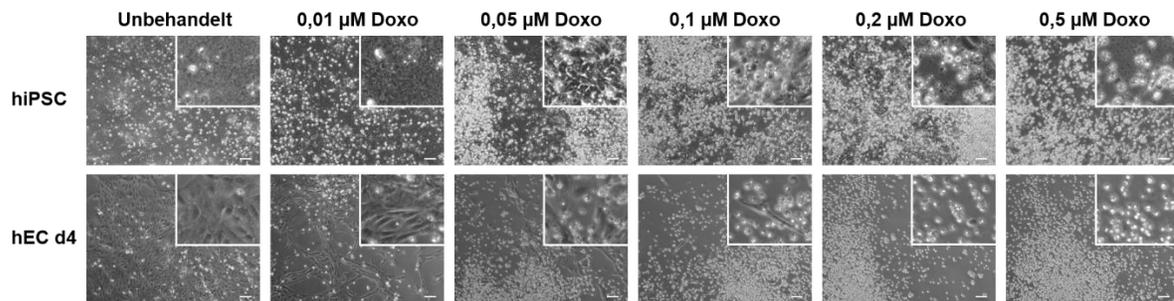


Abbildung 3.33: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Morphologie von hiPSC und aus hiPSC differenzierten hEC.

Morphologie von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und humanen Endothel-ähnlichen Progenitorzellen (hEC d4) 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin (Doxo). hiPSC wurden 48 h nach der Aussaat behandelt. Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung behandelt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$). 10 x Vergrößerung. Der Maßstabbalken repräsentiert 100 μm . hEC: humane Endothel-ähnliche Zellen.

Die Suszeptibilität der hiPSC und der daraus differenzierten Progenitor hEC (hEC d4) wurde durch die Analyse der Viabilität der Zellen mittels Alamar Blue-Assay bestimmt. Sowohl hiPSC als auch hEC d4 zeigten wie erwartet mit steigender Doxorubicin-Konzentration eine Abnahme der Viabilität (Abbildung 3.34). Besonders signifikant unterschieden sich die Viabilitäten der beiden Zelltypen bei einer Doxorubicin-Konzentration von 0,05 μM . Auch bei einer Doxorubicin-Konzentration von 0,1 μM zeigten hEC d4 eine im Mittel höhere Sensitivität gegenüber Doxorubicin als hiPSC. Die geschädigten hiPSC wiesen einen ca. doppelt so hohen IC_{50} Wert wie hEC d4 auf. Die Viabilität der beiden Zelltypen bei Doxorubicin-Konzentrationen von 0,2 μM und 0,5 μM war annähernd gleich und betrug unter 15 % und 5 %.

Verglichen zu mESC und aus mESC differenzierten EC (Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10) sind sowohl hiPSC als auch hEC d4 deutlich sensitiver gegenüber einer Doxorubicin-Pulsbehandlung.

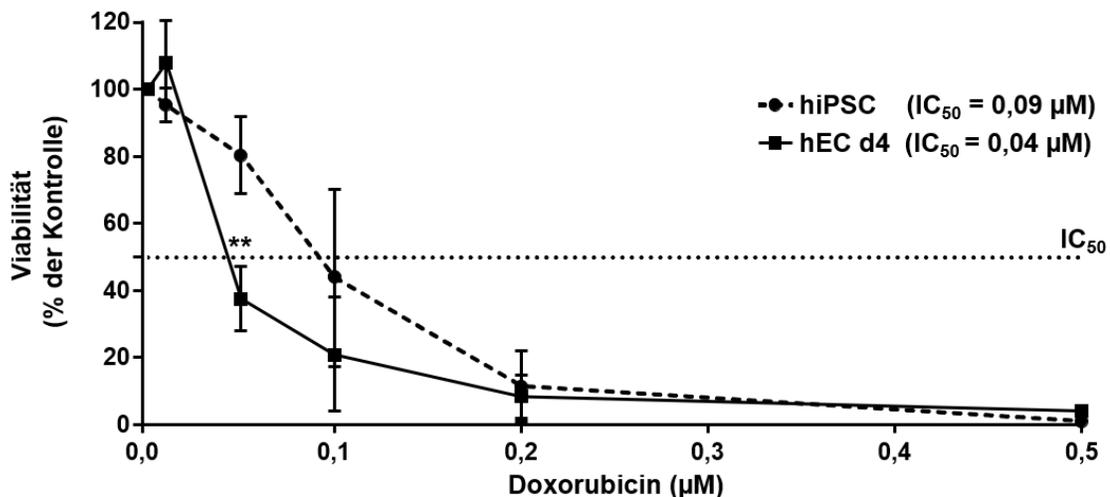


Abbildung 3.34: Viabilität von hiPSC und aus hiPSC differenzierten hEC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung.

Die Viabilität von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und aus hiPSC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen (hEC d4) wurde 48 h nach einer 2 h Pulsbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Doxorubicin (Doxo) mit dem Alamar Blue-Assay gemessen. hiPSC wurden 48 h nach der Aussaat behandelt. Endothel-ähnliche Progenitorzellen wurden an Tag vier der Differenzierung behandelt. Die jeweiligen unbehandelten Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Quadruplikaten durchgeführt wurden ($n = 3$, $N = 4$). Die gepunktete Linie zeigt die inhibitorische Konzentration bei der 50 % der Zellen sterben (IC_{50}). *One-way ANOVA*, **, $p \leq 0,01$ verglichen zu gleichbehandelten hiPSC. *ANOVA: Analysis of variance*.

Anschließend wurde der Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential von geschädigten humanen Progenitor EC (hEC d4) auf mRNA-Ebene untersucht. Da bereits Doxorubicin-Konzentrationen von $0,05 \mu\text{M}$ zum Tod von über 50 % der Population führten, wurden für den nachfolgenden Versuch geringere Doxorubicin-Konzentrationen von $0,01 \mu\text{M}$ und $0,02 \mu\text{M}$ verwendet. Diese gewählten Doxorubicin-Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die mRNA Expression der untersuchten Markergene. So wurde weder eine Erhöhung in der mRNA Expression der Stammzellfaktoren Nanog und Oct3/4 beobachtet, noch eine Verringerung der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1, Pecam1, VE-Cadherin (VE-Cad), Efnb2, Claudin5 und Connexin40 (Cx40) (Abbildung 3.35).

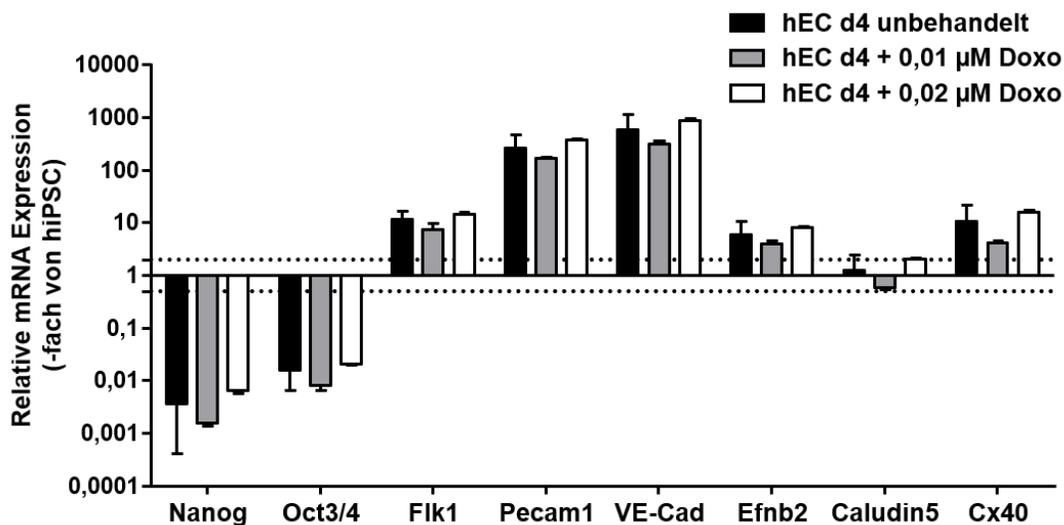


Abbildung 3.35: Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die mRNA Expression von prototypischen Stamm- und Endothelzellmarkern.

Quantitative *real-time* PCR Analyse von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und aus hiPSC differenzierten humanen Endothel-ähnlichen Progenitorzellen (hEC d4), die an Tag vier der Differenzierung mit Doxorubicin (Doxo) behandelt und an Tag sechs analysiert wurden. Untersucht wurde die mRNA Expression der prototypischen Stammzellfaktoren (Nanog, Oct3/4), Endothelzell-zugehörigen Marker (Flk1, Pecam1, VE-Cadherin (VE-Cad)), des arteriellen Endothelzellmarkers Efnb2, sowie die des *tight junction* Markers Claudin5 und des *gap junction* Markers Connexin40 (Cx40). Die relative mRNA Expression der jeweiligen Gene in undifferenzierten hiPSC wurde gleich 1,0 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD, *standard deviation*) von einem Experiment, welches in Duplikaten durchgeführt wurde ($n = 1$, $N = 2$). PCR: Polymerasekettenreaktion, Nanog: *nanog homeobox*, Oct3/4: *octamer binding transcription factor 3/4*, Flk1: *fetal liver kinase 1*, Pecam1: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, VE-Cadherin: *vascular endothelial cadherin*, Efnb2: Ephrin B2.

Die mRNA Daten deuten darauf hin, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung mit geringen, nicht zytotoxischen Konzentrationen den endothelialen Differenzierungsprozess der überlebenden Progenitorzellen nicht beeinträchtigt.

4 Diskussion

Seit der Etablierung zur Kultivierung der ersten murinen embryonalen Stammzellen (mESC, *mouse embryonic stem cells*) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) hat sich viel auf dem Gebiet der Stammzellforschung getan. Die Stammzeleigenschaften, die Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Differenzierung in andere Zelltypen, machen sie zu einem vielversprechenden *in vitro*-Modellsystem verschiedener Forschungsschwerpunkte. Neben dem klinischen Einsatz in der Zelltherapie wurden Stammzellen und daraus differenzierte Zelltypen zu einer neuen Alternative für Standardtests in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung (Laustriat *et al.*, 2010; Wobus and Loser, 2011). Zudem unterstützen *in vitro*-Modellsysteme das 3R-Prinzip, zur Vermeidung (*replacement*), Verringerung (*reduction*) und Verbesserung (*refinement*) von Tierexperimenten, welches heutzutage Grundlage der Tierschutzpolitik und Praxis moderner Forschungsansätze in vielen Ländern ist (Sneddon *et al.*, 2017). Embryonale Stammzellen eignen sich nicht nur zur Untersuchung der Embryonalentwicklung und für die Untersuchung embryotoxischer Substanzen (Genschow *et al.*, 2002), sondern auch für Toxizitätsstudien an differenzierten Zelltypen (Davila *et al.*, 2004). Für manche dieser Studien können sie attraktivere Testsysteme als die derzeit meist verwendeten immortalisierten Zelllinien sein. Immortalisierte Zellen repräsentieren allerdings nicht immer die Eigenschaften von normalen, primären Zelltypen. Primärkulturen hingegen sind schwer zugänglich oder schlecht zu kultivieren und verlieren *in vitro* oftmals ihre gewebespezifischen Funktionen (Wobus and Loser, 2011). Die Eignung von aus mESC differenzierten Zellen zur Untersuchung der Wirkung von Pharmaka wurde u.a. in differenzierten Kardiomyozyten gezeigt (Maltsev *et al.*, 1993; Wobus and Loser, 2011).

Das Differenzierungspotential von mESC und Progenitorzellen eignet sich weiterhin für molekulare Analysen von differenzierungsabhängigen Veränderungen der genetischen Stabilität nach Genotoxin-Exposition. Im Hinblick auf die Nebenwirkung der irreversiblen und Dosis-abhängigen Kardiotoxizität des in der Krebstherapie verwendeten Anthrazyklin-Derivats Doxorubicin (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014), sollen neben Kardiomyozyten u.a. auch Endothelzellen die Reaktion des Herzens auf eine Anthrazyklin-basierte Tumorthherapie beeinflussen (Wolf and Baynes, 2006; Wilkinson *et al.*, 2016). Daher wurden in dieser Arbeit Untersuchungen an direkten Differenzierungsmodellen von mESC in kardiovaskuläre Zelltypen (Endothel- und Kardiomyozyten-ähnliche Zellen), die den gleichen genetischen Hintergrund tragen, durchgeführt.

4.1 Kardiovaskuläre Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen

Um reproduzierbare Differenzierungsprozesse *in vitro* zu generieren ist eine undifferenzierte, homogene Population von mESC sicherzustellen. Dazu ist es bei der hier verwendeten Feeder-Zell freien Kultivierung der mESC notwendig Polypeptid-Faktoren, wie den Leukämie-inhibierenden Faktor (LIF, *leukemia inhibitory factor*), dem Kultivierungsmedium hinzuzufügen (Smith and Hooper, 1987; Smith *et al.*, 1988). LIF unterdrückt die spontane Differenzierung von mESC *in vitro* und erlaubt das homogene Wachsen einer Stammzellpopulation (Smith *et al.*, 1988). Die charakteristischen Stammzeleigenschaften der Pluripotenz und Selbsterneuerung werden durch LIF aufrechterhalten und erfolgen über die Aktivierung von drei Kinase-regulierten Signalwegen: dem *Janus kinase signal transducer and activator of transcription 3* (JAK-STAT3), der Mitogen-aktivierenden Proteinkinase/Extrazellulärer Signal-regulierten Kinase (MAPK/ERK) und der Phosphatidylinositol-3 Kinase/Proteinkinase B (PI3K/AKT) (Graf *et al.*, 2011).

Für die Differenzierung von mESC in kardiovaskuläre Zelltypen wurden direkte Differenzierungen durchgeführt, um aufwändige Zwischen- bzw. Reinigungsschritte, wie die Generierung von *embryoid bodies* (EB) und anschließende Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie, zu vermeiden (Bahrami *et al.*, 2012). Ein Vorteil der direkten Differenzierung in einer einschichtigen Ebene, einem sogenannten *Monolayer*, ist die bessere Erreichbarkeit der Zellen für immunzytochemische Analysen. Aufgrund der dreidimensionalen Aggregate in EB-Differenzierungen können nicht alle Zellen bei einer immunzytochemischen Färbung erreicht werden. Des Weiteren sind morphologische Veränderungen des Phänotyps bei Differenzierungen im *Monolayer* bereits mikroskopisch sichtbar.

Die innerste, dem Lumen zugewandte Schicht der Blutgefäße, kleiden die Endothelzellen aus. Das in dieser Arbeit verwendete Endothelzell-Differenzierungsprotokoll basiert auf einer schrittweisen Veränderung der mESC in Endothel-ähnliche Zellen (EC, *endothelial-like cells*). Diese wird durch die Zugabe definierter Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Verbindungen (*small molecules*) an bestimmten Zeitpunkten zu dem Medium erreicht (Chiang and Wong, 2011). So kann *in vitro* die Entwicklung von Stammzellen in EC nachgestellt werden. Durch den Entzug von LIF und der Überführung der Zellen in ein serumfreies Medium wird die Differenzierung zum Epiblast in den ersten Tagen (d0–d2) angeregt (Chiang and Wong, 2011).

In einem zweiten Schritt der Differenzierung (d2–d4) wird das mesodermale Schicksal der Zellen durch die Aktivierung des kanonischen *Wingless-Type MMTV Integration Site Family* (Wnt) -Signalwegs eingeleitet (Chiang and Wong, 2011). Während der Embryonalentwicklung ist dies notwendig, um den Primitivstreifen zu bilden, welcher die Längsachse des Embryos festlegt und den Beginn der Gastrulation anzeigt. *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3* (Wnt3) -defiziente Mäuse bilden keinen Primitivstreifen aus (Liu *et al.*, 1999) und β -Catenin-defiziente Mäuse keine Längsachse (Huelsen *et al.*, 2000). Dies führt in beiden Fällen zum Ausbleiben der Mesoderm-Entwicklung. Durch die Zugabe des Glykogen Synthase Kinase 3 Inhibitors (GSKi) (Lindsley *et al.*, 2006) zu dem Differenzierungsmedium an Tag zwei der *in vitro* Differenzierung, wurde der Wnt-Signalweg über die Inhibierung von β -Catenin aktiviert. Die restlichen dem Medium zugeführten Faktoren, Activin A, *basic fibroblast growth factor* (bFGF) und *bone morphogenic protein 4* (BMP4), spielen eine Rolle bei der Induktion des Mesoderms (Slack, 1994). BMP4 sorgt in diesem Schritt außerdem dafür, dass sich aus dem Epiblast der Hämangioblast bildet (Chiang and Wong, 2011), welcher sowohl Vorläufer von Endothel- als auch von Blutzellen ist.

Schritt drei der Differenzierung (d4–d6) prägt das endotheliale Schicksal der Zellen durch die Zugabe von bFGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *activin receptor-like kinase receptor inhibitor* (ALKi) und Forskolin. Bereits seit den frühen 1990-iger Jahren ist bekannt, dass bFGF und VEGF Auslöser der Angiogenese *in vitro* sind (Pepper *et al.*, 1992). Zusammen mit VEGF-Rezeptoren (VEGFR), wie der fetalen Leber Kinase 1 (Flk1), auch bekannt als VEGFR-2, sind sie von entscheidender Bedeutung bei der Differenzierung zu Endothelzellen und der Entstehung von Blutgefäßen, der Vaskulogenese (Risau and Flamme, 1995). ALKi erhöht die Reinheit der Endothelpopulation. Als Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β) Antagonist verhindert ALKi die Differenzierung in murale Zellen, zu denen Perizyten und vaskuläre glatte Muskelzellen gehören (Watabe *et al.*, 2003). Durch die Zugabe von Forskolin wird die Proteinkinase A aktiviert, welche die Sensitivität von Flk1-positiven vaskulären Vorläuferzellen für eine effiziente VEGF-induzierte Endothelzell-differenzierung erhöht (Yamamizu *et al.*, 2009). Die Verwendung und das Zusammenspiel der beschriebenen Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen zu bestimmten Zeitpunkten zu dem Differenzierungsmedium sind essentiell für diesen Differenzierungsprozess. Dies führte sechs Tage nach Beginn der Differenzierung zu einer für Endothelzellen charakteristischen kopfsteinpflasterförmigen Morphologie der Zellen.

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass Endothelzellen eine bemerkenswerte Heterogenität aufweisen, die sich je nach Organ in ihrer Struktur und Funktion, sowie den metabolischen Eigenschaften unterscheiden (Aird, 2007; Marcu *et al.*, 2018). Daher kann alleine die Morphologie einer Zelle nicht als ausschlaggebendes Kriterium genutzt werden, um einen Zelltyp zu bestimmen. Aus diesem Grund ist es notwendig mehrere Zelltyp-charakteristische Eigenschaften, wie bspw. die Expression von spezifischen Markergenen und insbesondere die Funktionalität, nachzuweisen. Zudem kann auf diese Weise der Einfluss von Genotoxinen auf die Zellen über eine Analyse verschiedener Zelltyp-charakteristischer Eigenschaften und Funktionen erfasst werden.

Um die endotheliale Identität der aus mESC differenzierten EC zu bestätigen, wurde zunächst die Expression von Markergenen auf mRNA- sowie auf Proteinebene untersucht. Wie zu erwarten, regulierten auf mRNA-Ebene die aus mESC differenzierten EC, verglichen zu undifferenzierten mESC, die Stammzellfaktoren *nanog homeobox* (Nanog) (Chambers *et al.*, 2003) und Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct4, *octamer binding transcription factor 4*) (Niwa *et al.*, 2000) herunter. Beides sind wichtige Transkriptionsfaktoren, die die Selbsterneuerung der Stammzellen aufrechterhalten und eine entscheidende Rolle bei der Pluripotenz der Zellen spielen. Der mesodermale und frühe Progenitor Endothelzellmarker Flk1, welcher ebenfalls für Endothelzellen charakteristisch ist (Yamaguchi *et al.*, 1993), wurde im Vergleich zu undifferenzierten mESC bereits am vierten Tag der Differenzierung verstärkt auf mRNA-Ebene exprimiert. Am Tag sechs exprimierten die terminal differenzierten EC die Endothelzellmarker Flk1, vaskulär-endotheliales Cadherin (VE-Cadherin, *vascular endothelial cadherin*), *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (Pecam1) und *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1* (Tie1) sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene (Flk1, VE-Cadherin, Pecam1).

Wie zuvor erwähnt, ist Flk1 ein Rezeptor für VEGF und auch als VEGFR-2 bekannt. Flk1 wird bereits in frühen mesodermalen Zellen exprimiert und ist somit der erste exprimierte Marker in der sich differenzierenden endothelialen Abstammungslinie (Yamaguchi *et al.*, 1993). Aufgrund der frühen Expression während der Embryonalentwicklung wird Flk1 auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert und gilt dort ebenfalls als frühester exprimierter Marker für die hämatopoetische Festlegung (Kabrun *et al.*, 1997). Die Bindung von VEGF an den Tyrosin-Kinase-Rezeptor Flk1 spielt nicht nur bei der Gefäßbildung und der Hämatopoese in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, sondern auch im adulten Organismus (Risau and Flamme, 1995). Des Weiteren wird über Flk1 die VEGF-

induzierte Migration, Angiogenese und vaskuläre Permeabilität in Endothelzellen vermittelt (Gille *et al.*, 2001).

VE-Cadherin ist ein Endothelzell-spezifisches transmembranes Adhäsionsmolekül, welches sich an den interzellulären Verbindungen von Endothelzellen befindet und somit eine endotheliale Adhärenzverbindung ist (Lampugnani *et al.*, 1992). Die Expression von VE-Cadherin ist wichtig für die Entwicklung, da eine Inaktivierung bzw. Mutation des VE-Cadherin Gens zu einer embryonalen Letalität, durch eine vaskuläre Insuffizienz aufgrund einer erhöhten endothelialen Apoptose, führt (Carmeliet *et al.*, 1999). Neben Endothelzellen gibt es noch zwei andere Zelltypen, die VE-Cadherin für den Zell-Zell-Kontakt zu Endothelzellen exprimieren. Zum einen sind das Zellen des Trophoblasten, die über VE-Cadherin und Pecam1 Kontakt zu dezidualen Endothelzellen in der Plazenta aufnehmen und es zu einer transendothelialen Migration von Zytotrophoblasten kommt (Bulla *et al.*, 2005). Zum anderen exprimiert eine besondere Untergruppe von Makrophagen, welche den Lymphknotensinus auskleiden und den Endothelzellen sehr ähneln, ebenfalls VE-Cadherin (Lampugnani *et al.*, 1992).

Das transmembrane Glykoprotein Pecam1 ist eines der frühesten exprimierten Zelladhäsionsmoleküle von Endothelzellen während der vaskulären Entwicklung (Baldwin *et al.*, 1994). Es ist ein Endothelzell-spezifisches Zelladhäsionsmolekül, welches auch auf der Oberfläche von Monozyten, Neutrophilen, Thrombozyten, sowie B- und T-Zelluntereinheiten exprimiert wird (Robson *et al.*, 2001). Neben der Vermittlung des Zell-Zell-Kontaktes zwischen Endothelzellen, um die Barrierefunktion des Endothels aufrecht zu erhalten (Ferrero *et al.*, 1995), spielt Pecam1 während der Inflammation sowohl eine pro- als auch anti-inflammatorische Rolle (Privratsky *et al.*, 2010).

Ein weiteres, überwiegend von Endothelzellen exprimiertes Oberflächenprotein ist Tie1, welches ebenfalls von unreifen hämatopoetischen Zellen mit erythrozytärem und megakaryozytärem Differenzierungspotenzial exprimiert wird (Partanen *et al.*, 1992). Dieses Protein spielt eine essentielle Rolle in der Gefäßentwicklung. Tie1-defiziente Mäuse weisen keine offensichtlichen angiogenetischen Defekte auf. Ihr Gefäßsystem entwickelt sich jedoch nicht vollständig, wodurch spontane Ödeme sowie lokale Hämorrhagien auftreten, sodass die Embryos gegen Ende der Trächtigkeit sterben (Puri *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995). Die entstehende Schädigung der Blutgefäße lässt auf eine Funktion von Tie1 bei der Aufrechterhaltung der Integrität des Endothels, sowie dem Flüssigkeitsaustausch der Kapillaren schließen (Puri *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1995).

Auch Kardiomyozyten gehen aus dem mittleren Keimblatt, dem Mesoderm, hervor. Das in dieser Arbeit verwendete, modifizierte Kardiomyozyten-Differenzierungsprotokoll von Yang und Kollegen (Yang *et al.*, 2008) beruht, wie das Protokoll der Endothelzeldifferenzierung, auf der Zugabe definierter Wachstumsfaktoren und niedermolekularer Verbindungen an bestimmten Zeitpunkten zum Medium. So wird auch hier im ersten Schritt durch den Entzug von LIF und die Überführung der Zellen in ein serumfreies Medium die Differenzierung zum Epiblast angeregt (d0-d2). Anschließend erfolgt die Induktion des Mesoderms durch die Faktoren Activin A, bFGF, BMP4 und GSKi (d2-d4). Das Differenzierungsmedium wurde ohne den Zusatz Insulin gewählt, da dieses, in Kombination mit den zuvor gewählten Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen, die Bildung des kardialen Mesoderms blockiert hätte und es zu keiner Kardiomyozytendifferenzierung käme (Lian *et al.*, 2013).

In dem nächsten Schritt (d4-d6) wird der Wnt/ β -Catenin Signalweg durch Zugabe eines Wnt-Inhibitors, hier WNT-C59, inhibiert, um die kardiale Spezifikation bzw. Entwicklung des Mesoderms zu fördern (Yang *et al.*, 2008). Die gleichzeitige Zugabe von VEGF soll die Ausbreitung und Reifung der mesodermalen Flk1-positiven Population fördern (Yang *et al.*, 2008). Als letzten Schritt im Differenzierungsprozess wird das Medium mehrmals gewechselt und frisch mit VEGF versetzt, um weiter das kardiale Schicksal der Zellen zu fördern (d6-d13). Als morphologisches und gleichzeitig funktionales Merkmal sind die pulsierenden Zellbereiche ab Tag acht für eine erfolgreiche Differenzierung in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM) anzusehen.

Um die erfolgreiche Kardiomyozytendifferenzierung auf mRNA- und Proteinebene zu verifizieren, wurde ebenfalls die Expression spezifischer Markergene analysiert. Bereits ab Tag sieben der Differenzierung, an dem noch keine pulsierenden Zellareale zu beobachten waren, wurden die hier untersuchten Kardiomyozyten-spezifischen Markergene hochreguliert. Nanog als typischer Stammzellefaktor wurde wie zu erwarten verringert exprimiert. Flk1 wurde im Vergleich zu undifferenzierten mESC bereits ab Tag sieben erhöht exprimiert. Aktinin alpha 1 (*Actn1*, *actinin alpha 1*) wurde mit zunehmenden Differenzierungsverlauf herunterreguliert und ist eine nichtmuskel-spezifische Isoform mit diversen Bindungspartnern, wie den Stressfasern, dem Zytoskelett, *adherens* und *tight junctions* (Otey and Carpen, 2004). Im Myokardium wird *Actn1* im Endothelium und der Media der Blutgefäße exprimiert (Hein *et al.*, 2009).

Die mRNA Expression der Kardiomyozytenmarker der leichten Kette Myosin 2 (Myl2, *myosin light chain 2*), der schweren Kette Myosin 6 (Myh6, *myosin heavy chain 6*), des kardialen Troponin T2 (Tnnt2, *troponin T2, cardiac*) und von NK2 Homöobox 5 (Nkx2-5, *NK2 homeobox 5*) ist mit fortschreitender Differenzierung stärker geworden. Zusätzlich wurde die Proteinexpression des kardialen Troponin I in aus mESC differenzierten CM (Tag 13), aber nicht in undifferenzierten mESC nachgewiesen. Das Motorprotein Myl2 ist eines der ersten Marker der ventrikulären Spezifikation während der Säugetierkardiogenese (O'Brien *et al.*, 1993). Seine Expression beschränkt sich nicht nur auf das ventrikuläre Segment des linearen Herzschlauches während der Embryonalentwicklung, sondern es wird auch im Erwachsenenalter durchgehend in der ventrikulären Kammer exprimiert (O'Brien *et al.*, 1993). Die embryonale Letalität von Myl2-Nullmutanten deutet auf eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der kardialen Kontraktilität, sowie der ventrikulären Herzkammer-Morphogenese während der Kardiogenese hin (Chen *et al.*, 1998). Auch in den langsam kontrahierenden Skelettmuskeln wird Myl2 exprimiert, was auf unterschiedlich entwickelte regulatorische Programme hinweist. Diese steuern eine Gewebe-spezifische Expression des kontraktile Proteingens im Herz- sowie Skelettmuskel (Lee *et al.*, 1992). Das Motorprotein Myh6 ist, aufgrund seiner höheren ATPase Aktivität, für die Muskelkontraktion verantwortlich und führt bei einer Expressionsabnahme zur Herzinsuffizienz (Lowe *et al.*, 1997). Die leichte und schwere Myosinkette stellen zusammen mit Aktin, Tropomyosin und Troponin die kontraktile Einheit des Herzmuskels dar. Der Kardiomyozyten-spezifische Marker Nkx2-5 wird im präkardialen Mesoderm, im embryonalen, fötalen und adulten Herz exprimiert (Lints *et al.*, 1993). Dieser Transkriptionsfaktor spielt eine entscheidende Rolle bei der Herz-Myogenese und -Morphogenese, da murine *knockout* Tiere bzw. Embryonen morphogenetische Defekte aufweisen, die Ödeme hervorrufen, welche zum frühen embryonalen Tod führen (Lyons *et al.*, 1995).

Auch die relative mRNA Expression der Kardiomyozyten-zugehörigen Calciumkanalmarker des spannungsabhängigen Calciumkanals Typ P/Q der alpha 1A Untereinheit (Cacna1a, *calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit*) und des Ryanodinrezeptors 2 (Ryr2, *ryanodine receptor 2*) war bereits in CM d7 hochreguliert und wurde mit Fortschreiten der Differenzierung stärker exprimiert. Während Cacna1a-defiziente Mäuse drei bis vier Wochen nach der Geburt aufgrund neurologischer Defizite sterben (Jun *et al.*, 1999), sterben Ryr2-defiziente Tiere aufgrund morphologischer Abnormalitäten des Herzschlauches bereits während der Embryonalentwicklung (Takeshima *et al.*, 1998). Ryr2, ein großer Calciumkanal in der Membran des

sarkoplasmatischen Retikulums, wird überwiegend in Herzmuskelzellen und weniger stark in den meisten erregbaren Zellen exprimiert (Meissner, 1994). Seine Aufgabe ist die Regulation der Calcium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum für die systolische Muskelkontraktion. Sowohl *in vitro* (Yang *et al.*, 2002) als auch *in vivo* (Broun *et al.*, 2012) konnte mit Hilfe von *knockout* Versuchen gezeigt werden, dass Ryr2 eine Funktion in der Kontrolle der Herzfrequenz hat. Der *knockout* führte zu einer Arrhythmie, welche zu Herzfehlern und sogar dem plötzlichen Herztod führen konnte.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass in der vorliegenden Arbeit aus embryonalen Stammzellen der Maus, morphologisch charakteristische und funktionale Endothel- sowie Kardiomyozyten-ähnliche Zellen differenziert wurden. Des Weiteren wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zelltypspezifische Markergene nachgewiesen. Damit sind diese *in vitro* Modelle für toxikologische Studien zur Analyse des Einflusses von Chemikalien/Genotoxinen auf Differenzierungsprozesse geeignet. Ein genauer Vergleich der mRNA Expressionsstärke der hier untersuchten Markergenen mit denen aus den Protokollen von Chiang und Wong (Chiang and Wong, 2011) sowie Yang und Kollegen (Yang *et al.*, 2008), ist aufgrund von unterschiedlichen Analysemethoden nicht möglich. Bei PCR-Analysen wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA Expressionslevel auf die Referenzgene β -Aktin und GAPDH normalisiert und die relative mRNA Expression wurde in undifferenzierten mESC gleich 1,0 gesetzt. In den anderen beiden Protokollen wurde die mRNA Expression auf Referenzgene normalisiert und keine relative mRNA Expression dargestellt. Zusätzlich verwendeten beide Arbeitsgruppen die Methode der Durchflusszytometrie, um den Nachweis von spezifischen Markergenen darzustellen. In künftigen Arbeiten könnten auch diese Methoden gewählt werden, um den Differenzierungszustand einer Zellpopulation aufzuzeigen. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie hat den Vorteil, dass auch eine Aussage über den prozentualen Anteil der Zellen getroffen werden kann, die den untersuchten Marker, z.B. Nanog oder VE-Cadherin, exprimieren.

4.1.1 Vergleichende basale Expressionsanalysen von Suszeptibilitätsfaktoren in kardiovaskulären Zelltypen

Die in dieser Arbeit aus mESC differenzierten EC und CM tragen den gleichen genetischen Hintergrund und wurden vergleichend auf basale Expressionsunterschiede von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren untersucht. Die analysierten Suszeptibilitätsfaktoren sind in Stress-induzierbaren Signalwegen, dem Zelltod, der Zellzyklusregulation und der

DNA-Reparatur beteiligt. mRNA Genexpressionsanalysen der ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren zeigten, dass EC und CM bestimmte Gene, im Vergleich zu undifferenzierten mESC, gemeinsam hoch- oder herunterregulieren.

Unterschiede in der Expression bzw. Regulation einiger Suszeptibilitätsfaktoren der untersuchten kardiovaskulären Zelltypen können vermutlich auf einen mit der Differenzierung von Stammzellen einhergehenden Verlust der Pluripotenz bzw. des Stammzellcharakters zurückgeführt werden. Lediglich aus einer sehr kleinen Anzahl von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) entstehen alle Gewebe des Embryos. Diese kleine Populationsgröße bedeutet, dass ES-Zellen mit hoch effizienten Mechanismen ausgestattet sein sollten, um sich gegen verschiedene Formen von Stress zu schützen und DNA-Schäden vermeiden oder reparieren zu können (Saretzki *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den Reparatursystemen müssen ES-Zellen mit effizienten zellulären Mechanismen ausgestattet sein, die eine genomische Stabilität über mehrere Generationen sicherstellen (Saretzki *et al.*, 2008). Bereits in den 1970-iger Jahren wurde angenommen, dass das Altern ein Resultat eines energiesparenden Verlusts dieser hoch effizienten Mechanismen ist. Dieser Verlust ereignet sich um den Zeitpunkt der Differenzierung von somatischen Zellen aus der Keimbahnlinie (Kirkwood, 1977). Somit haben somatische Zellen einen relativ instabilen Zustand (Kirkwood, 1977), der sich mit einer deutlich geringeren Mutationsrate in ES-Zellen im Vergleich zu embryonalen Fibroblasten deckt (Cervantes *et al.*, 2002). Die normale Entwicklung von Vertebraten beinhaltet diverse Prozesse, von der frühen Zellproliferation bis zur späten Organogenese und Morphogenese, die streng reguliert, komplex und räumlich-zeitlich festgelegt sind (Kupsco and Schlenk, 2015). Werden diese Prozesse gestört, kann es zu einer Entwicklungsstörung kommen, die zu Geburtsfehlern oder embryonaler Sterblichkeit führt. Oxidativer Stress in Form von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die endoplasmatische Retikulum (ER) -Stressantwort in Form der ungefalteten Proteinantwort (UPR, *unfolded protein response*) und die Apoptose spielen in der physiologischen Entwicklung eine Schlüsselrolle (Kupsco and Schlenk, 2015). Dabei können sowohl exogene (z.B. Chemotherapeutika, ionisierende Strahlung, Schwermetalle) als auch endogene Giftstoffe (ROS, z.B. Superoxid-Anion, Hydroxylradikal, Wasserstoffperoxid) diese Schlüsselprozesse unterbrechen und zu Veränderungen in dem Redoxstatus, der Proteinfaltung sowie der Apoptose führen, welche in Letalität oder Missbildungen resultieren (Kupsco and Schlenk, 2015).

ROS entstehen unter physiologischen Bedingungen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette und sind neben exogenen Noxen eine Hauptursache für DNA-Schäden.

Neben DNA-Basenschäden entstehen auch DNA-Einzelstrangbrüche. Es wurde gezeigt, dass die antioxidative Kapazität der mESC bereits in den ersten Schritten der Differenzierung zu EB abnimmt (Saretzki *et al.*, 2004). Analysen des Transkriptoms (Saretzki *et al.*, 2004) und auch des Proteoms (Unwin *et al.*, 2006) ergaben, dass ES-Zellen höhere Expressionslevel an antioxidativen Enzymen aufweisen als differenzierte Zellen. Während geringe Mengen ROS in humanen und murinen somatischen Stammzellen benötigt werden, um die Fähigkeit der Selbsterneuerung aufrechtzuerhalten, leiten erhöhte Mengen ROS die Differenzierung über die Aktivierung der p38 MAPK ein (Ito *et al.*, 2006; Schmelter *et al.*, 2006; Jang and Sharkis, 2007). Sowohl die Differenzierung von murinen als auch humanen Stammzellen wird von einer Zunahme an zellulären ROS Mengen begleitet (Cho *et al.*, 2006). Diese Zunahme ist auf eine Herunterregulation von Genen mit antioxidativen Funktionen, wie der Superoxid-Dismutase 2 (Sod2), diverse Glutathionperoxidasen (Gpx) und Glutathion-S-Transferase 3 (Gsta3) zurückzuführen (Saretzki *et al.*, 2004; Saretzki *et al.*, 2008). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Herunterregulation der mRNA Expression von antioxidativen Faktoren beobachtet, die sich je nach kardiovaskulärer Differenzierung unterschieden hat. Differenzierte EC regulierten die *Glutathione S-transferase, mu 1* (Gstm1) herunter und differenzierte CM die Superoxid-Dismutase 1 (Sod1). Ein ausgleichender Anstieg spezifischer Reparaturkapazitäten für oxidative DNA-Läsionen, um der Anhäufung von Mutationen in differenzierten Zellen entgegenzuwirken, wurde nur in CM durch die erhöhte mRNA Expression von *apurinic/aprimidinic endonuclease 1* (Apex1) gefunden. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass mESC DNA-Einzelstrangbrüche effizienter reparieren als differenzierte murine 3T3 Fibroblasten, die ein hohes Level an ROS aufweisen (Saretzki *et al.*, 2004). Neben Faktoren, wie Apex1, die der Basenexzisionsreparatur (BER) zugeschrieben werden, werden Einzelstrangbrüche durch die Mechanismen der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und der Fehlpaarungsreparatur (MMR, *mismatch repair*) behoben. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Suszeptibilitätsfaktoren, die in der NER und MMR beteiligt sind, wurden auf mRNA-Ebene in keiner der beiden differenzierten kardiovaskulären Zelltypen erhöht exprimiert. Jedoch wurde nach der Differenzierung von mESC in murine EC eine verstärkte mRNA Expression von an der NER beteiligten Faktoren (*excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1* (Ercc1) und *Xeroderma pigmentosum, complementation group A* (Xpa)) beobachtet (Hennicke *et al.*, 2015). Zudem zeigten die murinen EC eine verringerte mRNA Expression der antioxidativen Faktoren Gstm1 und Gpx1 (Hennicke *et al.*, 2015). Somit scheint zumindest eine Herunterregulation der Expression von antioxidativen Faktoren auf mRNA-

Ebene für die Differenzierung von mESC in EC und CM einen erforderlichen Schritt darzustellen.

ER-Stress ist eine weitere Art des Zellstress. Aufgrund einer gestörten ER Funktion kommt es zu einer Anhäufung un- und fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen. Auslöser für ER-Stress sind u.a. Störungen der zellulären Redox-Regulation, Glukosemangel, eine abweichende Calciumregulation und virale Infektionen (Xu *et al.*, 2005). Als Antwort auf den ER-Stress wird die *unfolded protein response* (UPR) aktiviert. Durch Änderungen in der Genexpression und Proteintranslation verleitet die UPR das ER zur korrekten Durchführung der Proteinfaltung oder leitet bei irreversiblen geschädigten Zellen die Apoptose oder Autophagie ein (Kupsco and Schlenk, 2015). Physiologische Prozesse, die mit der UPR interagieren, sind Signalwege des Lipid- und Energiemetabolismus, sowie die angeborene Immunität und Differenzierungsprogramme (Hetz, 2012). Beispiele für zelluläre Differenzierungsprozesse, die durch ER-Stress bzw. die UPR gefördert werden, sind die Erythropoese (Coutts *et al.*, 1999), Hämatopoese (Li *et al.*, 2019), Adipogenese (Sha *et al.*, 2009) sowie die osteogene Differenzierung (Pereira *et al.*, 2004) und Differenzierungen zu Keratinozyten (Sugiura *et al.*, 2009), Neuronen (Cho *et al.*, 2009) oder Chondrozyten (Saito *et al.*, 2009).

Die Herunterregulation von zuvor stark exprimierten UPR-regulierenden Genen (Glukose-regulierende Protein GRP78 und GRP94) nach der Geburt zeigt, dass die UPR eine wichtige Rolle während der Embryogenese hat (Yang *et al.*, 2016). Des Weiteren wird die embryonale Stammzellendifferenzierung durch die Hemmung der ER-Stress induzierten UPR eingestellt (Yang *et al.*, 2016). Ein gut untersuchter ER-Stressmarker ist das 78 kDa große Glukose-regulierende Protein (GRP78), welches auch als bindendes Immunglobulinprotein (BiP) bekannt ist. GRP78/BiP ist für das embryonale Zellwachstum und die Pluripotenz der Zellen in der Embryogenese notwendig. Eine GRP78/BiP Defizienz führt zu einem Proliferationsstop und einer massiven Apoptose in der inneren Zellmasse, dem Embryoblasten (Luo *et al.*, 2006). Auch während der frühen Organogenese ist GRP78/BiP im Herzen stark exprimiert und verringert sich signifikant im weiteren Entwicklungsprozess (Barnes and Smoak, 2000; Mao *et al.*, 2006), was auf eine wichtige Rolle der UPR in der Kardiogenese hindeutet. In anderen Studien wurden die drei transmembranen ER-Proteine, die als Sensoren der UPR fungieren (Schroder and Kaufman, 2005), nämlich die Proteinkinase RNA-ähnliche Endoplasmatische Reticulum Kinase (PERK, *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), die Proteinkinase Inositol-benötigendes Enzym 1 (IRE1, *inositol-requiring enzyme 1*) und der aktivierende Transkriptionsfaktor 6 (ATF6)

untersucht. Über eine Aktivierung dieser Proteine wird die Differenzierung von Stammzellen reguliert (Kroeger *et al.*, 2018; Tokutake *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2020). Ob dies auch für das hier beschriebene Differenzierungsmodell zutrifft sollte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Zusammenfassend weist die erhöhte UPR auf ein erhöhtes ER-Stresslevel in Stammzellen verglichen mit differenzierten Zellen hin. Die genaue Ursache hierfür ist jedoch noch unklar. Wahrscheinlich benötigen die stark proliferierenden Stammzellen nicht nur essentielle ER-Chaperone, wie GRP78, für das embryonale Zellwachstum und das pluripotente Zellüberleben (Luo *et al.*, 2006). Zudem könnte die erhöhte Proteinbiosyntheserate der proliferierenden Zellen eine erhöhte Chaperonkonzentration benötigen, um den gesteigerten Faltungsanforderungen gerecht zu werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine reduzierte Genexpression des ER-Stress-induzierten Chaperons Hitzeschockprotein 1B (Hspa1b) in differenzierten EC bestätigt. In differenzierten CM hingegen war die mRNA Expression von Hspa1b im Vergleich zu mESC erhöht. Eine mögliche Erklärung dafür kann die hochregulierte mRNA Expression vom Hypoxie-induzierten Faktor 1 α (Hif1a) sein. Hif1a wird in mESC durch die Kultivierungsbedingungen mit LIF herunterreguliert, um die Selbsterneuerung, den pluripotenten Charakter der Stammzellen aufrechtzuerhalten. LIF inhibiert die Hif1a Expression sowie ER-Stress Signalwege und blockiert dabei die autokrine VEGF Expression von mESC, die zur Differenzierung benötigt wird (Chen *et al.*, 2014). Somit scheint eine verringerte mRNA Expression des hier untersuchten ER-Chaperons nicht zwangsläufig für eine Differenzierung benötigt zu werden. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, sollten weitere ER-Chaperone in fortführenden Analysen hinzugezogen werden, um diesbezüglich eine allgemein gültigere Aussage treffen zu können. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass während einer ungerichteten Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen (hESC, *human embryonic stem cells*) unterschiedlich regulierte ER-Stressantworten (Anstieg an GRP78/Bip und Reduktion von *eukaryotic initiation factor-2 α* (eIF2 α)) und ein Anstieg des Apoptosemarkers B-Zell Lymphom 2 (Bcl2) beobachtet wurden (Liu *et al.*, 2012).

Erfahren Zellen langandauernden ER-Stress oder eine irreversible Schädigung werden diese durch die Einleitung der Apoptose eliminiert. Dieser aktive Prozess des Zelltods ist nicht nur essentiell für eine erfolgreiche Organogenese während der Entwicklung und der normalen physiologischen Homöostase im Erwachsenenalter, sondern wird auch oft mit Zelldifferenzierungen assoziiert (Glucksmann, 1951; Kerr *et al.*, 1972; Nakanishi *et al.*, 2007; Matsuzaki *et al.*, 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte mRNA

Expression der an der Apoptose beteiligten Gene *Thymoma viral proto-oncogene 1* (Akt1) und B-Zell Lymphom 2 (Bcl2) in beiden differenzierten kardiovaskulären Zelltypen gegenüber mESC beobachtet. Das an der Apoptose beteiligte Gen *DNA-damage inducible transcript 3* (Ddit3) wurde in aus mESC differenzierten EC verstärkt exprimiert. Die Gene Fas-Ligand (Fas-L), Fas-Rezeptor (Fas-R), Serin/Threonin-Kinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM), *Baculoviral IAP repeat-containing 3* (C-IAP1) und Caspase 2 (Casp 2) wurden in differenzierten CM verstärkt exprimiert. Somit könnte eine erhöhte Expression von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind auch bei kardiovaskulären Differenzierungen in EC und CM benötigt werden. Bcl2 und C-IAP1 wird jedoch eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben. Eine erhöhte Expression von Bcl2 wurde ebenfalls bei einer durch Retinolsäure-induzierten ungerichteten Differenzierung von hESC beobachtet (Liu *et al.*, 2012). Bei einer Differenzierung von humanen Monozyten zu Makrophagen zeigten differenzierte Makrophagen eine erhöhte mRNA- sowie Proteinexpression von C-IAP1 (Moron-Calvente *et al.*, 2018).

Eine weitere Möglichkeit der Zelle mit ER-Stress oder DNA-Schäden umzugehen, ohne direkt den programmierten Zelltod einzuleiten, ist die Autophagie. Hierbei werden zytoplasmatische Komponenten wie Proteine und Nukleotide, aber auch Organellen wie Mitochondrien durch Lysosomen degradiert. Neben der Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebemöostase ist die Autophagie ein wichtiger Prozess in der Entwicklung, der Immunität, der Prävention menschlicher Krankheiten und bei der Selbsterneuerung von Stammzellen sowie ihrer Differenzierung (Chang, 2020). Die wichtige Rolle der Autophagie während der Differenzierung zeigen Versuche mit Beclin 1-defizienten Mäusen, die schon früh in der Embryogenese verstarben (Yue *et al.*, 2003). In *in vitro* Differenzierungen führt eine Stimulierung der Autophagie in Zellen, die den Endothelzellmarker CD146 tragen, nicht nur zu einer erhöhten Expression von Beclin 1 in differenzierten EC und CM, sondern auch zu einer stärkeren mRNA Expression der zelltypspezifischen Markergene VE-Cadherin, von Willebrand Faktor (vWF) und kardialem Troponin I. Eine Inhibierung der Autophagie bewirkte eine Hemmung von VE-Cadherin und kardialem Troponin I (Hassanpour *et al.*, 2020). Eine erhöhte mRNA Expression von Beclin 1 (Becn1) in aus mESC differenzierten CM wurde im Vergleich zu mESC auch in dieser Arbeit beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Autophagie zumindest bei der mESC Differenzierung zu CM eine Rolle spielt.

Die Regulation des Zellzyklus muss ebenfalls an die aktuell vorherrschende (Stress-) Situation im Organismus angepasst sein. So ist es nicht verwunderlich, dass undifferenzierte Zellen eine andere Zellzyklusverteilung in Bezug auf die Länge der G1-

Phase aufweisen als differenzierte Zellen (White and Dalton, 2005). Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch drei wesentliche Proteine, den Cyclin-abhängigen Proteinkinasen (CDKs, *cycline-dependent protein kinase*), Cyclinen und Cyclin-abhängigen Proteinkinaseinhibitoren (CKIs) (Gillett and Barnes, 1998). Die höhere Proliferationsrate von Stammzellen gegenüber somatischen Zellen wird während des gesamten Zellzyklus durch die hohe Aktivität der Cyclin A und E und der CDK2 gewährleistet (Stead *et al.*, 2002). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei den kardiovaskulären Differenzierungen von mESC zu EC und CM eine herunterregulierte mRNA Expression von Cyclin A1 (*Ccna1*) beobachtet werden. Die differenzierten EC zeigten im Vergleich zu mESC zusätzlich eine verminderte mRNA Expression von Cyclin E1 (*Ccne1*). Cyclin E bewirkt den Übergang der Zelle in die S-Phase, wo es anschließend degradiert wird und Cyclin A die DNA-Synthese einleitet. Somit stimmen die hier gewonnen Daten mit denen aus der Literatur überein, dass mESC eine stärkere mRNA Expression von Cyclin A und E zeigen. Die erhöhte mRNA Expression der Cyclin-abhängigen Proteinkinaseinhibitoren 1A (*Cdkn1a*) und 1B (*Cdkn1b*) sowie von ATM in differenzierten CM deutet auf eine unterschiedliche Zellzyklusverteilung von undifferenzierten und differenzierten Zellen hin. *Cdkn1a* bindet an CDK2 und inhibiert damit ebenfalls die Cyclin A oder E, was zu einem G1-Arrest der Zelle führt (Niculescu *et al.*, 1998; Gartel and Radhakrishnan, 2005). Auch *Cdkn1b* bindet an den Cyclin E-CDK2 Komplex, inhibiert diesen und es kommt ebenfalls zu einem G1-Arrest der Zelle (Sato and Kaida, 2016). Dieser G1-Arrest in differenzierten CM stimmt mit der Tatsache überein, dass ES-Zellen ein funktionaler G1-Kontrollpunkt, durch eine teilweise Sequestration von p53 im Zytoplasma und dem Verlust von p21 (*Cdkn1a*) und *Mouse double minute 2 homolog* (*Mdm2*), welche den G1-Arrest induzieren, fehlt (Aladjem *et al.*, 1998; Tichy and Stambrook, 2008). Aus mESC differenzierte EC zeigten eine verringerte mRNA Expression der Checkpointkinase 2 (*Chk2*), welche bei Auftreten von DNA-Schäden durch ATM und auch *ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related* (ATR) aktiviert wird (Matsuoka *et al.*, 2000). Dabei wird der Zellzyklus angehalten und Reparaturmechanismen eingeleitet. Die verringerte *Chk2* mRNA Expression in differenzierten EC könnte auf eine, im Vergleich zu mESC, langsamere Reaktion auf DNA-Schäden oder eine geringere Kapazität der DNA-Schadensantwort hinweisen.

Zur DNA-Schadensantwort gehören auch verschiedene DNA-Reparaturmechanismen, deren beteiligte Gene unterschiedlich stark in mESC und daraus differenzierten EC und CM auf mRNA-Ebene exprimiert wurden. Für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) verwenden beispielsweise mESC und hESC vorwiegend die homologe

Rekombination (HR), während somatische bzw. differenzierte Zellen DSBs bevorzugt mittels der nicht-homologen End-Verknüpfung (NHEJ, *non-homologous end-joining*) reparieren (Adams *et al.*, 2010; Stambrook and Tichy, 2010; Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2012). Vergleichbare Ergebnisse lieferten Untersuchungen an hämatopoetischen Stammzellen (Kraft *et al.*, 2015; Biechonski *et al.*, 2018). Rad51, ein Hauptregulator der HR, wurde in der vorliegenden Arbeit in differenzierten EC im Vergleich zu mESC auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Eine verminderte Rad51 Proteinexpression wurde auch in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF, *mouse embryonic fibroblast*) bei vergleichenden Analysen mit mESC beobachtet (Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2012). Während der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus werden DSBs sogleich durch die HR repariert, wohingegen die NHEJ überwiegend in der G0/G1-Phase agiert (Christmann *et al.*, 2003). Bei der HR bindet Rad51 in der Nähe der DSBs und vermittelt die Interaktion mit einer homologen Region eines unbeschädigten DNA-Moleküls, welche einen Strang-Austausch zur Folge hat und als Template zur Reparatur dient (Christmann *et al.*, 2003). *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4* (Xrcc4) bildet mit der DNA-Ligase IX (Lig4) einen stabilen Komplex, welcher bei der NHEJ die unterbrochenen Enden eines DNA-Moleküls bei einem DSB wieder verbindet (Christmann *et al.*, 2003). Sowohl differenzierte EC als auch CM zeigten in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation von Xrcc4, welches maßgeblich an der Reparatur von DSBs durch die NHEJ beteiligt ist. Zusätzlich exprimierten die differenzierten CM verstärkt Lig4 auf mRNA-Ebene, welche ebenfalls bei der DNA-Reparatur durch NHEJ eine Rolle spielt. Somit deuten die in dieser Arbeit erhobenen Befunde darauf hin, dass mit einer zunehmenden kardiovaskulären Differenzierung der mESC die Fähigkeit zur DNA-Reparatur mittels NHEJ zunimmt und die der Reparatur mittels HR zumindest in EC abnimmt. Diese Annahme könnte durch Analyse der Proteinexpression von Rad51 und Xrcc4 in fortführenden Arbeiten bestätigt werden.

Während differenzierte Zellen vornehmlich DSBs über die NHEJ reparieren, können bislang keine eindeutigen Aussagen über differenzierungsabhängige Veränderungen anderer DNA-Reparaturfaktoren getroffen werden. Die mRNA Expression von Apex1, einem Faktor der BER wurde in dieser Arbeit nur von differenzierten CM im Vergleich zu mESC hochreguliert. In der Literatur wird sowohl von einer erhöhten BER-Aktivität in undifferenzierten Zellen als auch in differenzierten Zellen berichtet. Beispielsweise wurde die Differenzierung von humanen Monozyten in dendritische Zellen und Makrophagen von einer verstärkten Zunahme der BER-Faktoren Ligase III, *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1* (Xrcc1) und *Poly (ADP-ribose) polymerase 1* (Parp1) begleitet

(Briegert and Kaina, 2007; Bauer *et al.*, 2011). Demgegenüber zeigen hESC im Vergleich zu Fibroblasten eine verstärkte Expression der Ligase III und *Flap structure-specific endonuclease 1* (Fen1) (Maynard *et al.*, 2008). Murine terminal differenzierte Muskelzellen weisen eine verringerte Expression der BER-Faktoren Ligase I, Ligase III und Xrcc1 im Vergleich zu proliferierenden Myoblasten auf (Narciso *et al.*, 2007). Ligase I und Xrcc1 werden auch von mESC im Vergleich zu MEFs verstärkt exprimiert (Tichy *et al.*, 2011). Somit scheinen Differenzierungen nicht zwangsläufig mit einer verringerten BER-Aktivität einherzugehen. Es ist daher zu vermuten, dass differenzierungsabhängige Veränderungen der BER-Kapazität eher zelltypspezifisch stattfinden. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass nur differenzierte CM im Vergleich zu mESC einen BER-Faktor erhöht exprimieren und differenzierte EC keine veränderte mRNA Expression der untersuchten BER-Gene aufzeigten. Zusätzlich wurden keine mRNA Expressionsunterschiede für die BER-Faktoren Xrcc1, Fen1, *N-methylpurine-DNA glycosylase* (Mpg) und *8-oxoguanine DNA-glycosylase 1* (Ogg1) in der vorliegenden Arbeit beobachtet.

Ähnliche Beobachtungen gibt es für die NER-Kapazität von differenzierten Zellen. So wurden sowohl verstärkt als auch verringert exprimierte Faktoren der NER (Ligase 1, Xpa) in hESC im Vergleich zu Fibroblasten (Maynard *et al.*, 2008) und in mESC im Vergleich zu daraus differenzierten EC und glatten Muskelzellen (SMC, *smooth muscle cells*) beobachtet (Xpa, Ercc1, *damage-specific DNA binding protein 2* (Ddb2)) (Hennicke *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten NER-Faktoren zwischen mESC und daraus differenzierten EC und CM gefunden. Diese Unterschiede lassen ebenfalls wie die Beobachtungen bei der BER vermuten, dass Veränderungen in der NER-Kapazität nicht unbedingt differenzierungsabhängig, sondern eher zelltypspezifisch stattfinden.

Neben Suszeptibilitätsfaktoren, die an der DNA-Schadensreparatur beteiligt sind, wurden auch andere Gene untersucht. Die differenzierten kardiovaskulären Zelltypen EC und CM zeigten beide eine verstärkte mRNA Expression von Chemokin (C-X-C Motiv) Rezeptor 4 (Cxcr4), Integrin beta 1 (Itgb1) und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) gegenüber mESC auf. Diese Gene sowie endotheliales Selektin (E-Selektin) und vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1 (Vcam-1), die bei differenzierten CM erhöht exprimiert waren, spielen eine Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten, welche das Gefäßsystem verlassen, um zum Infektionsort zu gelangen (van Buul *et al.*, 2003; Fernandez-Borja *et al.*, 2010). Bei der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen sind

u.a. endotheliale Zelladhäsionsmoleküle wie E-Selektin und Vcam-1 sowie Integrine involviert (Vollmar *et al.*, 1994).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von Suszeptibilitätsfaktoren in differenzierten EC unterscheiden sich trotz gleicher verwendeter Zelllinie von vorherigen Daten (Hennicke *et al.*, 2015). Dies kann daran liegen, dass eine andere Medienzusammensetzung für die Kultivierung der mESC, aufgrund von nicht mehr produziertem und erhältlichem FCS Gold der Firma PAA Laboratories GmbH, verwendet wurde. In den hier durchgeführten Analysen wurde ein leicht höherer FCS-Anteil (12,5 % statt 10 %) dem Medium hinzugegeben und auf eine Zugabe des *Serum replacements* wurde verzichtet. Zusätzlich wurde Glutamax statt des ursprünglich verwendeten L-Glutamin benutzt. Da oftmals nicht genau bekannt ist, welche (Wachstums-) Faktoren in welcher Konzentration in unterschiedlichen Chargen an FCS enthalten sind, könnten diese bereits einen Einfluss auf das basale Genexpressionsprofil der undifferenzierten mESC genommen haben. Damit kann sich nicht nur die mESC Population epigenetisch verändert haben, sondern auch die Ausgangslage für die Endothelzeldifferenzierung und folglich Änderungen in dem basalen Genexpressionsniveau verschiedener Suszeptibilitätsfaktoren.

Zusammenfassend deuten die Änderungen in der mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren der differenzierten Zellen zum einen auf eine modifizierte DNA-Schadensantwortkapazität aufgrund des Verlustes der Pluripotenz hin. Zum anderen spiegeln die beobachteten Änderungen zelltypspezifische Reparatur- und Schadensantwortmechanismen, wie die NHEJ, BER, Zellzyklusregulation und die Apoptose, wider, die mit der Differenzierung einhergehen.

4.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf das Differenzierungspotential von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen

Zur Behandlung einer Vielzahl von Krebserkrankungen, wie Mamakarzinome und Leukämien, wird das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin eingesetzt (Wang *et al.*, 1971; Blum and Carter, 1974). Eine ernstzunehmende und oft lebensbedrohliche Nebenwirkung von Doxorubicin ist eine irreversible und Dosis-abhängige Typ I Kardiotoxizität (Carvalho *et al.*, 2014; Raj *et al.*, 2014), welche die Anwendung limitiert. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität sind jedoch weitgehend unklar. Die Pathophysiologie des durch Doxorubicin verursachten kardialen Schadens ist sehr komplex und verschiedene Mechanismen sind an der Entstehung von

akuten gegenüber chronischen Nebenwirkungen beteiligt (Gewirtz, 1999; Raj *et al.*, 2014). Einen Einfluss auf die Reaktion des Herzens auf eine Anthrazyklin-Behandlung haben neben Kardiomyozyten auch Fibroblasten und Endothelzellen (Wolf and Baynes, 2006; Wilkinson *et al.*, 2016; Zhan *et al.*, 2016; Gambardella *et al.*, 2017), sowie die geringe Anzahl im Herzen vorkommender kardialer Progenitorzellen (De Angelis *et al.*, 2010; Choi and Poss, 2012; Piegari *et al.*, 2013). Es wird vermutet, dass u.a. Stammzellen des Knochenmarks zum regenerativen Prozess des Herzens beitragen (Orlic *et al.*, 2001), da es für tote Kardiomyozyten keinen nennenswerten regenerativen Ersatz gibt. Fibroblasten bilden in dem Fall eine Kollagen-reiche Narbe an der geschädigten Herzmuskelstelle (Choi and Poss, 2012).

Endothelzellen sind durch ihre systemische Barrierefunktion konstant hohen Konzentrationen von toxischen Substanzen und damit Schädigungen ausgesetzt. Durch regenerative Mechanismen erhalten sie die endotheliale Homöostase aufrecht (Wallez and Huber, 2008; Vanhoutte, 2010). Eine unzureichende Reaktion von endothelialen Progenitorzellen auf eine durch Doxorubicin verursachte Schädigung könnte letztendlich regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigen und zur Entstehung chronischer Herzschäden beitragen (Prezioso *et al.*, 2010). Um diese Hypothese zu überprüfen wurden mESC und aus mESC differenzierte kardiovaskuläre Zelltypen (Progenitor- sowie differenzierte EC und CM) vergleichend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Doxorubicin untersucht. Dabei wurden die Zellen für zwei Stunden mit Doxorubicin pulsbehandelt, da in der Klinik zur Krebstherapie Doxorubicin als Infusion verabreicht wird (Gewirtz, 1999). Unter Berücksichtigung der klinischen Situation, bei der initiale Plasmakonzentrationen von 0,3–5 μM Doxorubicin innerhalb einer Stunde auf 25–250 nM absinken (Gewirtz, 1999), wurden entsprechend Doxorubicin-Konzentrationen von bis zu 0,5 μM verwendet.

Bei Betrachtung der Zellmorphologie und Zellviabilität waren Progenitor EC (EC d4), verglichen zu mESC, terminal differenzierten EC sowie Progenitor und differenzierten CM, nach 48 h besonders sensitiv gegenüber Doxorubicin-Pulsbehandlungen. Dies bedeutet, dass eine erhöhte Empfindlichkeit von sich differenzierenden Zellen gegenüber Doxorubicin kein generelles Phänomen ist, sondern von dem spezifischen Differenzierungsprozess abhängt. Unterstützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen in einem anderem Modellsystem. So beeinflusst Doxorubicin die Differenzierung von humanen kardialen Progenitorzellen in Kardiomyozyten und glatte Muskelzellen stark, während die Bildung von Endothelzellen nur mäßig beeinträchtigt wird (Piegari *et al.*, 2013).

Eine weitere Vermutung in diesem Zusammenhang ist, dass es zusätzlich agensspezifische Effekte auf Differenzierungsprozesse gibt. Eine IR-Bestrahlung von gemeinsamen Progenitorzellen von Endothel- und glatten Muskelzellen beeinträchtigt die Entwicklung und Funktionalität der differenzierten Zelltypen nicht (Hennicke *et al.*, 2015). Auch das Potential der osteogenen und adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen bleibt nach einer IR-Behandlung aufrecht erhalten (Nicolay *et al.*, 2013). Analysen der osteogenen Differenzierung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) und multipotenten Knochenmark-Stromazellen nach einer Behandlung mit IR oder dem chemischen Mutagen N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff hatten einen Wirkstoff-spezifischen Effekt auf die Differenzierung (Liedtke *et al.*, 2015). Zusätzlich scheint der Einfluss von genotoxischen Stress auf die Differenzierungseffizienz abhängig vom Zeitpunkt der Schadensinduktion (vor oder während der Differenzierung) zu sein (Liedtke *et al.*, 2015). Dies deutet auf ein Zeitfenster einer erhöhten Schadensanfälligkeit von Stamm- bzw. Progenitorzellen hin. Für diese Annahme würde auch die in dieser Arbeit beobachtete altersabhängig zunehmende Resistenz von CM gegenüber Doxorubicin sprechen, welche im Vergleich zu der von mESC signifikant erhöht war. So wiesen terminal differenzierte CM 48 h nach einer 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung eine deutlich höhere Resistenz als Progenitor CM auf. Eine altersabhängig zunehmende Resistenz gegenüber Doxorubicin wurde auch in humanen Differenzierungsmodellen beobachtet. Studien an aus hiPSC differenzierten 30 Tage-alten (*immature*) und 60 Tage-alten (*relatively mature*) Kardiomyozyten (hiPSC-CM) zeigten eine erhöhte Sensitivität der 30 Tage-alten *immature* hiPSC-CM gegenüber Doxorubicin im Vergleich zu den weiterfortgeschrittenen differenzierten *relatively mature* hiPSC-CM (Cui *et al.*, 2019). Farokhpour und Kollegen analysierten pulsierende EB von aus mESC differenzierten CM sieben Tage nach einer 24 h Doxorubicin-Behandlung der pulsierenden EB (Farokhpour *et al.*, 2009). Während bei Doxorubicin-Konzentrationen von 4,5 μM noch über 80 % funktional pulsierende EB sichtbar sind, führte eine Behandlung mit 5 μM zu nur noch 13 % pulsierenden EB (Farokhpour *et al.*, 2009). Bei humanen aus pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten (hPSC-CM), die hingegen aus einer einschichtigen Differenzierung hervorgingen, wurde nach einer 24 h Doxorubicin-Behandlung eine IC_{50} von 30,1 μM gemessen (Maillet *et al.*, 2016). hiPSC-CM zeigen nach einer 48 h Doxorubicin-Behandlung mit 1 μM eine Viabilität von ca. 45 % auf (Karhu *et al.*, 2020). Die vorgestellten Studien haben unterschiedliche Doxorubicin-Behandlungsbedingungen, Analysezeitpunkte und Differenzierungsprotokolle verwendet (Farokhpour *et al.*, 2009; Maillet *et al.*, 2016; Karhu *et al.*, 2020), sodass ein (Interspezies-) Vergleich mit den vorliegenden auf mESC-basierenden

Daten nicht möglich ist. Für einen Vergleich müssten die Zellen einer Dauerbehandlung von 24 h bzw. 48 h mit Doxorubicin unterzogen werden und direkt im Anschluss analysiert werden. Untersuchungen an hiPSC-CM würden sich für weitere Analysen anbieten. Zudem könnten die Doxorubicin-Konzentrationen erhöht werden, welche dann jedoch deutlich über denen, die in der Klinik verwendeten liegen würden.

Da die Progenitor EC deutlich sensitiver gegenüber der Doxorubicin-Pulsbehandlung sind als alle anderen in dieser Arbeit untersuchten Zelltypen, wurden Progenitor EC genauer untersucht. Zunächst wurde der Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf die Proliferation der Zellen analysiert. Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Progenitor EC und differenzierten EC konnten in Untersuchungen der EdU Inkorporation sowie der Verdopplungszeit der Zellen nicht festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Sensitivität der Progenitor EC gegenüber Doxorubicin unabhängig von ihrer Proliferationsrate ist. Bei den Untersuchungen, welcher Mechanismus für die Überempfindlichkeit der Progenitor EC gegenüber Doxorubicin verantwortlich ist, konnte keine verstärkte Apoptose, im Vergleich zu mESC und differenzierten EC, festgestellt werden. Allerdings zeigten Progenitor EC eine höhere Anfälligkeit gegenüber einer Doxorubicin-induzierten Seneszenz, welche eher zur Inhibierung der Proliferation führt als zum Zelltod. In einer *in vitro* Studie zu Doxorubicin-induzierter Nephropathie mit differenzierten murinen endothelialen Progenitorzellen aus dem Knochenmark wurde gezeigt, dass eine Doxorubicin-Behandlung eine stärkere Stress-induzierte Seneszenz auslöst, als eine Zunahme der Apoptoserate (Yasuda *et al.*, 2010). Auch isolierte humane kardiale Progenitorzellen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, zeigen eine signifikante Abnahme ihrer Proliferation und eine Zunahme der Expression der Seneszenzmarker p16 und β -Galaktosidase (Piegari *et al.*, 2013). Differenzierte Zellen von Doxorubicin-behandelten kardialen Progenitorzellen zeigen ebenfalls Anzeichen einer Seneszenz (Piegari *et al.*, 2013). Untersuchungen an aus Blut isolierten humanen endothelialen Progenitorzellen zeigten, dass die analysierten Zellen nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung eine erhöhte Expression an p21 und vermehrt β -Galaktosidase positive Zellen aufwiesen (De Falco *et al.*, 2016). Des Weiteren führt eine IR-Behandlung von hiPSC differenzierten Keratinozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung an jedem untersuchten Zeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg an p16-positiven Zellen (Miyake *et al.*, 2019). Diese Daten deuten darauf hin, dass sowohl in murinen als auch in humanen Progenitorzellen eine Behandlung mit Genotoxinen, wie Doxorubicin, bevorzugt den Mechanismus der Seneszenz auslöst als den des Zelltods.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Untersuchung der Genexpression verschiedener Endothelzellmarker in differenzierten EC, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC selektive Auswirkungen auf die Proteinexpression hat. Auf die mRNA Expression der analysierten Marker hatte eine Doxorubicin-Behandlung keine Auswirkungen. Während auf mRNA-Ebene steigende Doxorubicin-Konzentrationen keine Verringerung der Expressionsstärke der Endothelzell-zugehörigen Marker bewirkte, war diese auf Proteinebene für Flk1, VE-Cadherin und Pecam1 sichtbar. Daher liegt die Vermutung nahe, dass Doxorubicin die Proteinsynthese oder Mechanismen der post-translationalen Modifikation beeinträchtigt oder eine zeitliche Verzögerung zwischen der mRNA und Proteinakkumulation bewirkt. Auch in LPS-stimulierten murinen dendritischen Zellen wurden Unterschiede zwischen der mRNA- und Proteinexpression beobachtet (Jovanovic *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016b). Eine Verzögerung zwischen mRNA und Proteinakkumulation könnte die beobachtete Abnahme in der Proteinexpression von Endothelzell-zugehörigen Markern in EC nach der 0,2 μ M Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC erklären. Für eine weitere Klärung sind detaillierte Untersuchungen der Kinetik von Transkriptom und Proteom notwendig.

4.2.1 Funktionelle Analysen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen

Morphologische Veränderungen in den differenzierten EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC liefern bereits erste Hinweise auf funktionale Änderungen. Sowohl die Morphologie der Zellen als auch die des Aktin-Zytoskeletts zeigte nach der Behandlung der Progenitor EC, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, eine dosisabhängige Veränderung. Das Aktin-Zytoskelett ist bei der Regulation einer Vielzahl an Zellfunktionen, u.a. der Zelladhäsion und der Motilität, involviert (Symons, 1996; Hall, 1998). Somit könnte bereits eine kurze Pulsbehandlung der Progenitor EC mit Doxorubicin die Funktionalität der überlebenden differenzierten EC beeinflussen. Zu den Hauptregulatoren des Aktin-Zytoskeletts gehören Ras-homologe Guanosin triphosphat-bindende Proteine (GTPasen) (Hall, 1998; Aspenstrom, 1999), welche an Aktin-Zytoskelett-zugehörigen Prozessen wie der Migration und der Zelladhäsion beteiligt sind (Takaishi *et al.*, 1997; Braga, 1999; Ridley, 2015). Des Weiteren wurde berichtet, dass Rho-GTPasen die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beeinflussen (McBeath *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2016; Qu *et al.*, 2016). Neben der veränderten Morphologie der mit Doxorubicin-geschädigten Progenitor EC wurde auch eine leicht erhöhte mRNA Expression der Rho-

GTPasen *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)* und *Cell division control protein 42 homolog (Cdc42)* beobachtet. Dies lässt vermuten, dass die Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC die Aktin-Zytoskelett-zugehörigen Funktionen der überlebenden differenzierten EC durch eine Störung der Funktion von Rho-GTPasen beeinflusst haben könnte. Im Hinblick auf eine mögliche differenzierungsabhängige Änderung der Rho-Aktivität, sollten die oben genannten funktionalen Aspekte, wie Migration oder Zelladhäsion, in nachfolgenden Arbeiten genauer analysiert werden. Die Migration könnte durch einen „Wundheilungsversuch“ analysiert werden. Mithilfe einer Pipettenspitze wird ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen verletzt. Ein Maß für die Migrationsaktivität stellt das Verschließen der „Wunde“ mit der Zeit dar (van der Meer *et al.*, 2010). Die Zelladhäsion kann in EC über die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Zellen, die in der Lage sind an Endothelzellen zu adhären (z.B. Kolonkarzinomzellen), analysiert werden. Nach einer Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Zellen, werden nicht adhären Zellen durch Waschen mit PBS vorsichtig entfernt und die Auswertung erfolgt mittels Mikrotiterplattenlesegerät sowie Fluoreszenzmikroskop (Nubel *et al.*, 2004). Auch ein *knockdown* von Rac1 mittels RNA-Interferenz könnte zeigen, ob Rac1 oder Cdc42 für die Differenzierung eine wichtige Rolle spielt. Es müsste untersucht werden, ob durch den *knockdown* eine Differenzierung von mESC in EC bzw. von Progenitor EC in EC noch möglich ist und wenn ja ob diese Zellen funktional sind.

Eine Endothelzell-spezifische Funktion ist die Freisetzung von Calcium nach der Stimulation von purinergen Rezeptoren mit Adenosintriphosphat (ATP). Die Analyse des Einflusses einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf purinerge Rezeptoren wurde gewählt, da purinerge Signalwege sowohl wichtig für Differenzierungsprozesse (Burnstock and Verkhratsky, 2010; Burnstock and Ulrich, 2011; Zippel *et al.*, 2012) als auch für Endothelzellfunktionen sind (Forsberg *et al.*, 1987; Burnstock, 2017; Burnstock, 2018). ATP wird beispielsweise von Endothelzellen nach Scherstress oder Hypoxie freigesetzt, welches den P2Y-Rezeptor der Endothelzellen anregt Stickstoffmonoxid (NO) freizusetzen (Hopwood *et al.*, 1989; Bodin and Burnstock, 1996; Burnstock, 2017). Anzumerken ist hier, dass extrazelluläres ATP an beide P2-Rezeptor Subtypen binden kann (Burnstock, 1978; Burnstock, 2017; Faas *et al.*, 2017). Sowohl an den Subtyp P2Y, der zu den Guanin-Nukleotid-bindenden Protein (G-Protein) -gekoppelten Rezeptoren gehört, als auch an den Subtyp P2X, der zu der Superfamilie der Transmitter-gesteuerten Ionenkanäle gehört (Khakh and Burnstock, 2009; Burnstock, 2017). P1-Rezeptoren binden ausschließlich Adenosin. In der vorliegenden Arbeit zeigte eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC mit einer hohen

zytotoxischen Konzentration in differenzierten EC eine reduzierte basale Calcium-Freisetzung und eine leicht erhöhte Calcium-Freisetzung nach ATP-Stimulation. Da nur die Bindung von ATP an einen P2Y-Rezeptor zum Ausstrom von intrazellulär gespeichertem Calcium führt (Liang *et al.*, 2008; Khakh and Burnstock, 2009), ist anzunehmen, dass die beobachtete Doxorubicin-bedingte Reduktion des zellulären ATP-Gehalts den purinergen Rezeptor-vermittelten Signalweg zur Calcium-Freisetzung beeinträchtigt hat. Dies bedeutet, dass eine Doxorubicin-Pulsbehandlung in Progenitor EC zu langanhaltenden Fehlfunktionen dieser Signalwege in differenzierten EC führen kann.

Eine weitere charakteristische Funktion von Endothelzellen ist die erhöhte Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Rahmen der Immunantwort bzw. nach der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (Peltz, 1993; Carlos and Harlan, 1994; Nourse *et al.*, 2010). Bei einer Inflammation werden Endothelzellen aktiviert und leiten die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen, wie Leukozyten, zu dem entzündeten Gewebe ein. Dabei ermöglicht eine verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen die Adhäsion und Migration der Leukozyten aus dem Gefäß zum Entzündungsort (Hurairah and Ferro, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit aus mESC differenzierten EC wiesen nach der Stimulation mit den Zytokinen TNF α und IL-1 β eine erhöhte mRNA Expression der Zelladhäsionsmoleküle E-Selektin und Vcam-1 sowie eine signifikante Hochregulation vom Cystein-Cystein Chemokinligand 2 (CCL2) und Icam-1 auf. Eine Untersuchung der mRNA Expression in überlebenden differenzierten EC, deren Progenitor EC mit 0,2 μ M Doxorubicin pulsbehandelt wurden, zeigte eine über zweifach verstärkte basale Expression von Icam-1 und CCL2, verglichen zu unbehandelten Progenitor EC. Die Erhöhung der mRNA Expression deutet darauf hin, dass Doxorubicin-induzierte Schäden in Progenitor EC wahrscheinlich die inflammatorische Antwort der überlebenden differenzierten EC beeinflussen. Eine signifikant erhöhte Menge an CCL2 im peripheren Blut wurde auch in zuvor mit Doxorubicin behandelten Mäusen beobachtet (Sauter *et al.*, 2011). Eine 24 h Behandlung mit Doxorubicin-Konzentrationen von 0,8 μ M bzw. 0,6 μ M führt ebenfalls in humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs) zu einem inflammatorischen Effekt, erkennbar durch die signifikant erhöhte Expression von E-Selektin und Vcam-1 (Abou El Hassan *et al.*, 2003). Endothelzellen regulieren den vaskulären Tonus durch die Sezernierung vasoreaktiver Substanzen, wie NO, Prostacyclin und Endothelin 1 (Hurairah and Ferro, 2004). Eine Pulsbehandlung mit Doxorubicin führte in dem hier vorgestellten Modellsystem zu keiner Hochregulation der NO-produzierenden induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und endothelialen NOS (eNOS). Es wurde berichtet, dass Doxorubicin die

Hochregulation von iNOS und/oder eNOS in *bovine aortic endothelial cells*, H9c2 (Ratten Herzmuskelzelllinie) und *in vivo* (Analyse von Herzgewebsschnitten von Mäusen sowie Ratten) auslöst (Weinstein *et al.*, 2000; Kalivendi *et al.*, 2001; Aldieri *et al.*, 2002; Mohamed and Kassem, 2018). Allerdings wurde auch beobachtet, dass eNOS nach einer Doxorubicin-Behandlung von dreidimensionalen multizellulären Tumorsphäroiden *in vitro* herunterreguliert wird (Oktem *et al.*, 2006). Im Vergleich zu den zuvor genannten Studien, ist die in dieser Arbeit verwendete Doxorubicin-Konzentration gering. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen können zum einen verschiedene Modellsysteme, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Modelle, sein. Zum anderen können unterschiedliche Doxorubicin-Konzentrationen, Behandlungsdauer und Zeitpunkte der Analyse zu den verschiedenen Ergebnissen geführt haben.

Bei *in vitro* Experimenten ist u.a. die Aufnahme von modifiziertem, acetyliertem Lipoprotein geringer Dichte (ac-LDL) ein typischer funktionaler Marker bei der Identifizierung von Endothelzellen (Voyta *et al.*, 1984; Hirschi *et al.*, 2008). Acetyliertes LDL wird jedoch auch von Makrophagen und Monozyten über den *scavenger cell pathway* des LDL Metabolismus aufgenommen (Voyta *et al.*, 1984; Rohde *et al.*, 2006; Hirschi *et al.*, 2008). Allerdings zeigen Endothelzellen im Vergleich zu Makrophagen und Monozyten eine gesteigerte Aufnahme von ac-LDL bzw. des LDL Metabolismus (Asahara *et al.*, 1997). Wie zu erwarten, zeigten die in dieser Arbeit aus mESC differenzierten EC die Fähigkeit ac-LDL aufzunehmen. Undifferenzierte Stammzellen und Progenitor EC (an Tag vier der Differenzierung) besitzen diese Fähigkeit nicht. Die Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC zeigte 48 h später keine beträchtliche Auswirkung auf die Fähigkeit zur Aufnahme von ac-LDL in überlebenden differenzierten EC. Auch hohe zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 0,5 μM beeinträchtigten die Aufnahmefähigkeit nicht. Zytotoxische Doxorubicin-Konzentrationen von 1 μM und 10 μM führen hingegen nach einer 24 h und 72 h Dauerbehandlung von hPSC-EC zu einer verringerten ac-LDL Aufnahme (Ni *et al.*, 2021). Dies deutet darauf hin, dass anhaltende Dauerbehandlungen mit hohen zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen von differenzierten EC ihre Funktionalität beeinträchtigen können. Dies sollte in weiterführenden Analysen untersucht werden.

Diese Daten zeigen, dass das Differenzierungspotential von aus mESC differenzierten Progenitor EC nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung zum einen Dosis-abhängig und zum anderen Funktions-spezifisch beeinflusst bzw. beeinträchtigt wird. Während einige Endothelzell-spezifische Charakteristika und Funktionen (mRNA Expression von Endothelzell-zugehörigen Markergenen, mRNA Expression von Zelladhäsionsmolekülen

nach Zytokin Exposition, Calcium-Freisetzung nach ATP-Stimulation, Aufnahmefähigkeit von ac-LDL) durch Doxorubicin nicht beeinträchtigt waren, wurden andere verändert bzw. gestört (Proteinexpression Endothelzell-zugehöriger Markergene, basale Calcium-Freisetzung, basale mRNA Expression von Zelladhäsionsmolekülen). Da bereits basale Funktionen beeinträchtigt sind liegt die Vermutung nahe, dass eine Doxorubicin-induzierte Schädigung von Progenitor EC zu einer Kardiotoxizität beitragen kann.

4.2.2 Charakterisierung mitochondrialer Funktionen nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Endothel-ähnlichen Progenitorzellen

Im Gegensatz zu anderen zellulären Organellen weisen Mitochondrien mehrere Kopien ihres eigenen Genoms, der mitochondrialen DNA (mtDNA), auf. Damit können mitochondriale Funktionen entweder durch eine Schädigung nukleärer Gene, die für Mitochondrien-Proteine kodieren, oder durch die direkte Schädigung der mtDNA beeinflusst werden. Die Hauptfunktion von Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie für eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Die gelieferte Energie in Form von ATP wird durch oxidative Phosphorylierung über die Elektronentransportkette generiert, deren Proteinuntereinheiten von der mtDNA kodiert werden (Anderson *et al.*, 1981; Bibb *et al.*, 1981; Hebert *et al.*, 2010). Beim Vergleich von undifferenzierten mESC mit differenzierten EC, konnte in der hier vorgelegten Arbeit kein signifikanter Unterschied im relativen Anteil von mtDNA zu genomischer DNA (gDNA) festgestellt werden. Dies wurde ebenfalls für den Vergleich von murinen P19 embryonalen Karzinomstammzellen mit differenzierten Kardiomyozyten (Jin *et al.*, 2014) sowie mit differenzierten embryonalen Karzinomstammzellen berichtet (Vega-Naredo *et al.*, 2014). Somit liegt die Vermutung nahe, dass der relative Anteil von mtDNA zu gDNA in undifferenzierten und differenzierten Zellen sich nicht signifikant unterscheidet und damit in etwa gleich ist.

Bereits in den späten 1990-iger Jahren wurde vermutet, dass Doxorubicin mitochondriale Schäden auslöst (Gewirtz, 1999; Cappetta *et al.*, 2017). Einen ersten Hinweis für eine mitochondriale Schädigung bzw. Fehlfunktion zeigte in der vorliegenden Arbeit die Erhöhung des relativen mtDNA- zu gDNA-Anteils in mESC sowie Progenitor EC 48 h nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,2 μ M. Untersuchungen an isolierter DNA aus Mäuseherzen, bei denen die Tiere zuvor mit Doxorubicin behandelt wurden, weisen ebenfalls einen erhöhten mtDNA/gDNA-Anteil und eine Hyperproliferation der Mitochondrien auf (Henninger *et al.*, 2015). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete

erhöhte mtDNA Menge könnte durch eine beobachtete signifikant erhöhte mRNA Expression von *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC1 α) erklärt werden. PGC1 α ist ein Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese (Puigserver *et al.*, 1998; Jornayvaz and Shulman, 2010). Diese wird durch die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren induziert, was u.a. zur Transkription und Replikation der mtDNA führt (Jornayvaz and Shulman, 2010). Des Weiteren wurde Mitofusin-2 (MFN2) nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung der hier untersuchten Progenitor EC signifikant erhöht in EC exprimiert. MFN2 vermittelt die mitochondriale Fusion der äußeren Mitochondrienmembran (Chen *et al.*, 2003), was auf größere Mitochondrien mit entsprechend höherer mtDNA Menge hinweisen könnte. Die gesteigerte mtDNA Menge konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden. Für eine genauere Analyse der Mitochondrienmorphologie würden sich immunzytochemische Färbungen anbieten, die mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet werden, oder Analysen mittels Durchflusszytometrie (z.B. mit MitoTracker™ Green FM von Thermo Fisher Scientific, Inc.).

mESC zeigten in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu differenzierten EC einen signifikant geringen ATP-Gehalt, was ebenfalls bei embryonalen Karzinomstammzellen im Vergleich zu ihren differenzierten multizellulären Sphäroiden beobachtet wurde (Vega-Naredo *et al.*, 2014). Eine Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC führte nach 48 h zu einer signifikanten Abnahme des zellulären ATP-Gehalts in den überlebenden differenzierten EC. Eine Reduktion des zellulären ATP-Gehalts wurde nach einer Doxorubicin-Behandlung auch *in vitro* bei primären Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen (Du *et al.*, 2017) und bei aus murinen induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierten Kardiomyozyten (Cunha-Oliveira *et al.*, 2018) beobachtet. Sowohl in Doxorubicin-behandelten Rattenkardiomyozyten *in vitro* (Jeyaseelan *et al.*, 1997) als auch in isolierten Kardiomyozyten von Doxorubicin behandelten Ratten (Zhou *et al.*, 2001) wurde eine ATP Reduktion gezeigt. Die beobachtete Doxorubicin-induzierte Reduktion des ATP-Gehalts könnte durch Schädigung der Mitochondrien zustande gekommen sein, die in einer dysfunktionalen mitochondrialen Respiration resultieren. Eine dysfunktionale mitochondriale Respiration würde weniger ATP generieren, wodurch der zelluläre ATP-Gehalt sinkt. Untersuchungen an isolierten Mitochondrien aus dem Herzgewebe von zuvor mit Doxorubicin behandelten Mäusen und neonatalen Ratten zeigten eine dysfunktionale mitochondriale Respiration auf (Abdullah *et al.*, 2019).

Mit Hilfe des *Seahorse* Verfahrens kann die Aktivität der mitochondrialen Atmungskette analysiert werden, welche Aufschluss über den mitochondrialen Energiemetabolismus der

Zelle liefert. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Mito Stress Test im *Seahorse* Verfahren misst nur Parameter mitochondrialer Funktionen. Daher ist davon auszugehen, dass Änderungen des zellulären ATP-Gehalts durch veränderte mitochondriale ATP Produktionsraten zustande gekommen sind. Zudem ist bekannt, dass undifferenzierte Zellen ihre Energie über die Glykolyse beziehen, während differenzierte den mitochondrialen Prozess der oxidativen Phosphorylierung aktivieren (St John *et al.*, 2005; Varum *et al.*, 2011; Shum *et al.*, 2016), weshalb der Mito Stress Test gewählt wurde. Da ATP sowohl aus der Glykolyse als auch aus der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien generiert werden kann, müsste dieser Aspekt in fortführenden Arbeiten genauer untersucht werden. Dafür bietet sich eine vergleichende Analyse mittels Mito Stress Test und Glykolyse Stress Test im *Seahorse* Verfahren an. Dort sollten mESC eine stärkere Glykolyse aufweisen als EC. Die in dieser Arbeit gemessenen Daten mittels Mito Stress Test zeigten, dass differenzierte EC grundsätzlich eine höhere Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, *oxygen consumption rate*) aufweisen als undifferenzierte mESC. Dies stimmt mit der Literatur überein, da differenzierte Zellen bekanntermaßen eine höhere basale Sauerstoffverbrauchsrate aufweisen (Vega-Naredo *et al.*, 2014). Für die in der vorliegenden Arbeit im *Seahorse* Verfahren gemessenen Parameter der basalen Respiration und der freien respiratorischen Kapazität wurden ähnlich hohe Verhältnisse und Tendenzen beobachtet, wie bei der vergleichenden Analyse von hESC mit aus hESC differenzierten Fibroblasten (Varum *et al.*, 2011). Auch beim Vergleich von hiPSC mit aus hiPSC differenzierten Hepatozyten zeigen letztere eine deutlich höhere basale Respiration und freie respiratorische Kapazität (Jing *et al.*, 2018). Ebenso weisen mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks während der osteogenen Differenzierung eine höhere OCR auf als undifferenzierte Zellen (Shum *et al.*, 2016). Die höhere OCR in differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten resultiert aus der Energiegenerierung über den mitochondrialen Prozess der oxidativen Phosphorylierung (St John *et al.*, 2005; Varum *et al.*, 2011; Shum *et al.*, 2016). Die Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC war mit einer Dosis-anhängigen Abnahme der untersuchten mitochondrialen Parameter in den überlebenden differenzierten EC verbunden. Eine 24 h Doxorubicin-Behandlung (1 μ M) von H9c2 Ratten Kardiomyozyten (Zelllinie) (Cheung *et al.*, 2015) und eine 48 h Behandlung von HUVEC (He *et al.*, 2019) führt ebenfalls zu einer Abnahme der in dieser Arbeit untersuchten Parameter der basalen Respiration, der freien respiratorischen Kapazität und der ATP Produktion. Auch *in vivo* führt eine akute sowie chronische Doxorubicin-Behandlung zu einer Abnahme der basalen Respiration (Abdullah *et al.*, 2019). Diese Daten zeigen, dass die hier verwendeten Doxorubicin-Konzentrationen zu mitochondrialen

Funktionsschäden führen. Diese können durch eine Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien entstehen (Ichikawa *et al.*, 2014). Die Funktionsschäden könnten auch durch die Bildung von Addukten von Doxorubicin mit der mtDNA entstehen. Nach Akkumulation der Addukte kommt es zur Bildung von ROS oder zur Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung (Pereira *et al.*, 2011). Die Bildung von ROS könnte über eine fluoreszenzbasierte Messung von 2',7'-Dichlorfluorescein (DCF) in einem Mikrotiterplattenlesegerät erfolgen (Wang and Roper, 2014). Die in den Mitochondrien lokalisierte DNA Topoisomerase II- β (TopoII β) wird durch Doxorubicin gehemmt, was zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt (Kaufmann and Hancock, 1995; Gewirtz, 1999). Neben einer Analyse der Proteinexpression von TopoII β kann auch die Expression des DSB-Markers γ H2AX auf Proteinebene untersucht werden, um diesen Mechanismus von Doxorubicin weiter zu untersuchen. Zusätzlich kann die mRNA Expression von Bestandteilen der Atmungskette, wie NADH-Dehydrogenase oder Succinat-Dehydrogenase, mittels RT-PCR untersucht werden.

4.2.3 Expressionsanalyse ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren nach Doxorubicin-Pulsbehandlung von aus mESC differenzierten Progenitor EC

Inwieweit eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC die Genexpression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren in überlebenden differenzierten EC beeinflusst, wurde mittels quantitativer *real-time* PCR Analyse untersucht. Besonders die höhere Doxorubicin-Konzentration von 0,2 μ M führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA Expression des antioxidativen Markers Thioredoxin Reduktase 1 (Txnrd1), des Autophagiemarkers Autophagie-zugehöriges 7 Homolog (Atg7) und der Apoptosemarker Bcl2 und Caspase 2 (Casp2). Eine leichte Tendenz einer erhöhten mRNA Expression von antioxidativen Markergenen, u.a. Txnrd1, wurde ebenfalls in isolierten Mäuseherzen von zuvor mit Doxorubicin behandelten Tieren gefunden (Henninger *et al.*, 2015). Da die anderen in dieser Arbeit untersuchten Gene, die für antioxidative Enzyme und deren Regulatoren kodieren, nicht relevant verändert wurden, ist fraglich, ob die verwendeten Doxorubicin-Konzentrationen zu einer Induktion von ROS geführt haben. Möglicherweise waren die durch Doxorubicin-induzierten Mengen an ROS unterhalb eines Schwellenwerts, der für eine verstärkte Expression der untersuchten Gene notwendig ist. Weiterführende Analysen, die den ROS-Gehalt der Zellen bestimmen, könnten zeigen, ob die in dieser Arbeit verwendeten Doxorubicin-Konzentrationen zu einer Induktion von ROS geführt haben (z.B. mittels fluoreszierenden DCF (Wang and Roper, 2014)). Die erhöhte mRNA Expression von

Atg7 lässt auf eine verstärkte Autophagie nach einer Doxorubicin-Behandlung von Progenitor EC schließen. Die Autophagie ist ein wichtiger Prozess, um toxische Proteinaggregate, die durch oxidativen Stress entstanden sind, zu entfernen. Zudem zeigten Endothelzell-Atg7-defiziente Mäuse nach einer Doxorubicin-Behandlung einen verstärkten kardialen Schaden, welcher die Wichtigkeit des Atg7-Proteins bzw. der Autophagie, ein konservierter Prozess zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion, verdeutlicht (Luu *et al.*, 2021).

Auch die an der Apoptose beteiligten Gene zeigten einheitlich eine leichte Tendenz zur verstärkten mRNA Expression nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC. Bcl2 und Casp 2 wurden dabei signifikant erhöht exprimiert. Zellen erkennen DNA-Schäden, wie DSBs, und leiten daraufhin entweder einen Zellzyklusarrest ein, um die DNA-Reparatur zu verstärken, oder den programmierten Zelltod, die Apoptose (Roos and Kaina, 2013). Nach einem DNA-Schaden wird Casp 2 aktiviert und kann sowohl die Apoptose als auch einen Zellzyklusarrest einleiten (Bouchier-Hayes and Green, 2012), was ihre signifikant erhöhte mRNA Expression nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,2 μM erklärt. Zusammen mit der beobachteten Induktion des Zelltods, wird Casp 2 in geschädigten Progenitor EC vermutlich eher die Apoptose eingeleitet haben. In künftigen Analysen sollte die Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie bezüglich eines Zellzyklusarrestes in Form eines G1- oder G2-Blocks untersucht werden. Zusätzlich kann eine Untersuchung der Phosphorylierung von Proteinen, wie p53, Chk1 und Chk2 Informationen über ihren Aktivierungsstatus bzgl. des Zellzyklus und über die Einleitung der DNA-Schadensantwort liefern.

Die mRNA Expression einiger Gene, die bei der DNA-Reparatur beteiligt sind, wurden nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,2 μM in Progenitor EC sowohl signifikant erhöht (z.B. *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1* (Ercc1), *X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1* (Xrcc1)), als auch signifikant herunter reguliert (z.B. Schadens-spezifische DNA-bindende Protein 2 (Ddb2, *damage-specific DNA binding protein 2*), DNA Topoisomerase II- α (TopoII α)). Die erhöhte mRNA Expression von Xrcc1 deutet auf eine erhöhte DNA-Reparatur durch die BER hin. Vertreter der NER wurden hingegen sowohl verstärkt (Ercc1) als auch verringert (Ddb2) nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf mRNA-Ebene exprimiert. Ddb2 ist an der DNA-Schadenserkennung, v.a. von UV-Schäden, beteiligt und Ercc1 bei der Entfernung der Läsion. Allerdings ist Ercc1, das als Komplex mit *Xeroderma pigmentosum complementation group F* (Xpf) agiert, auch bei Reparaturwegen von DSBs und DNA-Strangverknüpfungen beteiligt (Faridounnia *et al.*, 2018). Dies könnte eine

Erklärung für die erhöhte mRNA Expression sein, da Doxorubicin auch DNA-Querverbindungen (Strangverknüpfungen) generiert (Gewirtz, 1999).

Während Topoll α eine signifikant verringerte mRNA Expression nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung der Progenitor EC in differenzierten EC aufwies, wurde keine signifikante Expressionsänderung der Topoll β in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Die in den Mitochondrien-lokalisierte Topoll β ist für die Doxorubicin-induzierte Kardiotoxizität von großer Bedeutung, da im Herzen nur Topoll β exprimiert wird und eine Hemmung der Topoll β in DSBs resultiert und das Herz schädigt (Lyu *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012). Eine Doxorubicin-Behandlung von primären humanen Kardiomyozyten *in vitro* zeigt hingegen eine verringerte Topoll β Proteinexpression (Jiang *et al.*, 2018). In dieser Studie wurden jedoch ein anderes Modellsystem, höhere Doxorubicin-Konzentrationen sowie ein anderes Behandlungsschema gewählt. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass Topoll β in den hier differenzierten kardiovaskulären Zelltypen im Vergleich zu mESC verstärkt exprimiert wurde.

Da die mRNA Expression von einigen Suszeptibilitätsfaktoren, die in der Regulation von antioxidativen Mechanismen, Autophagie, Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt sind, nach einer Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC in differenzierten EC verändert war, lässt dies auf bleibende, pleiotrope Änderungen in der Genexpression schließen.

4.2.4 Reparaturfähigkeit von DNA-Doppelstrangbrüchen in mESC, Progenitor EC und differenzierten EC nach Doxorubicin-Pulsbehandlung

Abschließend wurde die Sensitivität von mESC, Progenitor EC und differenzierten EC gegenüber Doxorubicin, sowie ihre Fähigkeit die entstanden DSBs zu reparieren, vergleichend untersucht. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung (IR, *ionizing irradiation*), eine prototypische Noxe für die Induktion von DSBs und Aktivierung der DDR (Vignard *et al.*, 2013), behandelt. Als Surrogatmarker für DSBs wurde die Bildung nukleärer phosphorylierter (an Serin 139) Histon H2AX (γ H2AX) -Foci (Rogakou *et al.*, 1998; Olive, 2004; Lobrich *et al.*, 2010; Valdiglesias *et al.*, 2013) mittels immunzytochemischer Färbungen analysiert. Zusätzlich wurde ein weiterer DNA-DSB-Indikator, das P53-bindende Protein 1 (53BP1) (Schultz *et al.*, 2000; Mochan *et al.*, 2004; Panier and Boulton, 2014), sowie die daraus entstehenden kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci betrachtet. Generell wurden mehr γ H2AX- als 53BP1-Foci und damit kolokalisierte Foci pro Zelle detektiert, weil sich die einzelnen Zellen in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden und 53BP1

dort unterschiedlich stark exprimiert bzw. detektiert wird (Nakamura *et al.*, 2010). Zusätzlich sind 53BP1-Foci indikativ für die Reparatur von DSBs über die NHEJ (Panier and Boulton, 2014; Zimmermann and de Lange, 2014). Differenzierte Zellen reparieren DSB überwiegend mittels NHEJ, während undifferenzierte die HR nutzen (Tichy and Stambrook, 2008; Adams *et al.*, 2010; Stambrook and Tichy, 2010; Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2011; Tichy *et al.*, 2012). Dennoch sind ähnliche Tendenzen zwischen γ H2AX- und kolokalisierten Foci zu erkennen.

Die Untersuchung der basalen DSBs, welche nicht durch Genotoxine induziert wurden, ergeben keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an nukleären γ H2AX-Foci in mESC, Progenitor EC und EC. mESC zeigten eine leicht höhere Anzahl an basalen γ H2AX-Foci im Vergleich zu EC, welche auf einen höheren replikativen Stress, der sich selbsterneuernden Stammzellen hinweisen könnte. Die mRNA Expression der Cycline A und E sowie Chk2 war in EC verringert, was auf einen reduzierten replikativen Stress in differenzierten EC hindeutet. Verschiedene Studien berichten, dass das (DNA) Topoisomerase II-bindende Protein 1 (TopBP1), ein Schlüsselaktivator von ATR (Kumagai *et al.*, 2006; Cimprich and Cortez, 2008; Mordes *et al.*, 2008), vor replikativen DNA-Schäden schützt, indem es die genomische Integrität von frühen neuronalen Progenitorzellen während der murinen Neurogenese gewährleistet (Lee *et al.*, 2012c). Ob TopBP1 die genomische Stabilität von Progenitor EC sicherstellt, ist nicht bekannt. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit eine hochregulierte mRNA Expression der Isoform TopoII β in EC (und CM) im Vergleich zu mESC beobachtet werden.

Eine Behandlung mit Doxorubicin und IR ging mit einer Zunahme an DSBs in allen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelltypen einher. Eine Bestrahlung mit 2 Gy führte zu einer vergleichsweise hohen Anzahl an DSBs wie bei einer Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,5 μ M. Die größte Induktion an DSBs wurde unmittelbar (0 h) nach einer 2 h Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 1 μ M von Progenitor EC beobachtet. Während bei den einzelnen Doxorubicin-Behandlungen eine zeitabhängige Zunahme in der Anzahl der DSBs in mESC und differenzierten EC zu sehen war, zeigten Progenitor EC die größte Anzahl an DSBs nach 6 h und danach (nach 48 h) eine reduzierte Anzahl an γ H2AX- und kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci, was die Reparatur der DSBs widerspiegelt. Interessant ist, dass die Progenitor EC als einzige eine Reparatur der Doxorubicin-induzierten DSBs nach 48 h anhand der kolokalisierten γ H2AX/53BP1-Foci zeigen. mESC reparieren ihre DSBs lediglich nach einer Behandlung mit 0,05 μ M Doxorubicin. Die IR-induzierten DSBs wurden von allen drei Zelltypen zeitabhängig fast vollständig repariert. Ein Vergleich von mESC und MEFs

zeigte, dass mESC IR-induzierte DSBs schneller reparieren (Tichy and Stambrook, 2008). Allerdings gibt es auch Studien, die von einer langsameren Reparatur von IR-induzierten DSBs in hESC im Vergleich zu neuronalen Progenitorzellen und Astrozyten berichten (Adams *et al.*, 2010). Eine langsamere Reparatur der DSBs anhand der Anzahl an γ H2AX-Foci in Stammzellen wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit für mESC im Vergleich zu Progenitor EC beobachtet. Hohe IR-Dosen bewirkten in hESC eine verstärkte Einleitung der Apoptose, während aus ihnen differenzierte neuronale Stammzellen vermehrt die Seneszenz einleiteten oder zu Astrozyten differenzierten (Zou *et al.*, 2012). Auch die Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC bewirkte eine erhöhte mRNA Expression der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Seneszenz-assoziierten Marker IL-8, p16, p21, p53 und β -Galaktosidase.

Eine mögliche Erklärung für die nicht detektierbare Reparatur bzw. Abnahme der DSBs in mESC und differenzierten EC 48 h post-Behandlung könnten die gewählten Analysezeitpunkte sein. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse der Foci die Zeitpunkte 0 h, bzw. 30 min nach IR, 6 h und 48 h nach der Genotoxin-Behandlung gewählt. Andere Studien analysierten die Foci bereits zu früheren Zeitpunkten nach der Genotoxin-Behandlung und wählten als letzten Analysezeitpunkt 6 h (Hennicke *et al.*, 2015) oder 24 h (Adams *et al.*, 2010) nach der DSB-Induktion. Für Folgestudien sollten auch frühere Analysezeitpunkte nach einer Genotoxin-Behandlung in Betracht gezogen werden, um eine mögliche bereits vorhandene, verstärkte Induktion der Foci- oder Reduktion der Foci-Anzahl zu überprüfen. Zusätzlich könnten DSBs mittels immunzytochemischer Färbung von Rad51- oder p-(S1981) ATM-Foci untersucht werden, um weitere Informationen bezüglich der DNA-Reparatur zu erhalten. In diesem Zuge könnte ebenfalls mittels Western Blot Verfahren die Proteinexpression von γ H2AX analysiert werden. Des Weiteren sollten die Proteinexpressionen von DNA-Reparaturfaktoren, wie z.B. Rad51, Xrcc4, Brca1 untersucht werden. Auch die Analyse des Phosphorylierungsstatus von p53, Chk1, Chk2, Kap1 und *Structural maintenance of chromosomes protein 1* (Smc1) mittels Western Blot wird weitere Auskünfte über die Aktivierung der DDR in den untersuchten Zelltypen geben.

Die Daten zeigen, dass die untersuchten mESC, Progenitor EC und differenzierten EC eine qualitativ und quantitativ unterschiedliche Fähigkeit zur Reparatur von Doxorubicin-induzierten DSBs aufweisen. Progenitor EC begannen zwischen 6 h und 48 h nach der DSB-Induktion mit der Reparatur der DSBs, während mESC und EC dies nicht taten. Dies deutet auf eine effizientere DSB-Reparatur der Progenitor EC hin, welche gleichzeitig eine deutlich geringere IC_{50} für Doxorubicin aufzeigten. Obwohl die wenigen Progenitor EC, die

eine Doxorubicin-Behandlung überlebten die Schäden reparierten, zeigten sie vereinzelte Dysfunktionen in den differenzierten EC. Somit scheint die Reparatur nicht ausreichend zu sein, um die Differenzierungseffizienz sowie die Funktionalität der Zellen zu gewährleisten. Folglich könnten regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigt werden und Progenitor EC für die Pathophysiologie einer Doxorubicin-induzierten Kardiotoxizität bedeutsam sein.

4.3 Endothelzellendifferenzierung humaner induzierter pluripotenter Stammzellen

Die Verwendung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) als *in vitro*-Modellsystem für die toxikologische und pharmazeutische Forschung sowie die regenerative Medizin hat einige Vorteile. Neben den bereits genannten Vorteilen gegenüber immortalisierten Zelllinien und Primärkulturen (Wobus and Loser, 2011), können mögliche interspeziesunterschiede bei der Verwendung von mESC Modellsystemen ausgeschlossen werden. Auch werden die bestehenden ethischen Bedenken bei der Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen (hESC, *human embryonic stem cells*) mit einem hiPSC-Modellsystem umgangen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine direkte Differenzierungsmethode von hiPSC in Endothel-ähnliche Zellen (hEC) etabliert.

Wie bei *in vitro* Differenzierungen von mESC, muss auch für die Differenzierung von hiPSC eine homogene, undifferenzierte hiPSC Population vorliegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu ermöglichen. Diese Ausgangslage wird durch die Verwendung eines speziellen Stammzellmediums, hier StemMACS, erreicht. Die Zugabe des *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase* (ROCK) -Inhibitors (bekannt als Y-27632) nach dem Aussäen der Zellen zu dem Medium, erhöht das Überleben von abgelösten (und vereinzelt) Stammzellen durch die Blockierung der Dissoziations-induzierten Apoptose (Watanabe *et al.*, 2007). Für die Differenzierung wurde Wachstumsfaktor-reduziertes (GFR, *Growth Factor Reduced*) -Matrigel verwendet, um auszuschließen, dass im Matrigel enthaltene Wachstumsfaktoren den Differenzierungsprozess beeinflussen.

Für die Differenzierung in hEC wurde ein modifiziertes Protokoll von Liu und Kollegen verwendet (Liu *et al.*, 2016a), welches auf der Zugabe von definierten Wachstumsfaktoren und niedermolekularen Verbindungen an bestimmten Zeitpunkten zum Medium beruht. Bei dieser direkten Differenzierung wird durch die Zugabe von GSKi am zweiten Tag der WNT/ β -Catenin Signalweg aktiviert und das mesodermale Schicksal der Zellen eingeleitet (Lian *et al.*, 2014). Im letzten Schritt wurde die Endothelzellendifferenzierung aus den mesodermalen Zellen am Tag vier durch Verwendung des *endothelial cell basal medium*

(ECBM) mit den Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF initiiert. bFGF und VEGF sind *in vitro* Auslöser für die Angiogenese (Pepper *et al.*, 1992) und sind zusammen mit VEGFR an der Differenzierung zu Endothelzellen und der Vaskulogenese von entscheidender Bedeutung (Risau and Flamme, 1995). Mit dem verwendeten Differenzierungsprotokoll zeigten die Zellen sechs Tage nach Beginn der Differenzierung eine für Endothelzellen charakteristische kopfsteinpflasterförmige Morphologie.

Die endotheliale Identität der aus hiPSC differenzierten hEC wurde über die Expression von Stammzell- sowie Endothelzell-spezifischen Markergenen auf mRNA- und auf Proteinebene nachgewiesen. Im Vergleich zu hiPSC, zeigten die in dieser Arbeit differenzierten hEC eine deutlich verringerte mRNA Expression von Nanog und Oct3/4, welche eine wichtige Rolle bei der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von Stammzellen spielen. Demnach weisen hEC diese typischen Stammzeleigenschaften nicht mehr auf. Sie exprimierten verstärkt die prototypischen Endothelzellmarker Pecam1 und VE-Cadherin auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Flk1 und vWF wurden ebenfalls verstärkt auf mRNA-Ebene exprimiert. Es wurden teilweise deutlich höhere mRNA Expressionen dieser Markergene in den hier differenzierten hEC erzielt als im Originalprotokoll, welches neben einer weiteren EC Amplifizierungsphase noch eine abschließende Zellsortierung beinhaltet (Liu *et al.*, 2016a). Zusätzlich wurden dort die relative mRNA Expression der Endothelzell-Markergene gegenüber Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) dargestellt und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, gegenüber der Expression dieser Markergene in undifferenzierten hiPSC.

Da dieses Differenzierungssystem für die hiPSC-Linie b4 etabliert wurde, wurden die differenzierten hEC hinsichtlich der Expression auf weitere Endothelzellmarker untersucht, um die Zellen weiter zu charakterisieren. Wie auch bei Liu und Kollegen (Liu *et al.*, 2016a) wurde der arterielle Endothelzellmarker Ephrin B2 (Efnb2), ein Ligand des Ephrin Typ-B Rezeptors 4 (Ephb4), deutlich verstärkt gegenüber dem venösen Marker Ephb4 auf mRNA-Ebene exprimiert. Während Efnb2 ausschließlich in Arterien exprimiert wird, ist Ephb4 exklusiv in Venen exprimiert (Wang *et al.*, 1998). Dennoch werden beide Ephrine für die Angiogenese benötigt (Wang *et al.*, 1998).

hEC zeigten im Vergleich zu hiPSC eine erhöhte mRNA Expression des *tight junction* Markers Claudin5 und des *gap junction* Markers Connexin40, die ebenfalls von Endothelzellen exprimiert werden. Connexin40 wird im vaskulären Endothelium und großen Arterien exprimiert (Bruzzone *et al.*, 1993). Die Expression von Connexin40 in Arterien deckt

sich mit der erhöhten Efnb2 mRNA Expression der in dieser Arbeit differenzierten hEC. Auch der Nachweis von Claudin5 in den differenzierten hEC auf mRNA-Ebene bestätigt die erfolgreiche Differenzierung der hiPSC in hEC, da Claudin5 eine Endothelzell-spezifische Komponente von *tight junctions* ist (Morita *et al.*, 1999).

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass in der vorliegenden Arbeit mit dem verwendeten Differenzierungsprotokoll morphologisch charakteristische humane Endothel-ähnliche Zellen aus den hiPSC differenziert wurden. Prototypische Endothelzell-spezifische humane Markergene wurden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Somit ist dieses *in vitro* Modell für toxikologischen Studien zur Analyse des Einflusses von Chemikalien/Genotoxinen auf Differenzierungsprozesse geeignet.

4.3.1 Basale Expressionsanalyse von Suszeptibilitätsfaktoren in differenzierten hEC

Mittels Microarray wurde die Genexpression von undifferenzierten hiPSC gegenüber aus hiPSC differenzierten hEC analysiert. Im Folgenden werden einige Gene von hEC genannt, die sich in ihrer Expression um den Faktor 100 von hiPSC unterscheiden und den differenzierten Zustand der hEC reflektieren. Die verringerte Expression der Stammzellfaktoren Nanog (Chambers *et al.*, 2003) und Oct4 (POU5F1) (Niwa *et al.*, 2000), sowie dem *apelin receptor early endogenous ligand* (LOC100506013), der für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von hESC verantwortlich ist (Miura *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2015), verdeutlichen den Verlust der typischen Stammzeleigenschaften in den differenzierten hEC.

Zu den verstärkt exprimierten Genen der hEC gehörte das Endothelzell-spezifische Molekül 1 (ESM1), welches überwiegend von humanen Endothelzellen aus der Lunge sowie der Niere exprimiert und durch Zytokine reguliert wird. ESM1 fungiert in der Endothelzell-Leukozyten-Interaktion sowie der Lymphangiogenese (Lassalle *et al.*, 1996; Shin *et al.*, 2008). *Ankyrin Repeat Domain 1* (ANKRD1) spielt eine Rolle bei der Endothelzell-Aktivierung durch IL-1 und TNF α (Chu *et al.*, 1995) und ist somit ebenfalls spezifisch für Endothelzellen, wie den hier differenzierten hEC. Zusätzlich wurden diverse Homöobox Proteine (HOXC6, HOXB3, HOXB2), die in der Embryonalentwicklung involviert sind und *R-Spondin 3* (RSPO3), ein Schlüsselregulator der Vaskulogenese und Angiogenese (Kazanskaya *et al.*, 2008), deutlich erhöht in hEC exprimiert. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei den hier aus hiPSC differenzierten hEC um arterielle Zellen, die den Marker Efnb2 exprimieren. Die erhöhte Expression von *SRY (Sex Determining Region Y) -Box 17*

(SOX17), welches in der postnatalen vaskulären Entwicklung sowie der Entwicklung von Arterien involviert ist (Corada *et al.*, 2013), unterstützt die Annahme der arteriellen Identität der hEC. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass mit dem verwendeten Differenzierungsprotokoll hEC generiert wurden, die prototypische Endothelzellmarker tragen.

Analog zur Expressionsanalyse von ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren mittels 96-Well *real-time* PCR-Array (Fritz *et al.*, 2011) in aus mESC differenzierten kardiovaskulären Zelltypen (EC und CM) in Kapitel 4.1.1, wurden die differenzierten hEC diesbezüglich im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC untersucht. Da Prozesse bzw. Signalwege, in denen die ausgewählten Suszeptibilitätsfaktoren beteiligt sind (Stress-induzierbare Signalwege, Zelltod, Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur), bereits detailliert in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurden, wurde auf deren erneute ausführliche Beschreibung verzichtet.

Wie auch bei den differenzierten murinen kardiovaskulären Zelltypen, können die Unterschiede in der Expression einiger Gene vermutlich auf einen mit der Differenzierung von Stammzellen einhergehenden Verlust der Pluripotenz bzw. des Stammzellcharakters begründet werden. An dieser Stelle sei auf die effizienten Reparaturmechanismen und die Sicherstellung der genomischen Stabilität in ES-Zellen (Saretzki *et al.*, 2004; Saretzki *et al.*, 2008), gegenüber einem relativ instabilen Zustand von somatischen Zellen mit höheren Mutationsraten (Cervantes *et al.*, 2002), hingewiesen. Oxidativer Stress bzw. ROS, die UPR und die Apoptose haben in der Entwicklung eine Schlüsselrolle und lösen bei einer Beeinträchtigung ihres normalen Prozesses Stress aus (Kupsco and Schlenk, 2015).

Murine und humane Differenzierungen werden von einer Zunahme an zellulären ROS Mengen (Cho *et al.*, 2006) begleitet. Diese Zunahme ist auf eine Herunterregulation von antioxidativen Faktoren zurückzuführen (Saretzki *et al.*, 2004; Saretzki *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit war die mRNA Expression der antioxidativen Faktoren Sod1 und Gstm1 in hEC hochreguliert, was sich nicht mit beobachteten Daten über die Expression anderer Superoxid-Dismutasen, Glutathionperoxidasen und Glutathion-S-Transferasen deckt (Saretzki *et al.*, 2004; Saretzki *et al.*, 2008). Das zytoprotektive Enzym Hämoxigenase 1 (Hmox1) besitzt ebenfalls antioxidative Funktionen (Applegate *et al.*, 1991) und wurde hingegen im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC verringert exprimiert, was auf eine teilweise differenzierungsbedingte Abnahme von antioxidativen Faktoren und Zunahme der ROS Mengen schließen lässt. Ein Anstieg in der mRNA Expression von DNA-Reparaturgenen, die oxidative DNA-Läsionen durch die Mechanismen der BER, NER oder

MMR beheben, konnte für die BER (Mpg) und NER (Ercc1, Xpa) detektiert werden. Bei einer murinen EC Differenzierung wurde ebenfalls eine erhöhte mRNA Expression von Faktoren der NER beobachtet sowie eine verringerte Expression an antioxidativen Faktoren (Hennicke *et al.*, 2015). Dies konnte auch für aus mESC differenzierte CM in dieser Arbeit beobachtet werden. Somit scheint die Differenzierung von hiPSC in hEC mit einer verringerten mRNA Expression des antioxidativen Faktors Hmox1 und einer verstärkten Expression an BER- und NER-Faktoren einherzugehen.

Eine verminderte mRNA Expression von an der UPR beteiligten Genen, z.B. Chaperone, wurde in differenzierten hEC im Vergleich zu hiPSC in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet und scheint für diese Differenzierung nicht essentiell zu sein. Gene, die an der Apoptose beteiligt sind, welche essentiell ist für die Organogenese, die normale Homöostase im Erwachsenenalter und die Zelldifferenzierung (Glucksmann, 1951; Kerr *et al.*, 1972; Nakanishi *et al.*, 2007; Matsuzaki *et al.*, 2015), wurden in hEC verstärkt exprimiert. Dazu gehörten Akt1, Bcl2-assoziiertes X Protein (Bax), Bcl2 und Casp2. Neben einem Expressionsanstieg von Bcl2 wurde dies für weitere Apoptosemarker wie C-IAP1 und C-IAP2 bei humanen Zelldifferenzierungen beobachtet (Liu *et al.*, 2012; Moron-Calvente *et al.*, 2018). Folglich wird eine Differenzierung von hiPSC in hEC vermutlich mit einer erhöhten Expression von Genen, die an der Apoptose beteiligt sind, einhergehen.

Eine weitere Möglichkeit der Zelle mit Stress bzw. Schäden umzugehen, ohne direkt den programmierten Zelltod einzuleiten, ist die Autophagie. Zusätzlich ist sie bei Differenzierungsprozessen, sowohl *in vivo* (Yue *et al.*, 2003) als auch *in vitro* (Hassanpour *et al.*, 2020) involviert. Eine erhöhte Expression von Becn1 führte bei diesem *in vitro* Versuch (Hassanpour *et al.*, 2020) zu einer verstärkten Expression von prototypischen Markergenen (VE-Cadherin und vWF bzw. kardiales Troponin I) in differenzierten EC und CM. Eine erhöhte mRNA Expression von Becn1 wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit in hEC im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC beobachtet. Dies lässt vermuten, dass der Prozess der Autophagie ebenfalls in einer hEC Differenzierung involviert sein könnte.

Auch der Zellzyklus bzw. seine Regulation muss an die aktuell vorherrschende (Stress-) Situation im Organismus angepasst sein. Stammzellen weisen eine höhere Proliferationsrate als somatische Zellen auf, infolge ihrer hohen Aktivität von Cyclin A und E sowie CDK2 während des gesamten Zellzyklus (Stead *et al.*, 2002). Zusätzlich fehlt ES-Zellen ein funktionsfähiger G1-Kontrollpunkt, welcher einen G1-Arrest induziert (Aladjem *et al.*, 1998; Tichy and Stambrook, 2008). Hinweise auf eine unterschiedliche

Zellzyklusverteilung von differenzierten hEC und undifferenzierten hiPSC konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Die differenzierten hEC zeigten eine verringerte mRNA Expression von Cyclin A, sowie eine erhöhte Cdkn1a Expression. Zusätzlich wurden *Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha* (Gadd45a) und WEE 1 Homolog 1 (Wee1) verstärkt auf mRNA-Ebene in hEC exprimiert. Wee1 ist am Übergang der G2/M-Phase als Checkpointkinase beteiligt. Gadd45a ist an mehreren Prozessen, wie der Zellzykluskontrolle, dem Zelltod, der Seneszenz und der DNA-Reparatur, beteiligt und unterstützt die zelluläre Stabilität (Wingert *et al.*, 2016). Im Zellzyklus bewirkt seine Expression einen G2-Arrest durch die Interaktion mit anderen Proteinen wie beispielsweise p21 (Cdkn1a) (Wang *et al.*, 1999b; Wingert *et al.*, 2016). Zusätzlich spielt Gadd45a eine Rolle bei der Differenzierung von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen durch die Initiierung des p38 MAPK Signalwegs bzw. des Demethylierungsprozesses (Zhang *et al.*, 2011; Wingert *et al.*, 2016). Somit könnte Gadd45a ebenfalls eine Rolle in der hier vorgestellten hEC Differenzierung spielen.

Gene, deren Produkte an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind, wurden ebenfalls unterschiedlich stark auf mRNA-Ebene in hiPSC und daraus differenzierten hEC exprimiert. Wie bereits erwähnt reparieren somatische bzw. differenzierte Zellen DSBs bevorzugt mittels der NHEJ, anders als Stammzellen (Adams *et al.*, 2010; Stambrook and Tichy, 2010; Tichy *et al.*, 2010; Tichy *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2015; Biechonski *et al.*, 2018). Lig4 und Xrcc4 sind bei der Reparatur von DSBs über die NHEJ beteiligt und zeigten bei den in dieser Arbeit untersuchten differenzierten murinen kardiovaskulären Zelltypen sowie in hEC eine verstärkte mRNA Expression auf. Somit nimmt die Fähigkeit zur DNA-Reparatur mittels NHEJ sowohl im hier untersuchten murinen als auch humanen Differenzierungssystem zu.

Die Reparatur von DNA-Läsionen erfolgt u.a. über die MMR. Die in der vorliegenden Arbeit differenzierten hEC zeigten im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC eine reduzierte mRNA Expression von MutS Homolog 2 (Msh2), was einen Hinweis auf eine verminderte Fähigkeit zur MMR darstellt. Eine verminderte MMR Kapazität wurde auch für MEFs im Vergleich zu mESC beobachtet (Roos *et al.*, 2007; Tichy *et al.*, 2011). Die verstärkte Expression von an der MMR-beteiligten Genen, wie Msh2, wurde auch in hESC und hiPSC im Vergleich zu Fibroblasten beobachtet (Momcilovic *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2014). Dies deutet darauf hin, dass die Fähigkeit der Zellen zur MMR im Verlauf der Differenzierung abnimmt.

Über die Reparatur von DNA-Schäden mittels der BER gibt es in der Literatur verschiedene Befunde für differenzierte Zellen. So zeigen einige Untersuchungen, dass undifferenzierte Zellen eine höhere Expression an BER-Faktoren (Ligase I, Ligase III, Fen1, Xrcc1) aufweisen als differenzierte Zellen (Narciso *et al.*, 2007; Maynard *et al.*, 2008; Tichy *et al.*, 2011). In anderen Untersuchungen wurde eine stärkere Expression an BER-Faktoren (Ligase III, Xrcc1, Parp1) in differenzierten Zellen beobachtet (Briegert and Kaina, 2007; Bauer *et al.*, 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde der BER-Faktor *N-methylpurine-DNA glycosylase* (Mpg) in differenzierten hEC im Vergleich zu hiPSC auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert, wohingegen die Parp1-Expression herunterreguliert wurde. Während Mpg die DNA-Läsion erkennt und die geschädigte Base entfernt, interagiert bei der Ligation Ligase III bei der sogenannten *short-patch* BER u.a. mit Parp1 (Christmann *et al.*, 2003). Folglich scheint für die Differenzierung eine Verringerung bzw. Verstärkung der BER-Kapazität nicht von Nöten zu sein, sondern weist auf ein zelltypspezifisches Phänomen hin.

Auch für die NER-Kapazität von differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Faktoren der NER wurden in hESC im Vergleich zu Fibroblasten erhöht (*replication protein A3*) bzw. verringert exprimiert (*Xeroderma pigmentosum*, *complementation group A* (Xpa)) oder bleiben unverändert (Xpc) (Maynard *et al.*, 2008). Eine verstärkte mRNA Expression von ausgewählten NER-Faktoren (Ercc1, Xpa) zeigten differenzierte EC und glatte Muskelzellen (SMC, *smooth muscle cells*) gegenüber mESC (Hennicke *et al.*, 2015). Dabei zeigten SMC eine gleichzeitige reduzierte mRNA Expression anderer NER-Faktoren (Ddb2, *Xeroderma pigmentosum complementation group C* (Xpc)). In der vorliegenden Arbeit wurden die NER-Faktoren Ercc1 und Xpa, in Übereinstimmung mit publizierten Daten zu aus mESC differenzierten EC (Hennicke *et al.*, 2015), verstärkt in differenzierten hEC im Vergleich zu undifferenzierten hiPSC auf mRNA-Ebene exprimiert. Die gewonnenen Daten unterstützen die Hypothese, dass Stammzellen eine im Vergleich zu differenzierten Zelltypen verringerte NER-Kapazität aufweisen.

Zusätzlich zu Suszeptibilitätsfaktoren, die an der DNA-Schadensreparatur beteiligt sind, wurden auch andere Gene bzgl. ihrer mRNA Expression in differenzierten hEC mittels 96-Well Array analysiert. Wie die hier differenzierten murinen kardiovaskulären Zelltypen, zeigten auch differenzierte hEC eine verstärkte mRNA Expression von Cxcr4, Itgb1, E-Selektin und den Zelladhäsionsmolekülen Icam-1 und Vcam-1. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten bei einer Infektion und

der Interaktion mit Endothelzellen (Vollmar *et al.*, 1994). Diese erhöhten Expressionen können einen Hinweis für die Funktionalität der differenzierten hEC darstellen.

Zusammenfassend zeigen die Änderungen in der mRNA Expression ausgewählter Suszeptibilitätsfaktoren und Gene in differenzierten hEC eine prototypische Genexpression und eine unterschiedliche DNA-Schadensantwortkapazität. Die unterschiedliche DNA-Schadensantwortkapazität kann zum einen auf den Verlust der Pluripotenz zurückgeführt werden. Zum anderen verdeutlichen die Daten Veränderungen zelltypspezifischer Schadensantwort- und Reparaturmechanismen, wie die NHEJ, MMR, BER, NER, Zellzyklusregulation und die Apoptose, die mit einer Differenzierung einhergehen.

4.3.2 Einfluss einer Doxorubicin-Pulsbehandlung auf hiPSC und das Differenzierungspotential von Progenitor hEC

Analog zu den Doxorubicin-Pulsbehandlungen von mESC und differenzierten kardiovaskulären Zelltypen, bezüglich Doxorubicin-Konzentration, Behandlungsdauer und Zeitpunkt, wurde der Einfluss von Doxorubicin auf die Suszeptibilität der hiPSC und Progenitor hEC (hEC d4) analysiert. Bei der morphologischen Betrachtung sowie der Analyse der Viabilität mittels Alamar Blue-Assays 48 h nach Doxorubicin-Pulsbehandlung, zeigten Progenitor hEC eine stärkere Doxorubicin-Sensitivität als undifferenzierte hiPSC. Sowohl hiPSC als auch Progenitor hEC waren deutlich sensibler gegenüber Doxorubicin als die in dieser Arbeit untersuchten murinen Zelltypen. In der Literatur gibt es mehrere Studien in denen die Viabilität von hiPSC mit differenzierten Zelltypen untersucht wurde. Eine 72 h Doxorubicin-Behandlung mit 0,1 μM von hiPSC, die aus Fibroblasten bzw. mononukleären Zellen des peripheren Bluts reprogrammiert wurden, führte bereits zu einer 100 %igen Letalität. Damit waren die reprogrammierten hiPSC deutlich sensibler als die aus ihnen differenzierten hiPSC-CM, hiPSC-EC und hiPSC-kardialen Fibroblasten (Sharma *et al.*, 2017). Eine Studie an 30 Tage-alten und 60 Tage-alten hiPSC-CM zeigt eine höhere Sensitivität der jüngeren 30 Tage-alten hiPSC-CM gegenüber Doxorubicin auf (Cui *et al.*, 2019). Die Doxorubicin-Sensitivität von hiPSC wurde in dieser Studie nicht untersucht. Ob auch die hier untersuchten Progenitor hEC sensibler als terminal differenzierten hEC sind, wie es bei der mESC Differenzierung beobachtet wurde, sollte in fortführenden Arbeiten untersucht werden.

Da bereits eine Doxorubicin-Pulsbehandlung mit 0,05 μM die Viabilität der Progenitor hEC nach 48 h auf ca. 35 % herabsetzt, wurde die mRNA Expression von prototypischen

Markergenen nur nach einer Behandlung mit geringer zytotoxischer Doxorubicin-Dosierung (0,01 μM und 0,02 μM) analysiert. Diese gewählten Doxorubicin-Konzentrationen führten zu keinen Veränderungen in der mRNA Expression der Stammzellfaktoren (Nanog, Oct3/4) und den ausgewählten Endothelzell-Markergenen. Somit wurde bei diesen Doxorubicin-Konzentrationen die Differenzierung von hiPSC zu hEC auf mRNA-Ebene, wie bei den murinen EC beobachtet, nicht beeinträchtigt. Ob und wie höhere Doxorubicin-Konzentrationen das Differenzierungspotential von Progenitor hEC ggf. beeinflussen, bleibt zu klären.

Es kann festgehalten werden, dass hiPSC und Progenitor hEC sensitiver gegenüber Doxorubicin-Pulsbehandlungen sind als die untersuchten mESC sowie differenzierte EC und CM. Offensichtlich bestehen speziesspezifische Unterschiede bezüglich der Doxorubicin-Sensitivität. Weiterführende Untersuchungen an humanen oder murinen Stamm- sowie Progenitorzellen in Bezug auf ihr Differenzierungspotential nach einer Genotoxin-Exposition können bei der Identifizierung von besonders empfindlichen Zelltypen helfen. Zudem können die molekularen Mechanismen, die zu Tumorthapie-bedingten Nebenwirkungen führen, weiter erforscht werden.

Zusammenfassend verdeutlichen die in dieser Arbeit gezeigten Daten das hohe Potential eines auf Stammzellen-basierenden *in vitro* Differenzierungssystems für die Einschätzung toxikologischer Wirkstoffe bzw. Arzneimittel. Die gewonnenen Daten aus den murinen Differenzierungssystemen unterstützen die Hypothese, dass Doxorubicin-induzierte Schäden in den sensitiveren Progenitor EC regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigen können. Eine Doxorubicin-verursachte Schädigung der Progenitor EC kann ihre Differenzierungseffizienz und -genauigkeit beeinflussen und führte selektiv zu Dysfunktionen in den überlebenden differenzierten EC. Trotz hoher zytotoxischer Doxorubicin-Konzentration konnte vereinzelt die Funktionalität der überlebenden differenzierten EC erhalten bleiben. In Betracht der schwach ausgeprägten Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten im Vergleich zu Endothelzellen, liegt die Vermutung nahe, dass ein chronischer kardialer Schaden einer Anthrazyklin-basierten Tumorthapie teilweise auf fehlerhafte regenerative Prozesse der Progenitor EC zurückzuführen ist. Eine fehlerhafte Regeneration von Progenitor EC zieht wiederum eine ungenügende Reaktionsfähigkeit der differenzierten EC gegenüber physiologischen Reizen mit sich. Aus diesem Grund stellen endotheliale Stamm- und Progenitorzellen einen möglichen Zielzelltyp für die Entwicklung von neuen kardioprotektiven und regenerativen pharmakologischen Konzepten im Rahmen einer Anthrazyklin-basierten Tumorthapie dar.

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf Stammzellen-basierende *in vitro* Differenzierungssysteme für die toxikologische Einschätzung von Doxorubicin geeignet sind. Zudem konnten basale Differenzierungsabhängige Unterschiede bezüglich einiger Suszeptibilitätsfaktoren, die in der Regulation von antioxidativen Mechanismen, Autophagie, Apoptose und DNA-Reparatur beteiligt sind, festgestellt werden.

Neben den bereits in der Diskussion vorgeschlagenen Untersuchungen sollten noch weitere Aspekte in zukünftigen Arbeiten analysiert werden, um molekulare Mechanismen einer Doxorubicin-induzierten Sensitivität weiter zu charakterisieren. Dazu bieten sich Proteinexpressionsanalysen mittels Western Blot von ausgewählten und in der Arbeit untersuchten Suszeptibilitätsfaktoren der DDR an, wie z.B. Rad51, ATM, Chk1, Chk2 oder Bcl2. Des Weiteren kann die Analyse der Proteinexpression von γ H2AX unterstützend zu den immunzytochemischen Befunden der Foci Untersuchungen genutzt werden.

Da eine Doxorubicin-Behandlung zu einer erhöhten mtDNA Menge in den Zellen geführt hat, wäre eine weitere Fragestellung inwieweit die Mitochondrien von Doxorubicin geschädigt werden. Dazu könnten Analysen mittels Fluoreszenzmikroskopie bezüglich der Morphologie durchgeführt werden oder ebenfalls Proteinexpressionsanalysen wie z.B. von Mfn2 oder PGC1 α . In diesem Zusammenhang ist auch eine Untersuchung des zellulären ROS Gehalts angebracht. Zwar wird in der Literatur beschrieben, dass die Bildung von ROS erst bei Konzentrationen ab 4 μ M einsetzt (Gewirtz, 1999), aber im Zusammenhang mit den beobachteten Veränderungen der mRNA Expression von Mfn2 und PGC1 α sollte dies analysiert werden.

Weitere Assays zur Untersuchung der Funktionalität der differenzierten EC nach Doxorubicin-Behandlung wären zum einen die Fähigkeit der Bindung von Lektin mittels immunzytochemischer Färbung. Das angiogenetische Potenzial der EC kann mittels Mikroskopie überprüft werden (Vishnubalaji *et al.*, 2012). Dabei werden die Zellen auf Matrigel ausgesät und nach einer längeren Inkubationszeit auf die Ausbildung von gefäßähnlichen Strukturen (*tubes*) untersucht. Um die Sichtbarkeit der *tubes* zu verbessern, bietet sich eine Färbung mit Calcein-AM und anschließender Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop an. Bei differenzierten CM könnte als weiterer Parameter die Kontraktilität der Zellen gemessen werden. Dazu würde sich das iCELLigense Gerät der Firma ACEA Biosciences Inc. anbieten.

Parakrine Faktoren könnten relevant für eine anhaltende Dysfunktion von kardialen Progenitorzellen und einer kardialen Schädigung nach einer Doxorubicin-Behandlung in einer komplexeren *in vivo* Situation sein. Nach der Tumorthherapie beeinflussen parakrine Faktoren Wechselwirkungen zwischen Kardiomyozyten und Endothelzellen (Chiusa *et al.*, 2012). In dieser Arbeit ist es unwahrscheinlich, dass bei der experimentellen Gegebenheit eine Doxorubicin-induzierte Ausschüttung von parakrinen Faktoren der Progenitor EC einen Einfluss auf die überlebenden differenzierten EC hat. Dies kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Eine Möglichkeit dies zu untersuchen wäre eine vergleichende systematische Analyse der Doxorubicin Antwort von EC und CM, die unter Monokultur- bzw. unter Co-Kulturbedingungen differenziert wurden.

In der Arbeit konnten bereits erste Charakterisierungen an aus hiPSC differenzierten hEC durchgeführt werden. Diese Untersuchungen sollten weiter vertieft werden und zusätzlich auch ein Protokoll zur Differenzierung in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen etabliert werden. Nach erfolgreicher Etablierung einer hCM Differenzierung sollten hCM, ähnlich wie die durchgeführten Analysen im murinen Differenzierungssystem, charakterisiert werden und anschließend bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Doxorubicin untersucht werden. Mit der Verwendung eines humanen Testsystems liegen die gewonnenen Erkenntnisse näher an einer möglichen Situation im Patienten als Daten aus einem murinen Testsystem.

Abschließend zusammengefasst unterstützen die gewonnen Daten aus den murinen Differenzierungssystemen die Hypothese, dass Doxorubicin-induzierte Schäden in den sensitiveren Progenitor EC regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigen können. Endotheliale Stamm- und Progenitorzellen stellen somit einen möglichen Zielzelltyp für die Entwicklung von neuen kardioprotektiven und regenerativen pharmakologischen Konzepten im Rahmen einer Anthrazyklin-basierten Tumorthherapie dar. Die möglichen pharmakopreventiven Strategien sind vielseitig und beinhalten die Nutzung neuer Komponenten, die mit Apoptose, mitochondrialen Funktionen, DDR oder der DNA-Reparatur interagieren. Im Hinblick auf die Anwendung in der Klinik, würden bereits zugelassene und bewährte Arzneimittel bevorzugt werden. Eine gute Wahl wären Statine, für die bereits eine Protektion gegenüber Doxorubicin-induzierten kardialen Schäden *in vitro* und *in vivo* (Riad *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009; Huelsenbeck *et al.*, 2011; Henninger *et al.*, 2015; Henninger and Fritz, 2017) sowie im Menschen (Seicean *et al.*, 2012) gezeigt wurde. Auch dieser Aspekt, ob Statine, z.B. Lovastatin, eine zytoprotektive Wirkung auf die Progenitor EC haben, könnte in künftigen Arbeiten untersucht werden. Dazu würden die Progenitor EC mit Lovastatin vorbehandelt und anschließend mit Doxorubicin behandelt werden. Allgemein betrachtet ist

der Einfluss eines genotoxischen Stressauslösers während des Differenzierungsprozess auf die Funktionalität der differenzierenden Zellen schwer vorauszusagen. Detaillierte und systematische Analysen verschiedener Differenzierungsmodelle, genotoxischer Agenzien und funktionaler Nachweise werden benötigt, um aussagekräftige toxikologische Beurteilungen bezüglich einer möglichen Langzeit-Auswirkung von genotoxischem Stress zu treffen.

6 Zusammenfassung

Endothelzellen kleiden das Innere aller Blutgefäße aus und stellen eine physikalische Barriere zwischen Blutkreislauf und Gewebe dar. Durch ihre Barrierefunktion sind Endothelzellen konstant hohen Konzentrationen von systemisch zirkulierenden, toxischen Substanzen und damit Schädigungen ausgesetzt, welche Stressantworten oder den Zelltod auslösen können. Um Schädigungen entgegenzuwirken und die endotheliale Homöostase aufrechtzuerhalten, sind Endothelzellen vermutlich mit effektiven Reparatur- und Regenerationsmechanismen ausgestattet. Die häufigste Todesursache weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen, in Deutschland gefolgt von Krebserkrankungen. Viele Medikamente, die in der Tumorthherapie eingesetzt werden, haben Nebenwirkungen, die sich von Übelkeit und Erbrechen bis zu zytotoxischen Effekten in spezifischen Organen erstrecken. Das Anthrazyklin-Derivat Doxorubicin wird in der Tumorthherapie für ein weites Spektrum an Krebserkrankungen, wie u.a. Mammakarzinome, Sarkome und Leukämien, eingesetzt und weist als klinisch relevanteste dosislimitierende Nebenwirkung eine irreversible Kardiotoxizität auf. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität und die betroffenen besonders relevanten kardialen Zelltypen sind weitgehend unklar. Neben Kardiomyozyten können auch Endothelzellen und Fibroblasten sowie die geringe Anzahl im Herzen vorkommender kardialer Progenitorzellen durch Anthrazykline geschädigt werden und zur Kardiotoxizität führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass eine unzureichende Reaktion von endothelialen Progenitorzellen auf eine Doxorubicin-induzierte Schädigung regenerative Prozesse des Herzens beeinträchtigen könnte und so für die Pathophysiologie Anthrazyklin-verursachter Kardiotoxizität bedeutsam sein könnte. Zu diesem Zweck wurde ein auf embryonalen Stammzellen der Maus (mESC) -basierendes *in vitro*-Differenzierungsmodell gewählt und der Einfluss von Doxorubicin auf kardiovaskuläre Differenzierungsprozesse von mESC näher untersucht. mESC, kardiale Progenitor- sowie differenzierte Endothel-ähnliche Zellen (EC) und Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CM) wurden vergleichend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber unterschiedlichen Doxorubicin-Konzentrationen analysiert.

Die Resultate der Analysen zeigten, dass Progenitor EC eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber Doxorubicin, verglichen zu mESC, differenzierten EC und CM, sowie Progenitor CM aufweisen. Die erhöhte Sensitivität der Progenitor EC gegenüber Doxorubicin ist vermutlich auf eine Aktivierung von Seneszenz-assoziierten Mechanismen zurückzuführen.

Eine Doxorubicin-Pulsbehandlung von Progenitor EC mit hoher zytotoxischer Doxorubicin-Konzentration führt in differenzierten EC zu einer verringerten Proteinexpression der Endothelzell-zugehörigen Marker Flk1, VE-Cadherin und Pecam1. Ebenso wurden bei einer Behandlung von Progenitor EC mit hoher zytotoxischer Doxorubicin-Konzentration eine Verringerung der basalen intrazellulären Calcium-Konzentration, des zellulären ATP-Gehalts und der ATP Produktion, sowie der Sauerstoffverbrauchsrate in differenzierten EC beobachtet. Der relative Anteil von mitochondrialer zu genomischer DNA nahm hingegen in EC nach Doxorubicin-Behandlung von Progenitor EC zu. Pulsbehandlungen von Progenitor EC mit gering zytotoxischen Doxorubicin-Konzentrationen bewirkten in differenzierten EC eine veränderte Morphologie des Aktin-Zytoskeletts. Zusätzlich führte die Doxorubicin-Behandlung von Progenitor EC in den EC zu Veränderungen in der mRNA Expression von Faktoren, die an der Regulation von mitochondrialen Funktionen, Autophagie, Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Im Gegensatz dazu waren Endothelfunktionen wie die Aufnahme von acetyliertem LDL, ATP-stimulierte Calcium-Freisetzung, Zytokin-stimulierte ICAM-1 mRNA Expression nach einer Doxorubicin-Behandlung von Progenitor EC in differenzierten EC nicht beeinträchtigt. Somit verursacht eine Doxorubicin-Behandlung von Progenitor EC vereinzelte und anhaltende Dysfunktionen in den differenzierten EC.

Außerdem wurde ein Protokoll etabliert, um humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) in humane Endothel-ähnliche Zellen (hEC) zu differenzieren. Die hier differenzierten hEC zeigten eine erhöhte mRNA Expression von Endothelzell-zugehörigen Markergenen und deutliche Unterschiede in der basalen Expression von Suszeptibilitätsfaktoren im Vergleich zu hiPSC. Erste Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber Doxorubicin zeigten ebenfalls, dass Progenitor hEC im Vergleich zu hiPSC eine höhere Sensitivität aufweisen.

Zusammenfassend unterstützen die Befunde die Hypothese, dass eine Doxorubicin-induzierte Schädigung von Progenitor EC zu einer Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität beiträgt. Daher stellen Progenitor EC einen möglichen Zielzelltyp für die Entwicklung von neuen kardioprotektiven und regenerativen pharmakologischen Konzepten im Rahmen einer Anthrazyklin-basierten Tumortherapie dar.

6.1 Summary

Endothelial cells line the inside of blood vessels and function as a physical barrier between blood circulation and tissue. Due to their barrier function, endothelial cells are consistently exposed to high concentrations of systemically circulating toxic substances and thereby caused damage. These damages can lead to stress responses or cell death. In order to counteract damages and to maintain endothelial homeostasis, endothelial cells are probably provided with effective repair and regeneration mechanisms.

The most common cause of death in the world are cardiovascular diseases, in Germany followed by cancer. Many anticancer drugs have side effects, ranging from nausea and vomiting to organ-specific cytotoxic effects. The anthracycline derivate doxorubicin is used for the treatment of various types of cancer, e.g. breast cancer, sarcomas and leukemia. Dose-limiting adverse effect of doxorubicin is an irreversible cardiotoxicity. The molecular mechanisms underlying anthracycline-induced cardiotoxicity, as well as the pathophysiological most relevant cardiac cell types are unknown. Apart from cardiomyocytes, endothelial cells and fibroblasts and also the low number of cardiac progenitor cells can contribute to anthracycline-induced cardiotoxicity.

The hypothesis of this work is that an insufficient reaction of endothelial progenitor cells to doxorubicin-induced damage can impair regenerative processes of the heart and lead to chronic heart damage. To this end, a mouse embryonic stem cell (mESC) -based *in vitro* differentiation model was used to investigate the impact of doxorubicin on cardiovascular differentiation processes. mESC, cardiac progenitor and differentiated endothelial-like cells (EC), as well as cardiomyocyte-like cells (CM) were comparatively analyzed regarding their sensitivity towards different doxorubicin concentrations.

The results of the analyses showed progenitor EC were particularly doxorubicin sensitive compared to mESC, EC, CM and progenitor CM. This is likely due to the activation of senescence-associated mechanisms. Doxorubicin treatment of progenitor EC with a high cytotoxic concentration leads to a decreased protein expression of endothelial-related marker Flk1, VE-Cadherin and Pecam1 in the surviving differentiated EC progeny. Moreover, treatment of progenitor EC with a high cytotoxic doxorubicin concentration leads to a reduced basal calcium concentration, cellular ATP content and ATP production, as well as oxygen consumption rate in the surviving differentiated EC progeny. By contrast, the relative mitochondrial to genomic DNA content was increased in the differentiated EC progeny after doxorubicin treatment of their progenitor EC. Treatment with low doxorubicin

concentration of progenitor EC caused morphological changes of the actin-cytoskeleton in the surviving differentiated EC progeny. Additionally, doxorubicin treatment of progenitor EC altered the mRNA expression of factors, which are involved in the regulation of mitochondrial function, autophagy, apoptosis and DNA repair mechanisms in the surviving differentiated EC progeny. Contrary to this, endothelial functions like LDL uptake, ATP-stimulated calcium release and cytokine-stimulated ICAM-1 mRNA expression remained unaffected by the doxorubicin treatment. Hence, doxorubicin treatment of progenitor EC results in selective and persistent dysfunction in the surviving differentiated EC progeny.

Furthermore, a protocol to differentiate human induced pluripotent stem cells (hiPSC) into human endothelial-like cells (hEC) was established. These differentiated hEC showed mRNA expression of endothelial-related marker and distinct differences in the basal expression of susceptibility factors as compared to hiPSC. Initial investigations regarding the sensitivity towards doxorubicin revealed that progenitor hEC displayed higher sensitivity to doxorubicin treatment than hiPSC.

Summarizing, the data support the hypothesis that doxorubicin-induced damage of progenitor EC contributes to anthracycline-induced cardiotoxicity. Therefore, progenitor EC embody a possible target cell-type for the development of new cardioprotective and regenerative pharmacological concepts in anthracycline-based anticancer therapy.

7 Literaturverzeichnis

- Abdullah, C.S., Alam, S., Aishwarya, R., Miriyala, S., Bhuiyan, M.A.N., Panchatcharam, M., Pattillo, C.B., Orr, A.W., Sadoshima, J., Hill, J.A., Bhuiyan, M.S., 2019. Doxorubicin-induced cardiomyopathy associated with inhibition of autophagic degradation process and defects in mitochondrial respiration. *Sci Rep* **9**, 2002.
- Abou El Hassan, M.A., Verheul, H.M., Jorna, A.S., Schalkwijk, C., van Bezu, J., van der Vijgh, W.J., Bast, A., 2003. The new cardioprotector Monohydroxyethylrutoside protects against doxorubicin-induced inflammatory effects in vitro. *Br J Cancer* **89**, 357-362.
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M.K., Vilpo, J.A., Moncollin, V., Podust, V.N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J.M., Wood, R.D., 1995. Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-868.
- Adams, B.R., Golding, S.E., Rao, R.R., Valerie, K., 2010. Dynamic dependence on ATR and ATM for double-strand break repair in human embryonic stem cells and neural descendants. *PLoS One* **5**, e10001.
- Ahmed, K.A., Correa, C.R., Dilling, T.J., Rao, N.G., Shridhar, R., Trotti, A.M., Wilder, R.B., Caudell, J.J., 2014. Altered fractionation schedules in radiation treatment: a review. *Semin Oncol* **41**, 730-750.
- Aird, W.C., 2007. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100**, 158-173.
- Aktories, K.F., U., Hofmann, F., Starke, K., 2017. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH **12. Auflage**.
- Aladjem, M.I., Spike, B.T., Rodewald, L.W., Hope, T.J., Klemm, M., Jaenisch, R., Wahl, G.M., 1998. ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* **8**, 145-155.
- Aldieri, E., Bergandi, L., Riganti, C., Costamagna, C., Bosia, A., Ghigo, D., 2002. Doxorubicin induces an increase of nitric oxide synthesis in rat cardiac cells that is inhibited by iron supplementation. *Toxicol Appl Pharmacol* **185**, 85-90.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-465.
- Applegate, L.A., Luscher, P., Tyrrell, R.M., 1991. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* **51**, 974-978.
- Araujo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syvaaja, J.E., Stucki, M., Hubscher, U., Egly, J.M., Wood, R.D., 2000. Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev* **14**, 349-359.
- Asahara, T., Kawamoto, A., Masuda, H., 2011. Concise review: Circulating endothelial progenitor cells for vascular medicine. *Stem Cells* **29**, 1650-1655.
- Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967.
- Aspenstrom, P., 1999. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* **246**, 20-25.
- Attwell, D., Mishra, A., Hall, C.N., O'Farrell, F.M., Dalkara, T., 2016. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* **36**, 451-455.
- Azzam, E.I., Jay-Gerin, J.P., Pain, D., 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. *Cancer Lett* **327**, 48-60.

- Bahrami, S.B., Veiseh, M., Boudreau, N.J., 2012. Isolation and expansion of endothelial progenitor cells derived from mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **916**, 81-96.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I., 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* **168**, 342-357.
- Baldwin, H.S., Shen, H.M., Yan, H.C., DeLisser, H.M., Chung, A., Mickanin, C., Trask, T., Kirschbaum, N.E., Newman, P.J., Albelda, S.M., et al., 1994. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* **120**, 2539-2553.
- Barnes, J.A., Smoak, I.W., 2000. Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is elevated in embryonic mouse heart and induced following hypoglycemic stress. *Anat Embryol (Berl)* **202**, 67-74.
- Bauer, M., Goldstein, M., Christmann, M., Becker, H., Heylmann, D., Kaina, B., 2011. Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21105-21110.
- Baumann, P., West, S.C., 1997. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *EMBO J* **16**, 5198-5206.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P., 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763-776.
- Benson, F.E., Baumann, P., West, S.C., 1998. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* **391**, 401-404.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovinge, S., Frisen, J., 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98-102.
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjöström, S.L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., Dos Remedios, C., Malm, T., Andra, M., Jashari, R., Nyengaard, J.R., Possnert, G., Jovinge, S., Druid, H., Frisen, J., 2015. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* **161**, 1566-1575.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W., Clayton, D.A., 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**, 167-180.
- Biechonski, S., Olender, L., Zipin-Roitman, A., Yassin, M., Aqage, N., Marcu-Malina, V., Rall-Scharpf, M., Trottier, M., Meyn, M.S., Wiesmuller, L., Beider, K., Raz, Y., Grisaru, D., Nagler, A., Milyavsky, M., 2018. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation. *Sci Rep* **8**, 6071.
- Bishop, A.E., Buttery, L.D., Polak, J.M., 2002. Embryonic stem cells. *J Pathol* **197**, 424-429.
- Blancas, A.A., Lauer, N.E., McCloskey, K.E., 2008. Endothelial differentiation of embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 1**, Unit 1F 5.
- Blum, R.H., Carter, S.K., 1974. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* **80**, 249-259.
- Bodin, P., Burnstock, G., 1996. ATP-stimulated release of ATP by human endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **27**, 872-875.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S., Hanawalt, P.C., 1985. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* **40**, 359-369.
- Bommas-Ebert, U., Teubner, P., Voß, R., 2011. *Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie*. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, New York.

- Bouchier-Hayes, L., Green, D.R., 2012. Caspase-2: the orphan caspase. *Cell Death Differ* **19**, 51-57.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **122**, 947-956.
- Braga, V.M., 1999. Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol* **52**, 197-202.
- Briegert, M., Kaina, B., 2007. Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res* **67**, 26-31.
- Bround, M.J., Asghari, P., Wambolt, R.B., Bohunek, L., Smits, C., Philit, M., Kieffer, T.J., Lakatta, E.G., Boheler, K.R., Moore, E.D., Allard, M.F., Johnson, J.D., 2012. Cardiac ryanodine receptors control heart rate and rhythmicity in adult mice. *Cardiovasc Res* **96**, 372-380.
- Bruzzone, R., Haefliger, J.A., Gimlich, R.L., Paul, D.L., 1993. Connexin40, a component of gap junctions in vascular endothelium, is restricted in its ability to interact with other connexins. *Mol Biol Cell* **4**, 7-20.
- Bulla, R., Villa, A., Bossi, F., Casseti, A., Radillo, O., Spessotto, P., De Seta, F., Guaschino, S., Tedesco, F., 2005. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp Cell Res* **303**, 101-113.
- Burnstock, G., 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, 107-118.
- Burnstock, G., 2017. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res* **120**, 207-228.
- Burnstock, G., 2018. The therapeutic potential of purinergic signalling. *Biochem Pharmacol* **151**, 157-165.
- Burnstock, G., Ulrich, H., 2011. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci* **68**, 1369-1394.
- Burnstock, G., Verkhatsky, A., 2010. Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis* **1**, e9.
- Buttery, L.D., Bourne, S., Xynos, J.D., Wood, H., Hughes, F.J., Hughes, S.P., Episkopou, V., Polak, J.M., 2001. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng* **7**, 89-99.
- Cadet, J., Douki, T., Ravanat, J.L., 2008. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells. *Acc Chem Res* **41**, 1075-1083.
- Cai, H., Harrison, D.G., 2000. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**, 840-844.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M., Cohen, G.M., 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**, 6067-6070.
- Campagnolo, P., Cesselli, D., Al Haj Zen, A., Beltrami, A.P., Krankel, N., Katare, R., Angelini, G., Emanuelli, C., Madeddu, P., 2010. Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation* **121**, 1735-1745.
- Cao, X., Maharjan, S., Ashfaq, R., Shin, J., Zhang, Y.S., 2020. Bioprinting of Small-Diameter Blood Vessels. *Engineering* **7**, 832-844.
- Cao, X., Wu, X., Frassica, D., Yu, B., Pang, L., Xian, L., Wan, M., Lei, W., Armour, M., Tryggstad, E., Wong, J., Wen, C.Y., Lu, W.W., Frassica, F.J., 2011. Irradiation

- induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 1609-1614.
- Cappetta, D., De Angelis, A., Sapio, L., Prezioso, L., Illiano, M., Quaini, F., Rossi, F., Berrino, L., Naviglio, S., Urbanek, K., 2017. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 1521020.
- Carlos, T.M., Harlan, J.M., 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**, 2068-2101.
- Carmeliet, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395.
- Carmeliet, P., 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-660.
- Carmeliet, P., Lampugnani, M.G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M.C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J.M., Collen, D., Dejana, E., 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-157.
- Carvalho, F.S., Burgeiro, A., Garcia, R., Moreno, A.J., Carvalho, R.A., Oliveira, P.J., 2014. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev* **34**, 106-135.
- Cassinelli, G., Rivola, G., Ruggieri, D., Arcamone, F., Grein, A., Merli, S., Spalla, C., Casazza, A.M., Di Marco, A., Pratesi, G., 1982. New anthracycline glycosides: 4-O-demethyl-11-deoxydoxorubicin and analogues from *Streptomyces peucetius* var. *aureus*. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 176-183.
- Cervantes, R.B., Stringer, J.R., Shao, C., Tischfield, J.A., Stambrook, P.J., 2002. Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3586-3590.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A., 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**, 643-655.
- Chang, N.C., 2020. Autophagy and Stem Cells: Self-Eating for Self-Renewal. *Front Cell Dev Biol* **8**, 138.
- Chen, G., Xu, X., Zhang, L., Fu, Y., Wang, M., Gu, H., Xie, X., 2014. Blocking autocrine VEGF signaling by sunitinib, an anti-cancer drug, promotes embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Cell Res* **24**, 1121-1136.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., Chan, D.C., 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.
- Chen, J., Kubalak, S.W., Minamisawa, S., Price, R.L., Becker, K.D., Hickey, R., Ross, J., Jr., Chien, K.R., 1998. Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function. *J Biol Chem* **273**, 1252-1256.
- Chen, S.H., Chan, N.L., Hsieh, T.S., 2013. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **82**, 139-170.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y.H., Yeo, H.C., Yeo, Z.X., Narang, V., Govindarajan, K.R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W.K., Clarke, N.D., Wei, C.L., Ng, H.H., 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* **133**, 1106-1117.
- Cheung, K.G., Cole, L.K., Xiang, B., Chen, K., Ma, X., Myal, Y., Hatch, G.M., Tong, Q., Dolinsky, V.W., 2015. Sirtuin-3 (SIRT3) Protein Attenuates Doxorubicin-induced Oxidative Stress and Improves Mitochondrial Respiration in H9c2 Cardiomyocytes. *J Biol Chem* **290**, 10981-10993.

- Chiang, P.M., Wong, P.C., 2011. Differentiation of an embryonic stem cell to hemogenic endothelium by defined factors: essential role of bone morphogenetic protein 4. *Development* **138**, 2833-2843.
- Chiusa, M., Hool, S.L., Truetsch, P., Djafarzadeh, S., Jakob, S.M., Seifriz, F., Scherer, S.J., Suter, T.M., Zuppinger, C., Zbinden, S., 2012. Cancer therapy modulates VEGF signaling and viability in adult rat cardiac microvascular endothelial cells and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 1164-1175.
- Cho, Y.M., Jang, Y.S., Jang, Y.M., Chung, S.M., Kim, H.S., Lee, J.H., Jeong, S.W., Kim, I.K., Kim, J.J., Kim, K.S., Kwon, O.J., 2009. Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells. *Exp Mol Med* **41**, 440-452.
- Cho, Y.M., Kwon, S., Pak, Y.K., Seol, H.W., Choi, Y.M., Park, D.J., Park, K.S., Lee, H.K., 2006. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **348**, 1472-1478.
- Choi, W.Y., Poss, K.D., 2012. Cardiac regeneration. *Curr Top Dev Biol* **100**, 319-344.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* **193**, 3-34.
- Chu, W., Burns, D.K., Swerlick, R.A., Presky, D.H., 1995. Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 10236-10245.
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 616-627.
- Corada, M., Orsenigo, F., Morini, M.F., Pitulescu, M.E., Bhat, G., Nyqvist, D., Breviaro, F., Conti, V., Briot, A., Iruela-Arispe, M.L., Adams, R.H., Dejana, E., 2013. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun* **4**, 2609.
- Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656.
- Coutts, M., Cui, K., Davis, K.L., Keutzer, J.C., Sytkowski, A.J., 1999. Regulated expression and functional role of the transcription factor CHOP (GADD153) in erythroid growth and differentiation. *Blood* **93**, 3369-3378.
- Critchlow, S.E., Jackson, S.P., 1998. DNA end-joining: from yeast to man. *Trends Biochem Sci* **23**, 394-398.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., Leach, D.R., 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell* **8**, 1163-1174.
- Cui, N., Wu, F., Lu, W.J., Bai, R., Ke, B., Liu, T., Li, L., Lan, F., Cui, M., 2019. Doxorubicin-induced cardiotoxicity is maturation dependent due to the shift from topoisomerase IIalpha to IIbeta in human stem cell derived cardiomyocytes. *J Cell Mol Med* **23**, 4627-4639.
- Cunha-Oliveira, T., Ferreira, L.L., Coelho, A.R., Deus, C.M., Oliveira, P.J., 2018. Doxorubicin triggers bioenergetic failure and p53 activation in mouse stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* **348**, 1-13.
- Dancker, P., Low, I., Hasselbach, W., Wieland, T., 1975. Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta* **400**, 407-414.
- Davila, J.C., Cezar, G.G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T., Trosko, J., 2004. Use and application of stem cells in toxicology. *Toxicol Sci* **79**, 214-223.
- De Angelis, A., Piegari, E., Cappetta, D., Marino, L., Filippelli, A., Berrino, L., Ferreira-Martins, J., Zheng, H., Hosoda, T., Rota, M., Urbanek, K., Kajstura, J., Leri, A., Rossi, F., Anversa, P., 2010. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the

- cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation* **121**, 276-292.
- De Falco, E., Carnevale, R., Pagano, F., Chimenti, I., Fianchini, L., Bordin, A., Siciliano, C., Monticolo, R., Equitani, F., Carrizzo, A., Peruzzi, M., Vecchione, C., Rubattu, S., Sciarretta, S., Frati, G., 2016. Role of NOX2 in mediating doxorubicin-induced senescence in human endothelial progenitor cells. *Mech Ageing Dev* **159**, 37-43.
- de Waard, H., de Wit, J., Gorgels, T.G., van den Aardweg, G., Andressoo, J.O., Vermeij, M., van Steeg, H., Hoeijmakers, J.H., van der Horst, G.T., 2003. Cell type-specific hypersensitivity to oxidative damage in CSB and XPA mice. *DNA Repair (Amst)* **2**, 13-25.
- Deepa, P.R., Varalakshmi, P., 2003. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact* **146**, 201-210.
- Descamps, B., Emanuelli, C., 2012. Vascular differentiation from embryonic stem cells: novel technologies and therapeutic promises. *Vascul Pharmacol* **56**, 267-279.
- Drab, M., Haller, H., Bychkov, R., Erdmann, B., Lindschau, C., Haase, H., Morano, I., Luft, F.C., Wobus, A.M., 1997. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J* **11**, 905-915.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbo, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1389-1407.
- Du, Q., Zhu, B., Zhai, Q., Yu, B., 2017. Sirt3 attenuates doxorubicin-induced cardiac hypertrophy and mitochondrial dysfunction via suppression of Bnip3. *Am J Transl Res* **9**, 3360-3373.
- Egglar, A.L., Inman, R.B., Cox, M.M., 2002. The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *J Biol Chem* **277**, 39280-39288.
- Erhardt, L., 2009. Cigarette smoking: an undertreated risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **205**, 23-32.
- Evans, C.E., Iruela-Arispe, M.L., Zhao, Y.Y., 2021. Mechanisms of Endothelial Regeneration and Vascular Repair and Their Application to Regenerative Medicine. *Am J Pathol* **191**, 52-65.
- Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Faas, M.M., Saez, T., de Vos, P., 2017. Extracellular ATP and adenosine: The Yin and Yang in immune responses? *Mol Aspects Med* **55**, 9-19.
- Fadini, G.P., Losordo, D., Dimmeler, S., 2012. Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* **110**, 624-637.
- Fairchild, P.J., Brook, F.A., Gardner, R.L., Graca, L., Strong, V., Tone, Y., Tone, M., Nolan, K.F., Waldmann, H., 2000. Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Curr Biol* **10**, 1515-1518.
- Faridounnia, M., Folkers, G.E., Boelens, R., 2018. Function and Interactions of ERCC1-XPF in DNA Damage Response. *Molecules* **23**.
- Farokhpour, M., Karbalaie, K., Tanhaei, S., Nematollahi, M., Etebari, M., Sadeghi, H.M., Nasr-Esfahani, M.H., Baharvand, H., 2009. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model system to study cardioprotective effects of dexamethasone in doxorubicin cardiotoxicity. *Toxicol In Vitro* **23**, 1422-1428.
- Fernandez-Borja, M., van Buul, J.D., Hordijk, P.L., 2010. The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovasc Res* **86**, 202-210.

- Ferrero, E., Ferrero, M.E., Pardi, R., Zocchi, M.R., 1995. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS Lett* **374**, 323-326.
- Fling, S.P., Gregerson, D.S., 1986. Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Forsberg, E.J., Feuerstein, G., Shohami, E., Pollard, H.B., 1987. Adenosine triphosphate stimulates inositol phospholipid metabolism and prostacyclin formation in adrenal medullary endothelial cells by means of P2-purinerbic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5630-5634.
- Fritz, G., Henninger, C., Huelsenbeck, J., 2011. Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. *Br Med Bull* **97**, 17-26.
- Fuchs, E., Chen, T., 2013. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep* **14**, 39-48.
- Gambardella, J., Trimarco, B., Iaccarino, G., Sorriento, D., 2017. Cardiac Nonmyocyte Cell Functions and Crosstalks in Response to Cardiotoxic Drugs. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, 1089359.
- Ganna, A., Salihovic, S., Sundstrom, J., Broeckling, C.D., Hedman, A.K., Magnusson, P.K., Pedersen, N.L., Larsson, A., Siegbahn, A., Zilmer, M., Prenti, J., Arnlov, J., Lind, L., Fall, T., Ingelsson, E., 2014. Large-scale metabolomic profiling identifies novel biomarkers for incident coronary heart disease. *PLoS Genet* **10**, e1004801.
- Gartel, A.L., Radhakrishnan, S.K., 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* **65**, 3980-3985.
- Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., Brady, M., Clemann, N., Huuskonen, H., Paillard, F., Bremer, S., Becker, K., 2002. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *European Centre for the Validation of Alternative Methods. Altern Lab Anim* **30**, 151-176.
- Gewirtz, D.A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**, 727-741.
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., Ferrara, N., 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem* **276**, 3222-3230.
- Gillett, C.E., Barnes, D.M., 1998. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* **51**, 310-316.
- Glucksmann, A., 1951. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* **26**, 59-86.
- Goodhead, D.T., 1994. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int J Radiat Biol* **65**, 7-17.
- Goswami, P.C., Roti Roti, J.L., Hunt, C.R., 1996. The cell cycle-coupled expression of topoisomerase IIalpha during S phase is regulated by mRNA stability and is disrupted by heat shock or ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **16**, 1500-1508.
- Gottlieb, T.M., Jackson, S.P., 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131-142.
- Graf, U., Casanova, E.A., Cinelli, P., 2011. The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)* **2**, 280-297.
- Guan, K., Rohwedel, J., Wobus, A.M., 1999. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* **30**, 211-226.

- Guo, J., Ren, R., Sun, K., Yao, X., Lin, J., Wang, G., Guo, Z., Xu, T., Guo, F., 2020. PERK controls bone homeostasis through the regulation of osteoclast differentiation and function. *Cell Death Dis* **11**, 847.
- Guo, Z., Kumagai, A., Wang, S.X., Dunphy, W.G., 2000. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* **14**, 2745-2756.
- Haber, J.E., 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet* **16**, 259-264.
- Hall, A., 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-514.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., 2007. The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* **28**, 739-745.
- Haslett, K., Pottgen, C., Stuschke, M., Faivre-Finn, C., 2014. Hyperfractionated and accelerated radiotherapy in non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* **6**, 328-335.
- Hassanpour, M., Rezaie, J., Darabi, M., Hiradfar, A., Rahbarghazi, R., Nouri, M., 2020. Autophagy modulation altered differentiation capacity of CD146(+) cells toward endothelial cells, pericytes, and cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther* **11**, 139.
- He, H., Wang, L., Qiao, Y., Zhou, Q., Li, H., Chen, S., Yin, D., Huang, Q., He, M., 2019. Doxorubicin Induces Endotheliotoxicity and Mitochondrial Dysfunction via ROS/eNOS/NO Pathway. *Front Pharmacol* **10**, 1531.
- Hebert, S.L., Lanza, I.R., Nair, K.S., 2010. Mitochondrial DNA alterations and reduced mitochondrial function in aging. *Mech Ageing Dev* **131**, 451-462.
- Hein, S., Block, T., Zimmermann, R., Kostin, S., Scheffold, T., Kubin, T., Klovekorn, W.P., Schaper, J., 2009. Deposition of nonsarcomeric alpha-actinin in cardiomyocytes from patients with dilated cardiomyopathy or chronic pressure overload. *Exp Clin Cardiol* **14**, e68-75.
- Hennicke, T., Nieweg, K., Brockmann, N., Kassack, M.U., Gottmann, K., Fritz, G., 2015. mESC-based in vitro differentiation models to study vascular response and functionality following genotoxic insults. *Toxicol Sci* **144**, 138-150.
- Henninger, C., Fritz, G., 2017. Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. *Cell Death Dis* **8**, e2564.
- Henninger, C., Huelsenbeck, S., Wenzel, P., Brand, M., Huelsenbeck, J., Schad, A., Fritz, G., 2015. Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin. *Pharmacol Res* **91**, 47-56.
- Hescheler, J., Fleischmann, B.K., Lentini, S., Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Wobus, A.M., Addicks, K., 1997. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* **36**, 149-162.
- Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 89-102.
- Hildebrandt, G., 2010. Non-cancer diseases and non-targeted effects. *Mutat Res* **687**, 73-77.
- Hirschi, K.K., Ingram, D.A., Yoder, M.C., 2008. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1584-1595.
- Ho, L., Tan, S.Y., Wee, S., Wu, Y., Tan, S.J., Ramakrishna, N.B., Chng, S.C., Nama, S., Szczerbinska, I., Chan, Y.S., Avery, S., Tsuneyoshi, N., Ng, H.H., Gunaratne, J., Dunn, N.R., Reversade, B., 2015. ELABELA Is an Endogenous Growth Factor that Sustains hESC Self-Renewal via the PI3K/AKT Pathway. *Cell Stem Cell* **17**, 435-447.
- Hoeflerlin, L.A., Oleinik, N.V., Krupenko, N.I., Krupenko, S.A., 2011. Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes Cancer* **2**, 889-899.

- Hopwood, A.M., Lincoln, J., Kirkpatrick, K.A., Burnstock, G., 1989. Adenosine 5'-triphosphate, adenosine and endothelium-derived relaxing factor in hypoxic vasodilatation of the heart. *Eur J Pharmacol* **165**, 323-326.
- Hoshino, A., Chiba, H., Nagai, K., Ishii, G., Ochiai, A., 2008. Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 305-310.
- Hu, Y., Zhang, Z., Torsney, E., Afzal, A.R., Davison, F., Metzler, B., Xu, Q., 2004. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest* **113**, 1258-1265.
- Huelsenbeck, J., Henninger, C., Schad, A., Lackner, K.J., Kaina, B., Fritz, G., 2011. Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity. *Cell Death Dis* **2**, e190.
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., Birchmeier, W., 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* **148**, 567-578.
- Hurairah, H., Ferro, A., 2004. The role of the endothelium in the control of vascular function. *Int J Clin Pract* **58**, 173-183.
- Ichikawa, Y., Ghanefar, M., Bayeva, M., Wu, R., Khechaduri, A., Naga Prasad, S.V., Mutharasan, R.K., Naik, T.J., Ardehali, H., 2014. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. *J Clin Invest* **124**, 617-630.
- Iliakis, G., 1991. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* **13**, 641-648.
- Injac, R., Strukelj, B., 2008. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. *Technol Cancer Res Treat* **7**, 497-516.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., Suda, T., 2006. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **12**, 446-451.
- Jahn, S.K., Hennicke, T., Kassack, M.U., Drews, L., Reichert, A.S., Fritz, G., 2020. Distinct influence of the anthracycline derivative doxorubicin on the differentiation efficacy of mESC-derived endothelial progenitor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1867**, 118711.
- Jang, Y.Y., Sharkis, S.J., 2007. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* **110**, 3056-3063.
- Jeyaseelan, R., Poizat, C., Wu, H.Y., Kedes, L., 1997. Molecular mechanisms of doxorubicin-induced cardiomyopathy. Selective suppression of Reiske iron-sulfur protein, ADP/ATP translocase, and phosphofructokinase genes is associated with ATP depletion in rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* **272**, 5828-5832.
- Jiang, J., Mohan, N., Endo, Y., Shen, Y., Wu, W.J., 2018. Type IIB DNA topoisomerase is downregulated by trastuzumab and doxorubicin to synergize cardiotoxicity. *Oncotarget* **9**, 6095-6108.
- Jin, J., Xuan, Q.K., Zhou, L.J., Shi, C.M., Song, G.X., Sheng, Y.H., Qian, L.M., 2014. Dynamic mitochondrial changes during differentiation of P19 embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes. *Mol Med Rep* **10**, 761-766.
- Jing, R., Corbett, J.L., Cai, J., Beeson, G.C., Beeson, C.C., Chan, S.S., Dimmock, D.P., Lazcares, L., Geurts, A.M., Lemasters, J.J., Duncan, S.A., 2018. A Screen Using iPSC-Derived Hepatocytes Reveals NAD(+) as a Potential Treatment for mtDNA Depletion Syndrome. *Cell Rep* **25**, 1469-1484 e1465.
- Jones, D.L., Wagers, A.J., 2008. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 11-21.
- Jornayvaz, F.R., Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* **47**, 69-84.

- Jovanovic, M., Rooney, M.S., Mertins, P., Przybylski, D., Chevrier, N., Satija, R., Rodriguez, E.H., Fields, A.P., Schwartz, S., Raychowdhury, R., Mumbach, M.R., Eisenhaure, T., Rabani, M., Gennert, D., Lu, D., Delorey, T., Weissman, J.S., Carr, S.A., Hacohen, N., Regev, A., 2015. Immunogenetics. Dynamic profiling of the protein life cycle in response to pathogens. *Science* **347**, 1259038.
- Jun, K., Piedras-Renteria, E.S., Smith, S.M., Wheeler, D.B., Lee, S.B., Lee, T.G., Chin, H., Adams, M.E., Scheller, R.H., Tsien, R.W., Shin, H.S., 1999. Ablation of P/Q-type Ca(2+) channel currents, altered synaptic transmission, and progressive ataxia in mice lacking the alpha(1A)-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15245-15250.
- Kabrun, N., Buhring, H.J., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W., Keller, G., 1997. Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development* **124**, 2039-2048.
- Kaebisch, C., Schipper, D., Babczyk, P., Tobiasch, E., 2015. The role of purinergic receptors in stem cell differentiation. *Comput Struct Biotechnol J* **13**, 75-84.
- Kalivendi, S.V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J., Kalyanaraman, B., 2001. Doxorubicin-induced apoptosis is associated with increased transcription of endothelial nitric-oxide synthase. Effect of antiapoptotic antioxidants and calcium. *J Biol Chem* **276**, 47266-47276.
- Karhu, S.T., Kinnunen, S.M., Tolli, M., Valimaki, M.J., Szabo, Z., Talman, V., Ruskoaho, H., 2020. GATA4-targeted compound exhibits cardioprotective actions against doxorubicin-induced toxicity in vitro and in vivo: establishment of a chronic cardiotoxicity model using human iPSC-derived cardiomyocytes. *Arch Toxicol*.
- Kassack, M.U., Hofgen, B., Lehmann, J., Eckstein, N., Quillan, J.M., Sadee, W., 2002. Functional screening of G protein-coupled receptors by measuring intracellular calcium with a fluorescence microplate reader. *J Biomol Screen* **7**, 233-246.
- Katz, A.M., 2011. *The Physiology of the Heart*. Philadelphia, PA : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins Health.
- Kaufmann, S.H., Hancock, R., 1995. Topoisomerase II as a target for anticancer chemotherapy. *Acta Biochim Pol* **42**, 381-393.
- Kazanskaya, O., Ohkawara, B., Heroult, M., Wu, W., Maltry, N., Augustin, H.G., Niehrs, C., 2008. The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. *Development* **135**, 3655-3664.
- Keller, G.M., 1995. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 862-869.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Khakh, B.S., Burnstock, G., 2009. The double life of ATP. *Sci Am* **301**, 84-90, 92.
- Khakoo, A.Y., Finkel, T., 2005. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med* **56**, 79-101.
- Kirkwood, T.B., 1977. Evolution of ageing. *Nature* **270**, 301-304.
- Klein, I., 1990. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* **88**, 631-637.
- Knollmann, B.C., Roden, D.M., 2008. A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature* **451**, 929-936.
- Kogler, G., Sensen, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A.I., Colletti, E.J., Almeida-Porada, G., Muller, H.W., Zanjani, E., Wernet, P., 2004. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* **200**, 123-135.
- Kraft, D., Rall, M., Volcic, M., Metzler, E., Groo, A., Stahl, A., Bauer, L., Nasonova, E., Salles, D., Taucher-Scholz, G., Bonig, H., Fournier, C., Wiesmuller, L., 2015. NF-kappaB-dependent DNA damage-signaling differentially regulates DNA double-strand break repair mechanisms in immature and mature human hematopoietic cells. *Leukemia* **29**, 1543-1554.

- Kramer, J., Hegert, C., Guan, K., Wobus, A.M., Muller, P.K., Rohwedel, J., 2000. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* **92**, 193-205.
- Kroeger, H., Grimsey, N., Paxman, R., Chiang, W.C., Plate, L., Jones, Y., Shaw, P.X., Trejo, J., Tsang, S.H., Powers, E., Kelly, J.W., Wiseman, R.L., Lin, J.H., 2018. The unfolded protein response regulator ATF6 promotes mesodermal differentiation. *Sci Signal* **11**.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., Dunphy, W.G., 2006. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* **124**, 943-955.
- Kumar, D., Talluri, T.R., Anand, T., Kues, W.A., 2015. Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. *World J Stem Cells* **7**, 315-328.
- Kupsco, A., Schlenk, D., 2015. Oxidative stress, unfolded protein response, and apoptosis in developmental toxicity. *Int Rev Cell Mol Biol* **317**, 1-66.
- Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., El-Deiry, W.S., 2011. The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle* **10**, 2380-2389.
- Kuznetsov, S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., Robey, P.G., 2001. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* **153**, 1133-1140.
- Laarmann, K., Kress, J.M., Kaina, B., Fritz, G., 2019. Werner syndrome (WRN) DNA helicase and base excision repair (BER) factors maintain endothelial homeostasis. *DNA Repair (Amst)* **73**, 17-27.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampugnani, M.G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L.P., Dejana, E., 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511-1522.
- Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J.V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., Tonnel, A.B., 1996. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* **271**, 20458-20464.
- Laustriat, D., Gide, J., Peschanski, M., 2010. Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem Soc Trans* **38**, 1051-1057.
- Lee, D.H., Lind, P.M., Jacobs, D.R., Jr., Salihovic, S., van Bavel, B., Lind, L., 2012a. Background exposure to persistent organic pollutants predicts stroke in the elderly. *Environ Int* **47**, 115-120.
- Lee, J.H., Paull, T.T., 2005. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* **308**, 551-554.
- Lee, J.W., Yannone, S.M., Chen, D.J., Povirk, L.F., 2003. Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res* **63**, 22-24.
- Lee, K.J., Ross, R.S., Rockman, H.A., Harris, A.N., O'Brien, T.X., van Bilsen, M., Shubeita, H.E., Kandolf, R., Brem, G., Price, J., et al., 1992. Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem* **267**, 15875-15885.
- Lee, M.O., Song, S.H., Jung, S., Hur, S., Asahara, T., Kim, H., Kwon, S.M., Cha, H.J., 2012b. Effect of ionizing radiation induced damage of endothelial progenitor cells in vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**, 343-352.
- Lee, Y., Katyal, S., Downing, S.M., Zhao, J., Russell, H.R., McKinnon, P.J., 2012c. Neurogenesis requires TopBP1 to prevent catastrophic replicative DNA damage in early progenitors. *Nat Neurosci* **15**, 819-826.

- Li, A., Song, N.J., Riesenberger, B.P., Li, Z., 2019. The Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Stress in Balancing Immunity and Tolerance in Health and Diseases: Mechanisms and Opportunities. *Front Immunol* **10**, 3154.
- Li, C., Zhen, G., Chai, Y., Xie, L., Crane, J.L., Farber, E., Farber, C.R., Luo, X., Gao, P., Cao, X., Wan, M., 2016. RhoA determines lineage fate of mesenchymal stem cells by modulating CTGF-VEGF complex in extracellular matrix. *Nat Commun* **7**, 11455.
- Li, G.M., 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* **18**, 85-98.
- Li, X., Krawetz, R., Liu, S., Meng, G., Rancourt, D.E., 2009. ROCK inhibitor improves survival of cryopreserved serum/feeder-free single human embryonic stem cells. *Hum Reprod* **24**, 580-589.
- Lian, X., Bao, X., Al-Ahmad, A., Liu, J., Wu, Y., Dong, W., Dunn, K.K., Shusta, E.V., Palecek, S.P., 2014. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells to endothelial progenitors via small-molecule activation of WNT signaling. *Stem Cell Reports* **3**, 804-816.
- Lian, X., Zhang, J., Zhu, K., Kamp, T.J., Palecek, S.P., 2013. Insulin inhibits cardiac mesoderm, not mesendoderm, formation during cardiac differentiation of human pluripotent stem cells and modulation of canonical Wnt signaling can rescue this inhibition. *Stem Cells* **31**, 447-457.
- Liang, W., McDonald, P., McManus, B., van Breemen, C., Wang, X., 2008. P2Y2 receptor-mediated Ca²⁺ signaling and spontaneous Ca²⁺ releases in human valvular myofibroblasts. *Int Heart J* **49**, 221-236.
- Liedtke, S., Biebrnick, S., Radke, T.F., Stapelkamp, D., Coenen, C., Zaehres, H., Fritz, G., Kogler, G., 2015. DNA damage response in neonatal and adult stromal cells compared with induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* **4**, 576-589.
- Lin, B., Gupta, D., Heinen, C.D., 2014. Human pluripotent stem cells have a novel mismatch repair-dependent damage response. *J Biol Chem* **289**, 24314-24324.
- Lindsley, R.C., Gill, J.G., Kyba, M., Murphy, T.L., Murphy, K.M., 2006. Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development* **133**, 3787-3796.
- Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., Harvey, R.P., 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* **119**, 969.
- Liu, L., Liu, C., Zhong, Y., Apostolou, A., Fang, S., 2012. ER stress response during the differentiation of H9 cells induced by retinoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 738-743.
- Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M.J., Albrecht, U., Behringer, R.R., Bradley, A., 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet* **22**, 361-365.
- Liu, X., Qi, J., Xu, X., Zeisberg, M., Guan, K., Zeisberg, E.M., 2016a. Differentiation of functional endothelial cells from human induced pluripotent stem cells: A novel, highly efficient and cost effective method. *Differentiation* **92**, 225-236.
- Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R., 2016b. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**, 535-550.
- Lobrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A.A., Barton, O., Jeggo, P.A., 2010. gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**, 662-669.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P., 2013. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **25**, 578-585.
- Lowes, B.D., Minobe, W., Abraham, W.T., Rizeq, M.N., Bohlmeier, T.J., Quaife, R.A., Roden, R.L., Dutcher, D.L., Robertson, A.D., Voelkel, N.F., Badesch, D.B., Groves, B.M., Gilbert, E.M., Bristow, M.R., 1997. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest* **100**, 2315-2324.

- Lu, W., Li, X., 2018. Vascular stem/progenitor cells: functions and signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* **75**, 859-869.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R., McKay, R., 2001. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* **292**, 1389-1394.
- Luo, S., Mao, C., Lee, B., Lee, A.S., 2006. GRP78/BiP is required for cell proliferation and protecting the inner cell mass from apoptosis during early mouse embryonic development. *Mol Cell Biol* **26**, 5688-5697.
- Luu, A.Z., Luu, V.Z., Chowdhury, B., Kosmopoulos, A., Pan, Y., Al-Omran, M., Quan, A., Teoh, H., Hess, D.A., Verma, S., 2021. Loss of endothelial cell-specific autophagy-related protein 7 exacerbates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Biochem Biophys Rep* **25**, 100926.
- Lyons, I., Parsons, L.M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J.E., Robb, L., Harvey, R.P., 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* **9**, 1654-1666.
- Lyu, Y.L., Kerrigan, J.E., Lin, C.P., Azarova, A.M., Tsai, Y.C., Ban, Y., Liu, L.F., 2007. Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane. *Cancer Res* **67**, 8839-8846.
- Macdonald, R.A., 1961. "Lifespan" of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch Intern Med* **107**, 335-343.
- Mah, L.J., El-Osta, A., Karagiannis, T.C., 2010. gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **24**, 679-686.
- Mahmoudi, M., Mercer, J., Bennett, M., 2006. DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* **71**, 259-268.
- Maier, P., Hartmann, L., Wenz, F., Herskind, C., 2016. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci* **17**.
- Maillet, A., Tan, K., Chai, X., Sadananda, S.N., Mehta, A., Ooi, J., Hayden, M.R., Pouladi, M.A., Ghosh, S., Shim, W., Brunham, L.R., 2016. Modeling Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Human Pluripotent Stem Cell Derived-Cardiomyocytes. *Sci Rep* **6**, 25333.
- Majesky, M.W., Dong, X.R., Hognlund, V., Daum, G., Mahoney, W.M., Jr., 2012. The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall. *Cells Tissues Organs* **195**, 73-81.
- Majesky, M.W., Dong, X.R., Regan, J.N., Hognlund, V.J., 2011. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res* **108**, 365-377.
- Maltsev, V.A., Rohwedel, J., Hescheler, J., Wobus, A.M., 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* **44**, 41-50.
- Manic, G., Obrist, F., Sistigu, A., Vitale, I., 2015. Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy. *Mol Cell Oncol* **2**, e1012976.
- Mao, C., Tai, W.C., Bai, Y., Poizat, C., Lee, A.S., 2006. In vivo regulation of Grp78/BiP transcription in the embryonic heart: role of the endoplasmic reticulum stress response element and GATA-4. *J Biol Chem* **281**, 8877-8887.
- Mao, Y., Desai, S.D., Ting, C.Y., Hwang, J., Liu, L.F., 2001. 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* **276**, 40652-40658.
- Marcu, R., Choi, Y.J., Xue, J., Fortin, C.L., Wang, Y., Nagao, R.J., Xu, J., MacDonald, J.W., Bammler, T.K., Murry, C.E., Muczynski, K., Stevens, K.R., Himmelfarb, J., Schwartz,

- S.M., Zheng, Y., 2018. Human Organ-Specific Endothelial Cell Heterogeneity. *iScience* **4**, 20-35.
- Marechal, X., Montaigne, D., Marciniak, C., Marchetti, P., Hassoun, S.M., Beauvillain, J.C., Lancel, S., Neviere, R., 2011. Doxorubicin-induced cardiac dysfunction is attenuated by ciclosporin treatment in mice through improvements in mitochondrial bioenergetics. *Clin Sci (Lond)* **121**, 405-413.
- Martin, G.R., 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-7638.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., Green, D.R., 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-1556.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., Elledge, S.J., 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10389-10394.
- Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., Kiya, K., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Kanematsu, R., Maeda, T., Takamura, H., Yamada, K., Miyoshi, K., Hosokawa, K., Tohyama, M., Katayama, T., 2015. Physiological ER Stress Mediates the Differentiation of Fibroblasts. *PLoS One* **10**, e0123578.
- Maynard, S., Swistowska, A.M., Lee, J.W., Liu, Y., Liu, S.T., Da Cruz, A.B., Rao, M., de Souza-Pinto, N.C., Zeng, X., Bohr, V.A., 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells* **26**, 2266-2274.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., Chen, C.S., 2004. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* **6**, 483-495.
- McDonald, A.I., Iruela-Arispe, M.L., 2015. Healing arterial ulcers: Endothelial lining regeneration upon vascular denudation injury. *Vascul Pharmacol* **72**, 9-15.
- McGowan, J.V., Chung, R., Maulik, A., Piotrowska, I., Walker, J.M., Yellon, D.M., 2017. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* **31**, 63-75.
- McIlwraith, M.J., Van Dyck, E., Masson, J.Y., Stasiak, A.Z., Stasiak, A., West, S.C., 2000. Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. *J Mol Biol* **304**, 151-164.
- Meissner, G., 1994. Ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu Rev Physiol* **56**, 485-508.
- Mello, J.A., Acharya, S., Fishel, R., Essigmann, J.M., 1996. The mismatch-repair protein hMSH2 binds selectively to DNA adducts of the anticancer drug cisplatin. *Chem Biol* **3**, 579-589.
- Mendelson, A., Frenette, P.S., 2014. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med* **20**, 833-846.
- Michaelis, U.R., 2014. Mechanisms of endothelial cell migration. *Cell Mol Life Sci* **71**, 4131-4148.
- Michiels, C., 2003. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol* **196**, 430-443.
- Miura, T., Luo, Y., Khrebtukova, I., Brandenberger, R., Zhou, D., Thies, R.S., Vasicek, T., Young, H., Lebkowski, J., Carpenter, M.K., Rao, M.S., 2004. Monitoring early differentiation events in human embryonic stem cells by massively parallel signature sequencing and expressed sequence tag scan. *Stem Cells Dev* **13**, 694-715.
- Miyake, T., Shimada, M., Matsumoto, Y., Okino, A., 2019. DNA Damage Response After Ionizing Radiation Exposure in Skin Keratinocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Mochan, T.A., Venere, M., DiTullio, R.A., Jr., Halazonetis, T.D., 2004. 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* **3**, 945-952.

- Mock, D.M., Matthews, N.I., Zhu, S., Strauss, R.G., Schmidt, R.L., Nalbant, D., Cress, G.A., Widness, J.A., 2011. Red blood cell (RBC) survival determined in humans using RBCs labeled at multiple biotin densities. *Transfusion* **51**, 1047-1057.
- Mohamed, E.A., Kassem, H.H., 2018. Protective effect of nebivolol on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Arch Med Sci* **14**, 1450-1458.
- 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., Kuhn, B., 2013. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1446-1451.
- Momcilovic, O., Knobloch, L., Fornasaglio, J., Varum, S., Easley, C., Schatten, G., 2010. DNA damage responses in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *PLoS One* **5**, e13410.
- Moore, G.W., Hutchins, G.M., Bulkley, B.H., Tseng, J.S., Ki, P.F., 1980. Constituents of the human ventricular myocardium: connective tissue hyperplasia accompanying muscular hypertrophy. *Am Heart J* **100**, 610-616.
- Mordes, D.A., Glick, G.G., Zhao, R., Cortez, D., 2008. TopBP1 activates ATR through ATRIP and a PIKK regulatory domain. *Genes Dev* **22**, 1478-1489.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., Tsukita, S., 1999. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* **147**, 185-194.
- Moron-Calvente, V., Romero-Pinedo, S., Toribio-Castello, S., Plaza-Diaz, J., Abadia-Molina, A.C., Rojas-Barros, D.I., Beug, S.T., LaCasse, E.C., MacKenzie, A., Korneluk, R., Abadia-Molina, F., 2018. Inhibitor of apoptosis proteins, NAIP, cIAP1 and cIAP2 expression during macrophage differentiation and M1/M2 polarization. *PLoS One* **13**, e0193643.
- Morrison, S.J., Kimble, J., 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068-1074.
- Morrison, S.J., Uchida, N., Weissman, I.L., 1995. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 35-71.
- Mu, D., Park, C.H., Matsunaga, T., Hsu, D.S., Reardon, J.T., Sancar, A., 1995. Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system. *J Biol Chem* **270**, 2415-2418.
- Munzel, T., Sinning, C., Post, F., Warnholtz, A., Schulz, E., 2008. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med* **40**, 180-196.
- Nag, A.C., 1980. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* **28**, 41-61.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-106.
- Nakamura, A.J., Rao, V.A., Pommier, Y., Bonner, W.M., 2010. The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* **9**, 389-397.
- Nakanishi, K., Dohmae, N., Morishima, N., 2007. Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro. *FASEB J* **21**, 2994-3003.
- Nakatsu, Y., Asahina, H., Citterio, E., Rademakers, S., Vermeulen, W., Kamiuchi, S., Yeo, J.P., Khaw, M.C., Saijo, M., Kodo, N., Matsuda, T., Hoeijmakers, J.H., Tanaka, K., 2000. XAB2, a novel tetratricopeptide repeat protein involved in transcription-coupled DNA repair and transcription. *J Biol Chem* **275**, 34931-34937.
- Narciso, L., Fortini, P., Pajalunga, D., Franchitto, A., Liu, P., Degan, P., Frechet, M., Demple, B., Crescenzi, M., Dogliotti, E., 2007. Terminally differentiated muscle cells are

- defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17010-17015.
- Ni, X., Yang, Z.Z., Ye, L.Q., Han, X.L., Zhao, D.D., Ding, F.Y., Ding, N., Wu, H.C., Yu, M., Xu, G.Y., Zhao, Z.A., Lei, W., Hu, S.J., 2021. Establishment of an in vitro safety assessment model for lipid-lowering drugs using same-origin human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*.
- Nichols, J., Evans, E.P., Smith, A.G., 1990. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* **110**, 1341-1348.
- Nicolay, N.H., Sommer, E., Lopez, R., Wirkner, U., Trinh, T., Sisombath, S., Debus, J., Ho, A.D., Saffrich, R., Huber, P.E., 2013. Mesenchymal stem cells retain their defining stem cell characteristics after exposure to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **87**, 1171-1178.
- Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., Reed, S.I., 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**, 629-643.
- Nishii, K., Morimoto, S., Minakami, R., Miyano, Y., Hashizume, K., Ohta, M., Zhan, D.Y., Lu, Q.W., Shibata, Y., 2008. Targeted disruption of the cardiac troponin T gene causes sarcomere disassembly and defects in heartbeat within the early mouse embryo. *Dev Biol* **322**, 65-73.
- Nishikawa, S.I., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N., Kodama, H., 1998. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* **125**, 1747-1757.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A.G., 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-376.
- Nourse, M.B., Halpin, D.E., Scatena, M., Mortisen, D.J., Tulloch, N.L., Hauch, K.D., Torok-Storb, B., Ratner, B.D., Pabon, L., Murry, C.E., 2010. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**, 80-89.
- Nubel, T., Dippold, W., Kaina, B., Fritz, G., 2004. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis* **25**, 1335-1344.
- Nurgali, K., Jagoe, R.T., Abalo, R., 2018. Editorial: Adverse Effects of Cancer Chemotherapy: Anything New to Improve Tolerance and Reduce Sequelae? *Front Pharmacol* **9**, 245.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* **267**, 5421-5426.
- O'Brien, T.X., Lee, K.J., Chien, K.R., 1993. Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5157-5161.
- Ohtsuki, I., Maruyama, K., Ebashi, S., 1986. Regulatory and cytoskeletal proteins of vertebrate skeletal muscle. *Adv Protein Chem* **38**, 1-67.
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317.
- Oktem, G., Bilir, A., Selvi, N., Yurtseven, M.E., Vatansever, S., Ates, U., Uysal, A., Omay, S.B., 2006. Chemotherapy influences inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity on 3D breast cancer cell line. *Oncol Res* **16**, 195-203.

- Olive, P.L., 2004. Detection of DNA damage in individual cells by analysis of histone H2AX phosphorylation. *Methods Cell Biol* **75**, 355-373.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., Anversa, P., 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
- Ornstein, L., 1964. Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**, 321-349.
- Otey, C.A., Carpen, O., 2004. Alpha-actinin revisited: a fresh look at an old player. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 104-111.
- Panier, S., Boulton, S.J., 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 7-18.
- Park, C.H., Lee, S.H., 2007. Efficient generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* **407**, 311-322.
- Partanen, J., Armstrong, E., Makela, T.P., Korhonen, J., Sandberg, M., Renkonen, R., Knuutila, S., Huebner, K., Alitalo, K., 1992. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* **12**, 1698-1707.
- Pasquinelli, G., Tazzari, P.L., Vaselli, C., Foroni, L., Buzzi, M., Storci, G., Alviano, F., Ricci, F., Bonafe, M., Orrico, C., Bagnara, G.P., Stella, A., Conte, R., 2007. Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* **25**, 1627-1634.
- Passman, J.N., Dong, X.R., Wu, S.P., Maguire, C.T., Hogan, K.A., Bautch, V.L., Majesky, M.W., 2008. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9349-9354.
- Paull, T.T., Gellert, M., 1999. Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* **13**, 1276-1288.
- Peltz, G., 1993. Inflammatory disease: where immunology and adhesion meet? *Curr Opin Biotechnol* **4**, 745-750.
- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R., 1992. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 824-831.
- Pereira, G.C., Silva, A.M., Diogo, C.V., Carvalho, F.S., Monteiro, P., Oliveira, P.J., 2011. Drug-induced cardiac mitochondrial toxicity and protection: from doxorubicin to carvedilol. *Curr Pharm Des* **17**, 2113-2129.
- Pereira, R.C., Delany, A.M., Canalis, E., 2004. CCAAT/enhancer binding protein homologous protein (DDIT3) induces osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology* **145**, 1952-1960.
- Piegari, E., De Angelis, A., Cappetta, D., Russo, R., Esposito, G., Costantino, S., Graiani, G., Frati, C., Prezioso, L., Berrino, L., Urbanek, K., Quaini, F., Rossi, F., 2013. Doxorubicin induces senescence and impairs function of human cardiac progenitor cells. *Basic Res Cardiol* **108**, 334.
- Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., Tallquist, M.D., 2016. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* **118**, 400-409.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
- Prezioso, L., Tanzi, S., Galaverna, F., Frati, C., Testa, B., Savi, M., Graiani, G., Lagrasta, C., Cavalli, S., Galati, S., Madeddu, D., Lodi Rizzini, E., Ferraro, F., Musso, E., Stilli, D., Urbanek, K., Piegari, E., De Angelis, A., Maseri, A., Rossi, F., Quaini, E., Quaini,

- F., 2010. Cancer treatment-induced cardiotoxicity: a cardiac stem cell disease? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* **8**, 55-75.
- Privratsky, J.R., Newman, D.K., Newman, P.J., 2010. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci* **87**, 69-82.
- Puigserver, P., Wu, Z.D., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., Spiegelman, B.M., 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829-839.
- Puri, M.C., Nagy, A., 2012. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells* **30**, 10-14.
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J., 1995. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* **14**, 5884-5891.
- Qu, P., Wang, L., Min, Y., McKennett, L., Keller, J.R., Lin, P.C., 2016. Vav1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation Decision Between Adipocyte and Chondrocyte via Sirt1. *Stem Cells* **34**, 1934-1946.
- Raj, S., Franco, V.I., Lipshultz, S.E., 2014. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* **16**, 315.
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., Nishigaki, I., 2013. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* **9**, 1057-1069.
- Raymond, M.R., Christensen, K.Y., Thompson, B.A., Anderson, H.A., 2016. Associations Between Fish Consumption and Contaminant Biomarkers With Cardiovascular Conditions Among Older Male Anglers in Wisconsin. *J Occup Environ Med* **58**, 676-682.
- Riad, A., Bien, S., Westermann, D., Becher, P.M., Loya, K., Landmesser, U., Kroemer, H.K., Schultheiss, H.P., Tschope, C., 2009. Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. *Cancer Res* **69**, 695-699.
- Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H., 2000. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-783.
- Ridley, A.J., 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **36**, 103-112.
- Risau, W., 1990. Angiogenic growth factors. *Prog Growth Factor Res* **2**, 71-79.
- Risau, W., Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 73-91.
- Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H.G., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R., Doetschman, T., 1988. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**, 471-478.
- Robson, P., Stein, P., Zhou, B., Schultz, R.M., Baldwin, H.S., 2001. Inner cell mass-specific expression of a cell adhesion molecule (PECAM-1/CD31) in the mouse blastocyst. *Dev Biol* **234**, 317-329.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M., 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* **273**, 5858-5868.
- Rohde, E., Malischnik, C., Thaler, D., Maierhofer, T., Linkesch, W., Lanzer, G., Guelly, C., Strunk, D., 2006. Blood monocytes mimic endothelial progenitor cells. *Stem Cells* **24**, 357-367.
- Rohwedel, J., Maltsev, V., Bober, E., Arnold, H.H., Hescheler, J., Wobus, A.M., 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* **164**, 87-101.
- Roos, W.P., Christmann, M., Fraser, S.T., Kaina, B., 2007. Mouse embryonic stem cells are hypersensitive to apoptosis triggered by the DNA damage O(6)-methylguanine due to high E2F1 regulated mismatch repair. *Cell Death Differ* **14**, 1422-1432.

- Roos, W.P., Kaina, B., 2013. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* **332**, 237-248.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., Kaina, B., 2016. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer* **16**, 20-33.
- Saad, S.Y., Najjar, T.A., Al-Rikabi, A.C., 2001. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* **43**, 211-218.
- Saito, A., Hino, S., Murakami, T., Kanemoto, S., Kondo, S., Saitoh, M., Nishimura, R., Yoneda, T., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ikawa, M., Okabe, M., Imaizumi, K., 2009. Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nat Cell Biol* **11**, 1197-1204.
- Salihovic, S., Ganna, A., Fall, T., Broeckling, C.D., Prenni, J.E., van Bavel, B., Lind, P.M., Ingelsson, E., Lind, L., 2016. The metabolic fingerprint of p,p'-DDE and HCB exposure in humans. *Environ Int* **88**, 60-66.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M.S., Alvarez-Buylla, A., 2004. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* **427**, 740-744.
- Sandoo, A., van Zanten, J.J., Metsios, G.S., Carroll, D., Kitas, G.D., 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J* **4**, 302-312.
- Santivasi, W.L., Xia, F., 2014. Ionizing radiation-induced DNA damage, response, and repair. *Antioxid Redox Signal* **21**, 251-259.
- Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., von Zglinicki, T., 2004. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells* **22**, 962-971.
- Saretzki, G., Walter, T., Atkinson, S., Passos, J.F., Bareth, B., Keith, W.N., Stewart, R., Hoare, S., Stojkovic, M., Armstrong, L., von Zglinicki, T., Lako, M., 2008. Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **26**, 455-464.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., Jackson, S.P., 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509-514.
- Sato, T.N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y., 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74.
- Satoh, T., Kaida, D., 2016. Upregulation of p27 cyclin-dependent kinase inhibitor and a C-terminus truncated form of p27 contributes to G1 phase arrest. *Sci Rep* **6**, 27829.
- Sauter, K.A., Wood, L.J., Wong, J., Iordanov, M., Magun, B.E., 2011. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1beta through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* **11**, 1008-1016.
- Schmelter, M., Ateghang, B., Helmig, S., Wartenberg, M., Sauer, H., 2006. Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J* **20**, 1182-1184.
- Scholz, G., Genschow, E., Pohl, I., Bremer, S., Paparella, M., Raabe, H., Southee, J., Spielmann, H., 1999. Prevalidation of the Embryonic Stem Cell Test (EST)-A New In Vitro Embryotoxicity Test. *Toxicol In Vitro* **13**, 675-681.
- Schroder, M., Kaufman, R.J., 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* **74**, 739-789.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., Halazonetis, T.D., 2000. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* **151**, 1381-1390.

- Seicean, S., Seicean, A., Plana, J.C., Budd, G.T., Marwick, T.H., 2012. Effect of statin therapy on the risk for incident heart failure in patients with breast cancer receiving anthracycline chemotherapy: an observational clinical cohort study. *J Am Coll Cardiol* **60**, 2384-2390.
- Sender, R., Milo, R., 2021. The distribution of cellular turnover in the human body. *Nat Med* **27**, 45-48.
- Sha, H., He, Y., Chen, H., Wang, C., Zenno, A., Shi, H., Yang, X., Zhang, X., Qi, L., 2009. The IRE1alpha-XBP1 pathway of the unfolded protein response is required for adipogenesis. *Cell Metab* **9**, 556-564.
- Shakir, S.K., Azizullah, A., Murad, W., Daud, M.K., Nabeela, F., Rahman, H., Ur Rehman, S., Hader, D.P., 2017. Toxic Metal Pollution in Pakistan and Its Possible Risks to Public Health. *Rev Environ Contam Toxicol* **242**, 1-60.
- Sharma, A., Burridge, P.W., McKeithan, W.L., Serrano, R., Shukla, P., Sayed, N., Churko, J.M., Kitani, T., Wu, H., Holmstrom, A., Matsa, E., Zhang, Y., Kumar, A., Fan, A.C., Del Alamo, J.C., Wu, S.M., Moslehi, J.J., Mercola, M., Wu, J.C., 2017. High-throughput screening of tyrosine kinase inhibitor cardiotoxicity with human induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* **9**.
- Shin, J.W., Huggenberger, R., Detmar, M., 2008. Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis. *Blood* **112**, 2318-2326.
- Shum, L.C., White, N.S., Mills, B.N., Bentley, K.L., Eliseev, R.A., 2016. Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev* **25**, 114-122.
- Slack, J.M., 1994. Inducing factors in *Xenopus* early embryos. *Curr Biol* **4**, 116-126.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D., 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690.
- Smith, A.G., Hooper, M.L., 1987. Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev Biol* **121**, 1-9.
- Sneddon, L.U., Halsey, L.G., Bury, N.R., 2017. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *J Exp Biol* **220**, 3007-3016.
- Spagnoli, L.G., Bonanno, E., Sangiorgi, G., Mauriello, A., 2007. Role of inflammation in atherosclerosis. *J Nucl Med* **48**, 1800-1815.
- Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., Possnert, G., Mash, D.C., Druid, H., Frisen, J., 2013. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* **153**, 1219-1227.
- St John, J.C., Ramalho-Santos, J., Gray, H.L., Petrosko, P., Rawe, V.Y., Navara, C.S., Simerly, C.R., Schatten, G.P., 2005. The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* **7**, 141-153.
- Stadtfield, M., Hochedlinger, K., 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* **24**, 2239-2263.
- Stambrook, P.J., 2007. An ageing question: do embryonic stem cells protect their genomes? *Mech Ageing Dev* **128**, 31-35.
- Stambrook, P.J., Tichy, E.D., 2010. Preservation of genomic integrity in mouse embryonic stem cells. *Adv Exp Med Biol* **695**, 59-75.
- Stasiak, A.Z., Larquet, E., Stasiak, A., Muller, S., Engel, A., Van Dyck, E., West, S.C., Egelman, E.H., 2000. The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. *Curr Biol* **10**, 337-340.

- Stead, E., White, J., Faast, R., Conn, S., Goldstone, S., Rathjen, J., Dhingra, U., Rathjen, P., Walker, D., Dalton, S., 2002. Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* **21**, 8320-8333.
- Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., Frid, M.G., 2013. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* **75**, 23-47.
- Student, 1908. The Probable Error of a Mean. *Biometrika* **6**, 1-25.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D., Hoeijmakers, J.H., 1998. Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* **2**, 223-232.
- Sugiura, K., Muro, Y., Futamura, K., Matsumoto, K., Hashimoto, N., Nishizawa, Y., Nagasaka, T., Saito, H., Tomita, Y., Usukura, J., 2009. The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **129**, 2126-2135.
- Swain, S.M., Whaley, F.S., Ewer, M.S., 2003. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* **97**, 2869-2879.
- Symons, M., 1996. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci* **21**, 178-181.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H., Takai, Y., 1997. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol* **139**, 1047-1059.
- Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., Iino, M., 1998. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *EMBO J* **17**, 3309-3316.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S., 2011. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* **145**, 875-889.
- Tichy, E.D., Liang, L., Deng, L., Tischfield, J., Schwemberger, S., Babcock, G., Stambrook, P.J., 2011. Mismatch and base excision repair proficiency in murine embryonic stem cells. *DNA Repair (Amst)* **10**, 445-451.
- Tichy, E.D., Pillai, R., Deng, L., Liang, L., Tischfield, J., Schwemberger, S.J., Babcock, G.F., Stambrook, P.J., 2010. Mouse embryonic stem cells, but not somatic cells, predominantly use homologous recombination to repair double-strand DNA breaks. *Stem Cells Dev* **19**, 1699-1711.
- Tichy, E.D., Pillai, R., Deng, L., Tischfield, J.A., Hexley, P., Babcock, G.F., Stambrook, P.J., 2012. The abundance of Rad51 protein in mouse embryonic stem cells is regulated at multiple levels. *Stem Cell Res* **9**, 124-134.
- Tichy, E.D., Stambrook, P.J., 2008. DNA repair in murine embryonic stem cells and differentiated cells. *Exp Cell Res* **314**, 1929-1936.
- Tokutake, Y., Yamada, K., Hayashi, S., Arai, W., Watanabe, T., Yonekura, S., 2019. IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response Is Required during Early Differentiation of C2C12 Myoblasts. *Int J Mol Sci* **21**.

- Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**, 778-784.
- Trujillo, K.M., Yuan, S.S., Lee, E.Y., Sung, P., 1998. Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* **273**, 21447-21450.
- Tsuiko, O., Jatsenko, T., Parameswaran Grace, L.K., Kurg, A., Vermeesch, J.R., Lanner, F., Altmae, S., Salumets, A., 2019. A speculative outlook on embryonic aneuploidy: Can molecular pathways be involved? *Dev Biol* **447**, 3-13.
- Unwin, R.D., Smith, D.L., Blinco, D., Wilson, C.L., Miller, C.J., Evans, C.A., Jaworska, E., Baldwin, S.A., Barnes, K., Pierce, A., Spooncer, E., Whetton, A.D., 2006. Quantitative proteomics reveals posttranslational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells. *Blood* **107**, 4687-4694.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., Bonassi, S., 2013. gammaH2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutat Res* **753**, 24-40.
- van Buul, J.D., Voermans, C., van Gelderen, J., Anthony, E.C., van der Schoot, C.E., Hordijk, P.L., 2003. Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. *J Biol Chem* **278**, 30302-30310.
- van der Meer, A.D., Vermeul, K., Poot, A.A., Feijen, J., Vermes, I., 2010. A microfluidic wound-healing assay for quantifying endothelial cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H719-725.
- Van Sloun, P.P., Jansen, J.G., Weeda, G., Mullenders, L.H., van Zeeland, A.A., Lohman, P.H., Vrieling, H., 1999. The role of nucleotide excision repair in protecting embryonic stem cells from genotoxic effects of UV-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res* **27**, 3276-3282.
- Vanhoutte, P.M., 2010. Regeneration of the endothelium in vascular injury. *Cardiovasc Drugs Ther* **24**, 299-303.
- Varum, S., Rodrigues, A.S., Moura, M.B., Momcilovic, O., Easley, C.A.t., Ramalho-Santos, J., Van Houten, B., Schatten, G., 2011. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One* **6**, e20914.
- Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2001. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* **89**, E1-7.
- Vega-Naredo, I., Loureiro, R., Mesquita, K.A., Barbosa, I.A., Tavares, L.C., Branco, A.F., Erickson, J.R., Holy, J., Perkins, E.L., Carvalho, R.A., Oliveira, P.J., 2014. Mitochondrial metabolism directs stemness and differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells. *Cell Death Differ* **21**, 1560-1574.
- Vignard, J., Mirey, G., Salles, B., 2013. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: a direct and indirect lighting up. *Radiother Oncol* **108**, 362-369.
- Vishnubalaji, R., Manikandan, M., Al-Nbaheen, M., Kadalmani, B., Aldahmash, A., Alajez, N.M., 2012. In vitro differentiation of human skin-derived multipotent stromal cells into putative endothelial-like cells. *BMC Dev Biol* **12**, 7.
- Vliegen, H.W., van der Laarse, A., Cornelisse, C.J., Eulderink, F., 1991. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur Heart J* **12**, 488-494.
- Vollmar, B., Menger, M.D., Glasz, J., Leiderer, R., Messmer, K., 1994. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* **267**, G786-793.

- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F., Jackson, S.P., 2005. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev* **126**, 111-117.
- Vousden, K.H., 2000. p53: death star. *Cell* **103**, 691-694.
- Voyta, J.C., Via, D.P., Butterfield, C.E., Zetter, B.R., 1984. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99**, 2034-2040.
- Wallez, Y., Huber, P., 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 794-809.
- Wang, H., Lawrence, C.W., Li, G.M., Hays, J.B., 1999a. Specific binding of human MSH2.MSH6 mismatch-repair protein heterodimers to DNA incorporating thymine- or uracil-containing UV light photoproducts opposite mismatched bases. *J Biol Chem* **274**, 16894-16900.
- Wang, H.U., Chen, Z.F., Anderson, D.J., 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-753.
- Wang, J.J., Cortes, E., Sinks, L.F., Holland, J.F., 1971. Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease. *Cancer* **28**, 837-843.
- Wang, X., Roper, M.G., 2014. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal Methods* **6**, 3019-3024.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr., Harris, C.C., 1999b. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3706-3711.
- Wang, Y., Adjaye, J., 2011. A cyclic AMP analog, 8-Br-cAMP, enhances the induction of pluripotency in human fibroblast cells. *Stem Cell Rev Rep* **7**, 331-341.
- Wang, Y., Jin, X.Q., Wang, S., Wang, Q., Luo, Q., Luo, X.J., 2006. Therapeutic efficacy and bone marrow protection of the *mdr1* gene and over-dose chemotherapy with doxorubicin for rabbits with VX2 hepatocarcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **5**, 545-551.
- Watabe, T., Nishihara, A., Mishima, K., Yamashita, J., Shimizu, K., Miyazawa, K., Nishikawa, S., Miyazono, K., 2003. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol* **163**, 1303-1311.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., Sasai, Y., 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **25**, 681-686.
- Weinstein, D.M., Mihm, M.J., Bauer, J.A., 2000. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **294**, 396-401.
- White, J., Dalton, S., 2005. Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* **1**, 131-138.
- Wiles, M.V., Johansson, B.M., 1999. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. *Exp Cell Res* **247**, 241-248.
- Wilkinson, E.L., Sidaway, J.E., Cross, M.J., 2016. Cardiotoxic drugs Herceptin and doxorubicin inhibit cardiac microvascular endothelial cell barrier formation resulting in increased drug permeability. *Biol Open* **5**, 1362-1370.
- Wingert, S., Thalheimer, F.B., Haetscher, N., Rehage, M., Schroeder, T., Rieger, M.A., 2016. DNA-damage response gene GADD45A induces differentiation in hematopoietic stem cells without inhibiting cell cycle or survival. *Stem Cells* **34**, 699-710.

- Wobus, A.M., Loser, P., 2011. Present state and future perspectives of using pluripotent stem cells in toxicology research. *Arch Toxicol* **85**, 79-117.
- Wobus, A.M., Wallukat, G., Hescheler, J., 1991. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* **48**, 173-182.
- Wolf, M.B., Baynes, J.W., 2006. The anti-cancer drug, doxorubicin, causes oxidant stress-induced endothelial dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 267-271.
- Woodcock, E.A., Matkovich, S.J., 2005. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1746-1751.
- Xu, C., Bailly-Maitre, B., Reed, J.C., 2005. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* **115**, 2656-2664.
- Yamada, M., O'Regan, E., Brown, R., Karran, P., 1997. Selective recognition of a cisplatin-DNA adduct by human mismatch repair proteins. *Nucleic Acids Res* **25**, 491-496.
- Yamaguchi, T.P., Dumont, D.J., Conlon, R.A., Breitman, M.L., Rossant, J., 1993. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* **118**, 489-498.
- Yamamizu, K., Kawasaki, K., Katayama, S., Watabe, T., Yamashita, J.K., 2009. Enhancement of vascular progenitor potential by protein kinase A through dual induction of Flk-1 and Neuropilin-1. *Blood* **114**, 3707-3716.
- Yamanaka, S., 2020. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **27**, 523-531.
- Yamanaka, S., Blau, H.M., 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* **465**, 704-712.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., Nishikawa, S., 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92-96.
- Yamashita, Y.M., Yuan, H., Cheng, J., Hunt, A.J., 2010. Polarity in stem cell division: asymmetric stem cell division in tissue homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001313.
- Yang, H.T., Tweedie, D., Wang, S., Guia, A., Vinogradova, T., Bogdanov, K., Allen, P.D., Stern, M.D., Lakatta, E.G., Boheler, K.R., 2002. The ryanodine receptor modulates the spontaneous beating rate of cardiomyocytes during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9225-9230.
- 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., 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR⁺ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* **453**, 524-528.
- Yang, Y., Cheung, H.H., Tu, J., Miu, K.K., Chan, W.Y., 2016. New insights into the unfolded protein response in stem cells. *Oncotarget* **7**, 54010-54027.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., Nugent, K., 2007. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* **334**, 115-124.
- Yasuda, K., Park, H.C., Ratliff, B., Addabbo, F., Hatzopoulos, A.K., Chander, P., Goligorsky, M.S., 2010. Adriamycin nephropathy: a failure of endothelial progenitor cell-induced repair. *Am J Pathol* **176**, 1685-1695.
- Yeh, E.T., Tong, A.T., Lenihan, D.J., Yusuf, S.W., Swafford, J., Champion, C., Durand, J.B., Gibbs, H., Zafarmand, A.A., Ewer, M.S., 2004. Cardiovascular complications of cancer therapy: diagnosis, pathogenesis, and management. *Circulation* **109**, 3122-3131.
- Yeh, E.T., Zhang, S., Wu, H.D., Korbling, M., Willerson, J.T., Estrov, Z., 2003. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34⁺-enriched cell population into

- cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* **108**, 2070-2073.
- Yoshida, M., Shiojima, I., Ikeda, H., Komuro, I., 2009. Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity. *J Mol Cell Cardiol* **47**, 698-705.
- 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., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.
- Yu, Y., Arora, A., Min, W., Roifman, C.M., Grunebaum, E., 2009. EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to [(3)H]thymidine uptake for in vitro measurement of mice T-cell proliferations. *J Immunol Methods* **350**, 29-35.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., Heintz, N., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077-15082.
- Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N., Ergun, S., 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543-1551.
- Zhan, H., Aizawa, K., Sun, J., Tomida, S., Otsu, K., Conway, S.J., McKinnon, P.J., Manabe, I., Komuro, I., Miyagawa, K., Nagai, R., Suzuki, T., 2016. Ataxia telangiectasia mutated in cardiac fibroblasts regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Res* **110**, 85-95.
- Zhang, R.P., Shao, J.Z., Xiang, L.X., 2011. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem* **286**, 41083-41094.
- Zhang, S., Liu, X., Bawa-Khalfe, T., Lu, L.S., Lyu, Y.L., Liu, L.F., Yeh, E.T., 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* **18**, 1639-1642.
- Zhou, J., Tang, P.C., Qin, L., Gayed, P.M., Li, W., Skokos, E.A., Kyriakides, T.R., Pober, J.S., Tellides, G., 2010. CXCR3-dependent accumulation and activation of perivascular macrophages is necessary for homeostatic arterial remodeling to hemodynamic stresses. *J Exp Med* **207**, 1951-1966.
- Zhou, S., Heller, L.J., Wallace, K.B., 2001. Interference with calcium-dependent mitochondrial bioenergetics in cardiac myocytes isolated from doxorubicin-treated rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **175**, 60-67.
- Zimmermann, M., de Lange, T., 2014. 53BP1: pro choice in DNA repair. *Trends Cell Biol* **24**, 108-117.
- Zippel, N., Limbach, C.A., Ratajski, N., Urban, C., Luparello, C., Pansky, A., Kassack, M.U., Tobiasch, E., 2012. Purinergic receptors influence the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* **21**, 884-900.
- Zou, Y., Zhang, N., Ellerby, L.M., Davalos, A.R., Zeng, X., Campisi, J., Desprez, P.Y., 2012. Responses of human embryonic stem cells and their differentiated progeny to ionizing radiation. *Biochem Biophys Res Commun* **426**, 100-105.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13**, 4279-4295.

Statistisches Bundesamt, ohne Verfasser, 2021. https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/_inhalt.html#sprg235878 [Stand: 08.08.2021]

- Statistisches Bundesamt, ohne Verfasser 2019. <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-herz-kreislauf-erkrankungen-insgesamt.html> [Stand: 08.08.2021]
- World Health Organization, 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> [Stand: 08.08.2021]

8 Anhang

8.1 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert.

Jahn, S.K., Hennicke, T., Kassack, M.U., Drews, L., Reichert, A.S., Fritz, G., 2020. Distinct influence of the anthracycline derivative doxorubicin on the differentiation efficacy of mESC-derived endothelial progenitor cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1867**, 118711

Auflistung des Eigenanteils an dieser Publikation:

Durchführung sämtlicher experimenteller Arbeiten, bis auf die des *Seahorse*-Verfahrens (Abbildung 7D). Zudem Auswertung der Ergebnisse und Erstellung der Abbildungen, sowie formale Analysen. Mitarbeit bei der Abfassung der Erstschrift, sowie der Überarbeitung und des Editierens.

Zusatzdaten (Supplementary data): Durchführung des zu dem Video gehörenden Versuchs und Erstellung der Videoaufnahme sowie der Tabellen.

Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich versichere ferner, dass die Dissertation – weder in dieser noch in ähnlicher Form – an keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde. Ich habe keine vorherigen erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28.07.2022

Sarah K. Jahn