

**Einfluss inflammatorischer Stimuli auf das kardiomyozytäre
Differenzierungspotential mesenchymaler Stammzellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hellwig, Yuliya, geb. Fedarovich
aus Minsk

Gießen, 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Franz-Grödel-Institut
Kerckhoff-Klinik Bad Nauheim
Arbeitsgruppe Experimentelle Kardiologie

Gutachter: PD Dr. phil. nat. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Schulz

Tag der Disputation: 3. September 2025

Für Andreas, Amélie, Noemi, Ole und Ylvie

1. Einleitung	1
1.1. <i>Definition und Pathogenese des Myokardinfarktes. Postinfarktremodeling.</i>	2
1.2. <i>Stammzellen für die kardiale Regeneration</i>	3
1.2.1. Embryonale Stammzellen	4
1.2.2. Myoblasten	4
1.2.3. Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark	5
1.2.4. Mesenchymale Stammzellen	5
1.2.5. Kardiale Stammzellen	7
1.2.6. Induzierte pluripotente Stammzellen	7
1.3. <i>Stammzelltherapie eines Myokardinfarktes</i>	8
1.4. <i>Wirkmechanismen der Stammzelltherapie</i>	10
1.5. <i>Stammzellnischen. Kardiale Differenzierung der Stammzellen in vitro</i>	11
1.6. <i>Nachweis kardial differenzierter Zellen</i>	13
1.7. <i>Projektbeschreibung und Fragestellung</i>	14
2. Material und Methoden	16
2.1. <i>Versuchstiere</i>	16
2.2. <i>Gewebsentnahme</i>	16
2.3. <i>Zellkultur</i>	17
2.3.1. Isolation der Fettstammzellen	17
2.3.2. Mesenchymale Stammzellen	18
2.3.3. Zellversorgung	19
2.3.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen	19
2.3.5. Zellzahlbestimmung	20
2.3.6. Isolation und Kultur adulter Kardiomyozyten	20
2.3.7. Differenzierungsversuche	27
2.4. <i>Gewinnung extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus dem Herzgewebe</i>	32
2.4.1. Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus gesunden adulten Kardiomyozyten	32
2.4.2. Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus infarziertem Herzgewebe	32

2.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
2.5. <i>Western-Blot</i>	33
2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.5.2. Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran	34
2.5.3. Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern	34
2.6. <i>Histologische und immunhistologische Färbungen</i>	35
2.6.1. Oil-Red-O Färbung.....	35
2.6.2. Alizarin Rot Färbung	36
2.6.3. Van Kossa Färbung	36
2.6.4. Immunhistochemische Färbung	37
2.7. <i>Molekularbiologische Methoden</i>	39
2.7.1. RNA-Isolation aus Zellen.....	39
2.7.2. Reverse Transkription	40
2.7.3. Primerauswahl	41
2.7.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	42
2.7.5. Gelelektrophorese.....	42
2.7.6. Quantitative Real-Time PCR	43
2.8. <i>Durchflusszytometrie</i>	44
2.9. <i>Statistische Methoden</i>	45
2.10. <i>Laborzubehör, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien</i>	45
2.10.1. Operative Geräte, Verbrauchsmaterialien, Medikamente und Chemikalien	45
2.10.2. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Medien der Zellkultur	47
2.10.3. Geräte, Reagenzien und Chemikalien für histologische und immunhistologische Methoden	48
2.10.4. Geräte, Chemikalien und molekularbiologische Kits für die quantitative RNA-Analyse	49
2.10.5. Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für Western-Blot und Proteinbestimmung	51
2.10.6. Reagenzien und Chemikalien	52
2.10.7. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	53
2.10.8. Puffer und Lösungen	54

3. Ergebnisse	56
3.1. <i>Etablierung der Methoden</i>	56
3.1.1. Zellisolation aus dem Herzen.....	56
3.1.2. Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine.....	57
3.1.3. Isolation der Fettstammzellen und Nachweis des Stammzellcharakters.....	57
3.2. <i>Nachweis der kardiomyozytären Plastizität der MSCs und der Fettstammzellen</i>	63
3.2.1. Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza.....	63
3.2.2. Ermittlung der optimalen Konzentration der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine für Stimulationsversuche.....	65
3.2.3. Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen.....	66
3.2.4. Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen.....	68
3.2.5. Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC nach direkter Kokultur mit adulten Kardiomyozyten.....	69
3.3. <i>Auswirkung inflammatorischer Stimuli auf die kardiomyozytäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen</i>	70
3.3.1. Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC unter dem Einfluss von LPS.....	71
3.3.2. Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC unter dem Einfluss von TNF-alpha.....	74
3.3.3. Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen unter dem Einfluss extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus den infarzierten Herzen.....	75
4. Diskussion	77
4.1. <i>Isolation adulter Kardiomyozyten</i>	78
4.2. <i>Isolation der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine zur Simulation einer physiologischen kardialen Differenzierungsnische</i>	79

4.3.	<i>Isolation der Fettstammzellen</i>	80
4.4.	<i>Kardiomyozytäre Plastizität der MSC und der Fettstammzellen</i>	81
4.5.	<i>Auswirkung inflammatorischer Stimuli auf das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der Stammzellen</i>	84
4.5.1.	<i>Proteinextrakt aus dem infarzierten Herzen als inflammatorischer Stimulus</i>	86
5.	Zusammenfassende Beurteilung	89
6.	Summary	90
7.	Abbildungsverzeichnis	91
8.	Tabellenverzeichnis	94
9.	Abkürzungsverzeichnis	95
10.	Literaturverzeichnis	97
11.	Erklärung zur Dissertation	110
12.	Danksagung	111

1. Einleitung

Die koronare Herzkrankheit (KHK) und Ihre Folgen sind laut den aktuellen Daten der Weltgesundheitsorganisation Todesursache Nummer eins weltweit (The top 10 causes of death, 2024). Der Myokardinfarkt, als eine von den Folgen der KHK, führt zum irreversiblen Verlust von Herzmuskelgewebe und setzt Prozesse in Gang, die zu einer globalen Herzinsuffizienz führen können und somit die Lebenserwartung und die Lebensqualität der betroffenen Patienten einschränken (Shah & Shalia, 2011).

Die Folgen eines Herzinfarktes könnten durch die Regeneration des Herzmuskelgewebes vollständig geheilt werden. In vitro konnte gezeigt werden, dass viele Typen von Stammzellen über ein kardiales Differenzierungspotential verfügen, sodass eine Regeneration des Herzmuskels durch Stammzellen eine potenziell kurative Therapiestrategie bei einem Myokardinfarkt darstellen könnte (Barbuti, 2010; Gupta et al., 2021; Jumabay et al., 2009; Orlic et al., 2003).

Die Verwendung von Stammzellen zur Therapie eines Herzinfarktes wird seit 2001 in klinischen Studien untersucht (Schächinger et al., 2006a). Die ersten Studien brachten sehr vielversprechende Ergebnisse, denn sie zeigten, dass die Verwendung der Stammzellen zusätzlich zur Standardtherapie eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion (LVEF) und Senkung der Mortalität im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie erzielte (Schächinger et al., 2006b; Schächinger et al., 2006a). Man ist sich einig, dass für die positiven therapeutischen Effekte hauptsächlich die parakrinen antiapoptotischen und entzündungsmodulierenden Einflüsse der Stammzellen verantwortlich sind (Leistner & Fischer-Rasokat et al., 2011; Schächinger et al., 2009). Ob die injizierten Stammzellen in vivo in der Lage sind, sich zu funktionell relevanten Kardiomyozyten zu differenzieren und dadurch die Regeneration von Myokardgewebe erzielen können, bleibt umstritten (Gupta et al., 2021; Paul et al., 2009; Reinecke et al., 2002; Wu et al., 2011).

Über die Jahre wurde die Standardtherapie zunehmend optimiert, sodass die neuesten Studien kaum einen zusätzlichen Nutzen der Stammzelltherapie zeigen (Mathur et al., 2020).

Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studie hat gezeigt, dass in einem gesunden Milieu frei zirkulierende adulte Stammzellen in der Lage sind sich vielfältig zu differenzieren (Möllmann et al., 2011). Sie bildeten ein fein kapillarisiertes spezialisiertes

Gewebe, in dem auch frühe Vorstufen der Kardiomyozyten nachweisbar waren (Möllmann et al., 2011). Somit ist eine kardiale Differenzierung der Stammzellen innerhalb einer gesunden Umgebung möglich (Möllmann et al., 2011), und wir vermuten, dass das inflammatorische Milieu, das nach einem Herzinfarkt herrscht, eine kardiale Differenzierung der Stammzellen stört.

1.1. Definition und Pathogenese des Myokardinfarktes. Postinfarktremodeling

Bei einem Myokardinfarkt kommt es durch eine anhaltende Ischämie zu einer Koagulationsnekrose der Herzmuskulatur (Böcker, 2012; Lüllmann-Rauch & Asan, 2024). Die Ischämie kann durch ein primär koronares Ereignis, wie zum Beispiel Ruptur, Erosion oder Rissbildung von Plaque oder koronare Dissektion, entstehen (Böcker, 2012; Lüllmann-Rauch & Asan, 2024). Auch kann die Ischämie aufgrund erhöhten Sauerstoffbedarfs bei Hypertonie oder verminderter Versorgung durch Koronarspasmen, Arrhythmien oder Hypotonie entstehen (Böcker, 2012; Lüllmann-Rauch & Asan, 2024). Bei einer absoluten Ischämie des Myokards sind die Veränderungen an den Zellorganellen schon nach 10 Minuten elektronenmikroskopisch sichtbar (Lüllmann-Rauch & Asan, 2024). Innerhalb von vier bis sechs Stunden kommt es durch die beginnende Koagulationsnekrose zu irreversiblen Veränderungen der Myofibrillen und eine Entzündungsreaktion wird in Gang gesetzt (Böcker, 2012).

Das Zusammenspiel von freigesetzten Chemokinen, aktivierten Komplementfaktoren und Selektinen sorgt für die Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das Infarktgebiet (Monden et al., 2007; Sack et al., 2000). Die Membran der Neutrophilen wird unter dem Einfluss von Chemokinen weniger plastisch und von den Neutrophilen selbst freigesetzte Mediatoren führen zu einer Vasokonstriktion (Dhalla et al., 2000; Frangogiannis, 2002). Somit bleiben die Neutrophilen in den Kapillaren stecken, was zur Störung der Mikrozirkulation führt (Frangogiannis, 2008, 2008). Die von den Neutrophilen freigesetzten proteolytischen Enzyme und reaktiven Sauerstoffradikale führen außerdem zu einer direkten Schädigung der umgebenden Zellen (Troidl et al., 2009, 2009).

Weiterhin wandern unter den chemotaktischen Einflüssen die Makrophagen in das Infarktgebiet ein (Acquistapace et al., 2011; Frangogiannis, 2002; Kologrivova et al., 2021; Kurrelmeyer et al., 2000). Sie phagozytieren die Zelldebris und führen durch die Produktion von Metalloproteinasen und deren Inhibitoren zu der Reorganisation von

extrazellulärem Gewebe (Bassiouni et al., 2023; Möllmann et al., 2011; Rossen et al., 1994).

Ab dem 3.-7. Tag sprießt eine zunehmende Zahl von Kapillaren aus dem interstitiellen Gewebe in die Koagulationsnekrose ein (Böcker, 2012). Es beginnt die Bildung von Granulationsgewebe, welches aus Entzündungszellen, neu eingesprossenen Gefäßen und Fibroblasten-ähnlichen Zellen besteht (van den Borne et al., 2009). Diese Fibroblasten-ähnlichen Zellen produzieren zusammen mit Myofibroblasten Kollagen (van den Borne et al., 2009). Nach etwa 6 Wochen ist die Koagulationsnekrose durch das kollagene Bindegewebe ersetzt, es entsteht eine Myokardinfarkt Narbe (Böcker, 2012). Eine Anreicherung von Kollagen findet auch im benachbarten gesunden Myokard statt. Diese Prozesse, die zusammengefasst als kardiales Remodeling bezeichnet werden, führen zu einer erheblichen Einschränkung der Myokardfunktion bis hin zur Herzinsuffizienz (Frantz et al., 2022; Olson, 2024; Shah & Shalia, 2011).

Die klinischen Folgen hängen von der Lokalisation und der Ausdehnung des Infarktes bzw. der Infarkt Narbe und dem Ausmaß des Remodelings, sowie vom Zeitpunkt der akuten therapeutischen Intervention nach dem Myokardinfarkt ab (Frantz et al., 2022).

1.2. Stammzellen für die kardiale Regeneration

Stammzellen sind eine undifferenzierte Zellpopulation, welche die Möglichkeit besitzt, sich zu erneuern und sich in verschiedene Zellarten zu differenzieren (Drenckhahn & Christ, 2008; Pountos et al., 2007). Je nach Art, besitzen die Stammzellen das Potential sich zu jedem Gewebe oder in bestimmte festgelegte Gewebetypen zu differenzieren (Tian et al., 2023).

Eine Zygote besteht bis zum 8-Zell-Stadium aus den omnipotenten Stammzellen, den Blastomeren (Tian et al., 2023). Omnipotent bedeutet, dass aus jeder einzelnen dieser Zellen ein gesamter Organismus inklusive des embryonalen Teils der Plazenta entstehen kann (Tian et al., 2023).

Ab dem 16-Zell-Stadium rücken die Blastomeren dichter aneinander und die Zygote geht vom Morulastadium zum Blastozystenstadium über (Drenckhahn & Christ, 2008; Tian et al., 2023). Hier beginnt schon eine funktionelle Differenzierung (Drenckhahn & Christ, 2008). Die Zellen, die sich im inneren Teil der Blastozyste befinden, die Embryoblasten oder auch embryonale Stammzellen genannt, sind pluripotent, das heißt sie können alle Zelltypen eines Individuums liefern, nicht aber die Plazenta (Drenckhahn & Christ, 2008; Lüllmann-Rauch & Asan, 2024). Die äußere Zellschicht der Blastozyste formt den

sogenannten Trophoblast, aus dem sich später die Anteile der Plazenta bilden (Tian et al., 2023).

Im postnatalen Organismus findet man verschiedene Typen von adulten multipotenten Stammzellen, wie die mesenchymalen Stammzellen oder die hämatopoetischen Stammzellen (Siegel et al., 2012). Aus diesen Zellen können verschiedene, aber nicht alle Zelltypen entstehen (Pountos et al., 2007). Im menschlichen Körper stellen die adulten Stammzellen ein Reservoir für Reparaturen dar und werden durch Signale wie Inflammation, Verletzung oder Nekrose aktiviert (Kolios & Moodley, 2013; Pountos et al., 2007).

Lange Zeit galt der Herzmuskel als ein nicht zur Regeneration fähiges Gewebe. Im Jahr 2003 konnten Orlic et al. in einer tierexperimentellen Studie an Mäusen zeigen, dass die in das Infarktgebiet injizierten Knochenmarkstammzellen sich zu Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen differenzierten (Orlic et al., 2003). Dieses neu entstandene Gewebe ersetzte zu 68% das Infarktgebiet und die Pumpfunktion verbesserte sich signifikant (Orlic et al., 2001; Orlic et al., 2003).

In den darauffolgenden Jahren wurden viele Arten von Stammzellen und Vorläuferzellen im Hinblick auf die kardiomyozytäre Differenzierung untersucht.

Im Folgenden sind sie in Bezug auf die kardiale Regeneration beschrieben.

1.2.1. **Embryonale Stammzellen**

Die embryonalen Stammzellen sind pluripotent und besitzen schon definitionsgemäß die Fähigkeit zur kardialen Differenzierung (Maltsev et al., 1993; Rikhtegar et al., 2019). Eine klinische Anwendung ist in Deutschland aus ethischen Gesichtspunkten aktuell nicht möglich, denn die Gewinnung menschlicher embryonaler Stammzellen zu Forschungszwecken ist in Deutschland verboten (ESchG - Gesetz zum Schutz von Embryonen, 2024).

1.2.2. **Myoblasten**

Ruhende Myoblasten, oder auch Satellitenzellen genannt, sind die Vorläuferzellen der Skelettmuskulatur (Kessler & Byrne, 1999). Sie dienen einerseits dem Wachstum, andererseits der Regeneration der Skelettmuskelfaser nach einer Verletzung (Kessler & Byrne, 1999). Kessler et al. haben die Myoblasten der Skelettmuskulatur in Bezug auf die kardiale Reparatur untersucht (Kessler & Byrne, 1999). Auf den ersten Blick ist es naheliegend, Zellen aus einem funktionell verwandten Gewebe für die kardiale Reparatur zu benutzen (Davani et al., 2005; Rikhtegar et al., 2019). Unterschiede in der Zellorganisation könnten jedoch einschränkend sein: zum einen die reduzierte Anzahl

von Gap junction im Skelettmuskel, zum anderen das Fehlen von L-Typ-Kalziumkanälen, was die elektromechanische Koppelung zwischen Skelett- und Herzmuskelzellen erschwert (Davani et al., 2005). Reinecke et al. zeigte in einem Rattenmodell, dass sich Satellitenzellen innerhalb einer kardialen Nische zu Skelettmuskelzellen und nicht zu Kardiomyozyten entwickeln (Reinecke et al., 2002). Eine Phase-1-klinische Studie aus Frankreich zeigte keine Verbesserung in der LVEF nach Injektion der Myoblasten in das Infarktgebiet (Menasché et al., 2003; Menasché et al., 2008). Zudem blieb eine potenziell arrhythmogene Wirkung nicht ausgeschlossen, sodass diese Therapie als potentiell nicht patientensicher gilt (Kitsuka et al., 2022; Menasché et al., 2003; Menasché et al., 2008; Müller et al., 2018).

1.2.3. **Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark**

Die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark (BMC) sind eine heterogene Zellpopulation, die zu 98% aus differenzierten Zellen, wie hämatopoetischen Zellen, Adipozyten, Osteoblasten, Endothelzellen, und zu 2% aus Vorläuferzellen, wie hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Stammzellen und mesenchymalen Stammzellen, besteht (Polymeri et al., 2016). Der Nutzen der Knochenmarkstammzellen für eine Therapie des Myokardinfarktes wurde zunächst im Mausmodell untersucht. In der Studie von Orlic et al. wurden Lin- und c-kit+ BMC mit enhanced green fluorescent protein (EGFP) markiert und in ein infarktangrenzendes Myokardgewebe injiziert (Orlic et al., 2001). Diese Zellen migrierten in das infarzierte Gewebe und besetzten bis zu 68% der infarzierten Region (Orlic et al., 2001). Etwa 54% der neuen Kardiomyozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen exprimierten EGFP (Orlic et al., 2001). Diese neu entstandenen Kardiomyozyten zeigten sich als funktionell kompetent und exprimierten die kardialen Marker MEF2c, GATA 4 und Csx/Nkx 2,5 (Orlic et al., 2001). Die Expression von Connexin 43 deutete auf die Ausbildung von Gap junctions hin (Orlic et al., 2001). Eine andere Studie am Mausmodell von Orlic et al. zeigte, dass die Mobilisation von BMC mit Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktoren (G-CSF) zur Verbesserung der LVEF, Reduktion der Mortalität und der Infarktgröße führte (Orlic et al., 2003). Seit 2001 werden Knochenmarkstammzellen bei Herzinfarktpatienten im Rahmen klinischer Studien eingesetzt (Schächinger et al., 2006b).

1.2.4. **Mesenchymale Stammzellen**

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind multipotente, undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit zur Proliferation, Selbsterneuerung und multilinearen Differenzierung (Pittenger et al., 1999; Psaltis et al., 2008). Dabei hängt die Differenzierungsrichtung der

MSC davon ab, in welches Gewebe sie gelangen (Sanz-Ruiz et al., 2009). Sie kommen in vielen Geweben vor und werden anhand des Ursprungsorgans oder Gewebes, Oberflächenmarkers und Differenzierungsverhaltens charakterisiert (Augello, 2010; Shah & Shalia, 2011). MSC wurden zum ersten Mal 1970 von Friedenstein et al. aus dem Knochenmark isoliert (Friedenstein et al., 1970; Phinney, 2024). Später wurden diese Zellen auch in anderen Geweben entdeckt, wie zum Beispiel im Knorpel, Fett, Muskel und Periost. Die drei definierenden Kriterien für die mesenchymalen Stammzellen sind die Adhärenz zu Plastik, die Expression spezifischer Oberflächenantigene: > 90% CD105, CD 90, CD73; < 2% CD45, CD11b, CD34, CD14, CD79, CD 19 und HLA II sowie die Fähigkeit sich zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Clavellina et al., 2023; Dominici et al., 2006; Phinney, 2024).

Die Charakterisierung der MSC nur anhand der Oberflächenantigene ist schwierig, da der Phenotyp unter in vivo- und in vitro- Bedingungen variiert. So können MSC während der in vitro-Kultur einige Oberflächenmarker runterregulieren und andere neu exprimieren (Jones et al., 2002).

Die Fähigkeit der MSC sich zu Herzmuskelzellen zu differenzieren, wurde in vielen Studien untersucht (Choi et al., 2010; Gaustad et al., 2004; Rangappa et al., 2003; Vassalli & Moccetti, 2011). So wurde berichtet, dass eine Kokultur mit neonatalen Kardiomyozyten MSC zu schlagenden Kardiomyozyten differenzieren lässt (Choi et al., 2010). Weiterhin wurde eine Differenzierung der MSC zu schlagenden Herzmuskelzellen nach deren Permeabilisierung mit Streptolysin O und nachfolgender Stimulation mit einem Proteinextrakt aus Kardiomyozyten der Ratten beschrieben (Gaustad et al., 2004). Mehreren Arbeitsgruppen ist es gelungen, eine kardiale Differenzierung der MSC durch eine Stimulation mit der Substanz 5-azacytidine zu erzielen (Rangappa et al., 2003; Vassalli & Moccetti, 2011).

Auch wurde eine spontane Differenzierung der MSC zu schlagenden Herzmuskelzellen in der Zellkultur beschrieben (Planat-Benard, 2004).

Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe, die Fettstammzellen (=adipose derived Stem Cells (ASC)), scheinen besonders interessant zu sein. Der Vorteil der ASC gegenüber den anderen MSC liegt potentiell darin, dass diese Zellen leicht zugänglich sind, sich in großen Mengen gewinnen und in vitro schnell vermehren lassen (Zhu et al., 2009). Wenn man bedenkt, dass nach einem Myokardinfarkt bis zu 1,5 Billionen Kardiomyozyten zugrunde gehen (Paul et al., 2009) und eine kurative Therapie diese Anzahl wiederherstellen sollte, könnte eine große Zahl an transplantierten Zellen von Vorteil sein.

Zur Identifizierung von ASC sind keine universalen Marker bekannt. Im Wesentlichen exprimieren ASC die gleichen Oberflächenmarker wie die MSC, und zwar CD 117, CD 29, CD 105, CD 54 und CD 44 (Sanz-Ruiz et al., 2009; Shah & Shalia, 2011). Funktionale Tests anhand der Differenzierungsversuche sind notwendig, um die Multipotenz nachzuweisen (Mosna et al., 2010; Qin et al., 2023).

Das Proliferations- und Differenzierungspotential der ASC scheint von Faktoren wie Alter der Patienten, Lokalisation und Art des Fettgewebes sowie der chirurgischen Prozedur zur Gewinnung abhängig zu sein (Qin et al., 2023; Sanz-Ruiz et al., 2009).

1.2.5. **Kardiale Stammzellen**

Bearzi et al. konnte aus dem Biopsiematerial vom Herzmuskel Zellen isolieren, die die Stammzellmarker c-kit und sca-1 exprimierten und ex vivo expandiert werden konnten. Von diesen Zellen exprimierten gleichzeitig 7 bis 10 % die für unreife Kardiomyozyten spezifischen Marker GATA 4, Nkx2.5 und Mef2c (Bearzi et al., 2007). Die Injektion dieser Zellen in die infarzierten Maus- oder Rattenherzen führte zur Entstehung neuer Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen, welche die Infarkt Narbe ersetzten und somit zur Regeneration des Herzmuskels und einer Verbesserung der LVEF führten (Kajstura et al., 2008; Paul et al., 2009; Shah & Shalia, 2011; Siu et al., 2010).

Die kardialen Stammzellen befinden sich in speziellen Nischen, die deren Wachstum und Vermehrung unterstützen. Im Herzen sind diese Nischen in Vorhöfen und Apex lokalisiert. Es gibt Hinweise, dass die Zahl der kardialen Stammzellen nach einem ischämischen Ereignis erhöht ist und die Zellen zum verletzten Gebiet migrieren (Bearzi et al., 2007; Boudoulas & Hatzopoulos, 2009; Paul et al., 2009).

Die Anzahl kardialer Stammzellen ist jedoch klein und scheint mit zunehmendem Alter noch kleiner zu werden (Brunet et al., 2023; Cianflone et al., 2020). Es wird vermutet, dass die kardialen Stammzellen im Rahmen der Organhomöostase und auch im gestressten Myokard als Quelle neuer Zellen dienen (Cianflone et al., 2020; Shah & Shalia, 2011). Warum sie nicht ausreichend zur Regeneration der kardialen Funktion nach einem Herzinfarkt beitragen, ist unklar. Vermutet wird, dass die reduzierte Oxygenierung und Perfusion die Rekrutierung der residualen kardialen Stammzellen behindert (Brunet et al., 2023; Paul et al., 2009).

1.2.6. **Induzierte pluripotente Stammzellen**

Die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) werden aus adulten Zellen generiert, indem man sie mit spezifischen Transkriptionsfaktoren reprogrammiert (Takahashi &

Yamanaka, 2006). In ihren Eigenschaften ähneln diese Zellen den embryonalen Stammzellen und haben den Vorteil, dass das ethische Dilemma entfällt (Paul et al., 2009). Das kardiale Differenzierungspotential der iPSC wurde experimentell nachgewiesen (Musunuru et al., 2018; Siu et al., 2010). Die denkbaren Nachteile für die klinische Anwendung bestehen in einer potenziellen Gefahr der unkontrollierten Proliferation und Onkogenese sowie einem arrhythmogenen Potential (Burridge et al., 2012; Paul et al., 2009; Siu et al., 2010) Die Verwendung der iPSC konzentriert sich aktuell hauptsächlich auf Konstruktion kardiovaskulärer Krankheitsmodelle oder Entwicklung/Testung patientenspezifischer Medikamente (Musunuru et al., 2018; Sugiura et al., 2024). Zur klinischen Anwendung für kardiale Regeneration sind seit 2019 weltweit vier Studien gestartet in Japan, China und Deutschland (Sugiura et al., 2024) .

1.3. Stammzelltherapie eines Myokardinfarktes

Weltweit erhielten bereits mehr als 3000 Herzinfarktpatienten eine Stammzelltherapie, sie wird seit 2001 im Rahmen klinischer Studien durchgeführt (Assmus et al., 2016). Die Metaanalyse von Fisher et al. aus dem Jahr 2015 umfasst 31 randomisierte, kontrollierte klinische Studien, von denen 28 über den Einsatz der Stammzellen zur Therapie der ischämischen Kardiomyopathie und drei zur Therapie der nichtischämischen dilatativen Kardiomyopathie berichten (Fisher et al., 2015). In den meisten Studien wurden autologe, aus dem Knochenmark gewonnene mononukleäre Zellen (BMC) verwendet (Dimmeler & Zeiher, 2009; Fisher et al., 2015). In zwei Studien wurden Patienten vor der Knochenmarkentnahme mit G-CSF behandelt. In einer Studie wurden die Stammzellen mittels Leukapherese nach Stimulation mit G-CSF gewonnen. In einer weiteren Studie wurden in der Zellkultur endotheliale Progenitorzellen aus der mononukleären Zellfraktion selektiert (Fisher et al., 2015). Drei Studien verwendeten mesenchymale Stammzellen, die aus den mononukleären Zellen des Knochenmarks kultiviert wurden (Fisher et al., 2015). In einer Studie wurden c-kit positive kardiale Stammzellen verwendet und eine Studie verwendete Fettstammzellen (Fisher et al., 2015). Die applizierte Zellzahl variierte zwischen 5×10^5 bei den kardialen Stammzellen bis $8,4 \times 10^8$ bei den BMC oder bei den Myoblasten aus dem Skelettmuskel (Fisher et al., 2015). Die Applikation der Stammzellen erfolgte entweder intrakoronar im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung oder durch eine direkte Injektion in das Myokard im Rahmen eines herzchirurgischen Eingriffes (Fisher et al., 2015).

Die Metaanalyse zeigte, dass die Stammzelltherapie patientensicher ist und kein erhöhtes Risiko für Arrhythmien mit sich bringt (Dimmeler & Zeiher, 2009; Fisher et al.,

2015; Leistner & Fischer-Rasokat et al., 2011). Das Risiko für eine erneute Hospitalisierung aufgrund einer Verschlechterung der Herzfunktion sowie die Mortalität waren bei den Patienten, die eine Zelltherapie erhielten, geringer (Fisher et al., 2015). Weiterhin führte die Zelltherapie zur Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und zur Verbesserung der Symptome der Herzinsuffizienz (Fisher et al., 2015). Letzteres wurde anhand der NYHA-Stadien und NT-pro-BNP-Level verifiziert. Die Lebensqualität und physische Belastbarkeit waren bei den mit Stammzellen behandelten Patienten ebenfalls besser (Fisher et al., 2015). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den positiven Wirkungen zwischen den unterschiedlichen Zellarten (Fisher et al., 2015). Auch schien die Art der Applikation der Stammzellen keinen Einfluss auf die Wirkung zu haben (Fisher et al., 2015).

In der Phase-I-klinischen Studie SCIPIO wurden c-kit positive kardiale Stammzellen autolog transplantiert (Chugh et al., 2012). Die mittlere Ausgangs-LVEF von $27,5 \pm 1,6\%$ verbesserte sich auf $35,1 \pm 2,4\%$ nach vier Monaten und nach zwölf Monaten auf $41,2 \pm 4,5\%$. Die Infarktgröße wurde nach vier Monaten um 22,7% und nach zwölf Monaten um 30,2% kleiner (Assmus et al., 2014; Chugh et al., 2012; Dimmeler & Zeiher, 2009; Leistner & Fischer-Rasokat et al., 2011; Leistner & Schmitt et al., 2011).

In der Phase II Placebo-kontrollierten multizentrischen klinischen Studie REPAIR-AMI, die 2004 und 2005 durchgeführt wurde, zeigte sich, dass die Infusion von Knochenmarkstammzellen (BMC) in Kombination mit der Standardtherapie im Vergleich zur alleinigen Standardtherapie, mit einer signifikanten Verbesserung der LVEF assoziiert war (Schächinger et al., 2009). In der Placebogruppe zeigte sich eine Erhöhung des Endsystolischen Volumens (ESV) und des Enddiastolischen Volumens (EDV) bei gleichzeitig verringerter Ejektionsfraktion (EF) (Schächinger et al., 2009). In der BMC-Gruppe blieb das ESV unverändert, die LVEF verbesserte sich bei einem Ausgangswert von $\leq 48,9\%$ um 5% (Schächinger et al., 2009). Im 5 Jahres Follow-up dieser Studie zeigte sich eine reduzierte Sterblichkeitsrate sowie langfristig positive Auswirkungen auf die Ejektionsfraktion und Residualvolumen (Assmus et al., 2014).

Eine im Jahr 2012 veröffentlichte Metaanalyse von Jeevanantham et al. zeigte im Langzeit Follow-up geringere Todesraten und weniger Reinfarkte nach der Therapie mit mononukleären Stammzellen (Jeevanantham et al., 2012).

Die an der Medizinischen Hochschule Hannover im Jahr 2017 durchgeführte BOOST-2-Studie zeigte wiederum keine Verbesserung der Pumpfunktion (Wollert et al., 2017).

Auch in der SWISS AMI Studie, deren Ergebnisse 2013 veröffentlicht wurden, zeigte sich keine signifikante Verbesserung der LVEF (Sürder et al., 2010; Sürder et al., 2013).

Diese widersprüchlichen Ergebnisse aller bisher durchgeführten Studien zum Nutzen der Stammzelltherapie sollte die große Multizentrische randomisierte kontrollierte Phase-III-Studie BAMI klären (Mathur et al., 2020). BAMI startete im September 2013 und es sollten in elf europäischen Ländern rund 3000 Patienten rekrutiert werden (Mathur et al., 2020). Ziel dieser Studie war eine eindeutige Antwort auf die Frage, ob die Therapie mit Stammzellen einen zusätzlichen Nutzen für die Patienten hat oder nicht. Dies sollte an der Gesamtmortalität gemessen werden (Mathur et al., 2020).

Die Ergebnisse der BAMI-Studie wurden 2020 publiziert, es konnten nur 375 Patienten rekrutiert werden und es zeigte sich in beiden Gruppen eine vergleichbar niedrige Mortalität (Mathur et al., 2020). Die Autoren sprechen von der deskriptiven Bedeutung der erhobenen Daten. Im Vergleich zur in den Jahren 2004 und 2005 durchgeführten REPAIR-AMI-Studie, die eine deutliche Verbesserung der Gesamtmortalität zeigte, und laut den Daten aus dem Jahr 2011, wo Patienten mit einer LVEF<45% nach der Reperfusionstherapie eine Gesamtmortalität von 12 % innerhalb von 2 Jahren aufwiesen, zeigt sich in BAMI eine Gesamtmortalität von 3,5% in beiden Gruppen (Assmus et al., 2014; Leistner & Fischer-Rasokat et al., 2011; Mathur et al., 2020; Schächinger et al., 2009).

Durch die über die Jahre stetige Optimierung der Standardtherapie scheint aktuell der zusätzliche Nutzen der Stammzelltherapie angesichts des nötigen Aufwandes und der nötigen Ressourcen, hiernach eher gering zu sein.

1.4. Wirkmechanismen der Stammzelltherapie

Die positiven Auswirkungen der Stammzelltherapie bei den Herzinfarktpatienten beruhen hauptsächlich auf den parakrinen Effekten. Die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark, die in den meisten klinischen Studien verwendet wurden, sind eine sehr heterogene Zellpopulation, die überwiegend aus den hämatopoetischen Zellen verschiedener Reifestufen besteht und nur zu einem geringen Anteil aus hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen und mesenchymalen Stammzellen (MSC) (Clavellina et al., 2023; Dimmeler & Zeiher, 2009; Müller et al., 2018; Schächinger et al., 2006a). Die MSC sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche im Infarktgebiet die Angiogenese anregen, die Kardiomyozyten vor Apoptose schützen und das Remodeling positiv beeinflussen (Boudoulas & Hatzopoulos, 2009; Paul et al.,

2009). Weiterhin wird beschrieben, dass MSC die kardialen Stammzellen aktivieren und deren Proliferation, die Migration in das Zielgebiet und die Ausdifferenzierung anregen (Gupta et al., 2021; Nakanishi et al., 2008). Zusätzlich wird berichtet, dass MSC die Inflammation im Infarktgebiet modulieren können, indem sie die Lymphozytenproliferation inhibieren und einen antiinflammatorischen Einfluss auf die Makrophagen haben (Clavellina et al., 2023; Rikhtegar et al., 2019; Spaggiari et al., 2007).

Ob die injizierten Stammzellen tatsächlich in der wünschenswerten Lage sind, die durch die Ischämie verloren gegangene Zellmasse zumindest teilweise zu ersetzen, ist sehr umstritten, wird aber in Einzelfällen beschrieben (Orlic et al., 2001).

Wie bereits oben erwähnt, besteht die injizierte Zellmasse zum größten Teil aus Zellen, die kein multilineares Differenzierungspotential besitzen (Müller et al., 2018; Shah & Shalia, 2011). Zudem wurde gezeigt, dass nach einer Injektion von hunderten Millionen Zellen weniger als zwei Prozent tatsächlich im Gewebe verbleiben (Shah & Shalia, 2011). Somit wird die positive Wirkung, durch eine direkte Differenzierung zu Kardiomyozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen, als gering angesehen (Müller et al., 2018).

Einige Studien beschreiben eine direkte Regeneration durch Fusion der injizierten Stammzellen mit Herzmuskelzellen (Giacca, 2020).

Zusammenfassend sind Angiogenese, Reduktion der Apoptose, Modulation der Immunantwort und des Remodeling die grundsätzlichen Wirkmechanismen (Clavellina et al., 2023).

1.5. Stammzellnischen. Kardiale Differenzierung der Stammzellen *in vitro*

Die adulten Stammzellen existieren innerhalb definierter dreidimensionaler Strukturen, welche als Nischen bezeichnet werden. Diese Strukturen bestehen aus den umliegenden Zellen, der extrazellulären Matrix, den Wachstumsfaktoren sowie diversen Mediatoren, und bilden zusammen ein (Zhu et al., 2009) Mikromilieu, welches das Überleben, die Vermehrung und die Differenzierung der Stammzellpopulation reguliert (Ferrai & Schulte, 2024; Fuchs & Blau, 2020). Die Nische spielt eine wesentliche Rolle in der Stammzellendifferenzierung und jedes Organ oder Gewebe stellt eine spezifische, einzigartige Differenzierungsnische dar (Brunet et al., 2023). Werden adulte

Stammzellen in eine definierte Organ- oder Gewebenische versetzt, so differenzieren sie sich in die für dieses Organ oder Gewebe spezifischen Zellen (Brunet et al., 2023). Hierauf basieren die meisten in vitro-Differenzierungsstudien an Stammzellen. Um eine gewebsspezifische Differenzierung der Stammzellen in vitro zu erzielen, werden sie den Stimuli ausgesetzt, die in der entsprechenden Differenzierungsnische vorkommen, seien es Proteinextrakte, der Kontakt zu den durch die entsprechenden Zellen sezernierten Stoffen, oder der direkte Kontakt zu den spezialisierten Zellen (Gaustad et al., 2004; Perán et al., 2010).

So hat Choi et al. die humanen ASC mit den neonatalen Kardiomyozyten von Ratten kultiviert. Bereits nach einer Woche haben die ASC eine längliche Form angenommen und begannen spontan rhythmisch zu schlagen (Choi et al., 2010). Weiterhin exprimierten sie die kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 sowie die kardialen kontraktilen Proteine Troponin I und beta-MHC (Choi et al., 2010). Zhu et al. zeigten eine kardiale Differenzierung der humanen ASC nach einer indirekten Kokultur mit neonatalen Kardiomyozyten der Ratte (Zhu et al., 2009). Dabei zeigte diese Arbeitsgruppe, dass die direkten Zell-Zell-Kontakte der Stammzellen mit den Kardiomyozyten nicht unbedingt notwendig sind und dass der Einfluss sezernierter Faktoren ausreichend für die Induktion der kardialen Differenzierung ist (Zhu et al., 2009). Die mechanischen Reize durch die Kontraktionen scheinen jedoch einen zusätzlichen Stimulus darzustellen. So zeigte Zhu et al., dass in einer direkten Kokultur im Vergleich zur indirekten Kokultur eine stärkere Expression der für Kardiomyozyten spezifischen Marker zu erzielen war (Zhu et al., 2009).

In der Arbeit von Gaustad et al. wurde eine kardiale Differenzierung der humanen ASC zu Kardiomyozyten nach einer Exposition mit einem Proteinextrakt aus den Kardiomyozyten der Ratte beschrieben (Gaustad et al., 2004). Perán et al. zeigten 2010 eine kardiale Differenzierung der humanen ASC nach einer Inkubation mit dem intrazellulären Proteinextrakt aus Herzvorhöfen (Perán et al., 2010).

Alternativ kann eine kardiale Differenzierung der Stammzellen durch die Wirkung eines demethylierenden Agens hervorgerufen werden. So ist eine kardiale Differenzierung der Stammzellen nach Stimulation mit 5-azacytidin (5-aza) mehrfach in der Literatur beschrieben (Christman, 2002). 5-aza ist eine DNA-demethylierende Substanz und wurde zum ersten Mal 1964 von Piskala und Sorm synthetisiert (Christman, 2002; Farag et al., 2024). Sie wurde ursprünglich als Nukleosid-Antimetabolit zur Behandlung von akuter myeloischer Leukämie entwickelt. 5-aza integriert sich anstelle von Cytidin in die RNA und DNA und macht diese instabil, sodass sie anschließend abgebaut werden kann

(Halle, 1968; Karon & Benedict, 1972). Als Chemotherapeutikum fand 5-aza aufgrund der hohen Toxizität keine breite Verwendung (Christman, 2002).

In niedrigen Dosen bindet 5-aza irreversibel an die DNA-Methyltransferase und hemmt ihre Aktivität, was zur Demethylierung der DNA-Fragmente und somit zu einer veränderten Genexpression führt (Christman, 2002). Rangappa et al. zeigten, dass die Stimulation der ASC mit 5-aza zur Entwicklung schlagender Zellcluster führte (Rangappa et al., 2003). Die Transformationsrate betrug 20-30 % (Rangappa et al., 2003). Dijk et al. zeigten, dass eine Behandlung der humanen ASC mit 5-aza zu einer signifikanten Erhöhung der Expression kardialer Marker führte (Dijk et al., 2008). Antonitsis et al. behandelten mit 5-aza die MSC aus dem Knochenmark und zeigten ebenfalls eine kardiale Differenzierung (Antonitsis et al., 2007). Haghani et al. stimulierten mit 5-aza Stromazellen aus dem Knochenmark und konnten so eine kardiale Differenzierung erzielen (Haghani et al., 2012). Viele weitere Arbeitsgruppen beschreiben ebenfalls eine erfolgreiche kardiale Differenzierung nach einer Stimulation der Stammzellen mit 5-aza (Abbey & Seshagiri, 2013; Choi et al., 2004).

Auch eine spontane Differenzierung der Fettstammzellen zu Kardiomyozyten wurde beschrieben (Planat-Benard, 2004).

1.6. Nachweis kardial differenzierter Zellen

Zum Nachweis kardial differenzierter Zellen wurde in allen Differenzierungsstudien die Expression bestimmter für die Kardiogenese essenzieller und spezifischer Gene bzw. Proteine herangezogen. Die Expression der Gene wurde mittels RT-PCR gemessen, der Nachweis der Proteine erfolgte durch immunhistochemische Färbungen.

Nkx2.5 ist ein Homeobox-Domän-Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle in der frühen kardialen Entwicklung (Zhu et al., 2009). GATA4 ist ebenfalls ein früher Transkriptionsfaktor und für eine korrekte kardiale Morphogenese essenziell. Mutationen im GATA4-Gen sind mit Herzfehlbildungen assoziiert (Pikkarainen et al., 2004). GATA4 aktiviert für die Proteine des kontraktile Apparates kodierende Gene, wie Troponine und Myosin-leichte-Ketten. Weiterhin aktiviert GATA4 Gene für ANP und BNP sowie für Na⁺/Ca²⁺-Austauschkanäle, Acetylcholinreceptor-M2 und Adenosinreceptor-A1 kodierende Gene (Pikkarainen et al., 2004). Nkx2.5 und GATA4 sind essenziell für die Kardiogenese und die Expression dieser Gene wird als Nachweis kardialer Differenzierung gewertet (Čihák, 1974; McMullen et al., 2009; Pikkarainen et al., 2004; Zhu et al., 2009).

Myocyte enhancer factor 2c (Mef2c) ist ein weiterer spezifischer Transkriptionsfaktor in der Kardiogenese. Mef2c spielt neben GATA4 und Nkx2.5 eine regulatorische Rolle in der frühen Entwicklung des Herzens. Mäuse, die ein defektes Mef2c Gen aufweisen, sind nicht lebensfähig und weisen kardiale Fehlbildungen auf (Bi et al., 1999).

Weiterhin wird die Detektion der Proteine des kontraktiven Apparates, wie Troponin T, Myosin und alpha-Aktin, sowie Zellen mit mehreren Kernen zum Nachweis einer kardialen Differenzierung herangezogen (Farag et al., 2024; Orlic et al., 2003; Rangappa et al., 2003).

1.7. Projektbeschreibung und Fragestellung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob das nach einem Herzinfarkt herrschende inflammatorische Milieu die Fähigkeit mesenchymaler Stammzellen (MSC) zur kardiomyozytären Differenzierung beeinflusst.

Für die Versuche wurden initial die aus dem Fettgewebe der Maus gewonnenen mesenchymalen Stammzellen verwendet, die im Folgenden als Fettstammzellen bezeichnet werden. Im Laufe des Projekts wurde es nötig die mesenchymalen Stammzellen kommerziell zu erwerben, diese werden im Folgenden als MSC bezeichnet.

In einem Zellkulturmodell wurde durch die Stimulation mit 5-azacytidine (5-aza) eine kardiale Differenzierung der MSC in der Zellkultur induziert. Durch die Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zum Zellkulturmedium wurde ein inflammatorisches Milieu erzeugt und untersucht, ob die Inflammation die kardiale Differenzierung der MSC beeinflusst.

Ein weiteres Zellkulturmodell sollte eine annähernd physiologische kardiale Differenzierungsnische darstellen. Dabei sind wir von der Vorstellung ausgegangen, dass Stammzellen, die in einen Herzmuskel gelangen, primär den plasmamembranständigen und extrazellulären Proteinmolekülen ausgesetzt sind und durch diese beeinflusst werden. So wurden aus den gesunden murinen Kardiomyozyten extrazelluläre und plasmamembranständige Proteine isoliert und dem Zellkulturmedium zugefügt. In diesem Zellkulturmedium wurden murine MSC kultiviert und anschließend im Hinblick auf kardiomyozytäre Differenzierung untersucht.

Nach dem gleichen Prinzip wurde eine inflammatorische Nische nach einem Infarkt simuliert. Hierfür wurden die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine aus dem infarzierten murinen Herzgewebe isoliert und ebenfalls dem Zellkulturmedium zugefügt. Auch hier wurden murine MSC kultiviert und im Hinblick auf die kardiomyozytäre Differenzierung untersucht.

In einer direkten Kokultur der MSC mit den adulten murinen Kardiomyozyten wurde der Einfluss mechanischer Reize durch kardiale Kontraktionsvorgänge mit der Wirkung plasmamembranständigen und extrazellulären Proteine verbunden und die MSC in Hinblick auf die kardiale Differenzierung untersucht.

Zusammenfassend wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Wirkung der folgenden Stimuli auf die kardiale Differenzierung von MSC und Fettstammzellen:
 - a) Führt die Stimulation mit 5-aza zu einer kardiomyozytären Differenzierung?
 - b) Können die aus gesunden Kardiomyozyten isolierten plasmamembranständigen und extrazellulären Proteine eine kardiale Differenzierung bewirken?
 - c) Können sich MSC in der direkten Kokultur mit adulten Kardiomyozyten kardial differenzieren?
2. Beeinflussen inflammatorische Stimuli die kardiale Differenzierung:
 - a. Wie wirkt die Zugabe inflammatorischer Stimuli wie LPS oder TNF- α auf die mit 5-aza angeregte kardiale Differenzierung?
 - b. Können die aus dem infarzierten Herzgewebe gewonnenen plasmamembranständigen und extrazellulären Proteine genauso eine kardiale Differenzierung hervorrufen, wie die aus dem gesunden Herzen isolierten plasmamembranständigen und extrazellulären Proteine?

2. Material und Methoden

In diesem Teil erfolgt die Auflistung der verwendeten Materialien, Puffer, Lösungen und Geräte, sowie aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen, molekulargenetischen und immunhistologischen Methoden. Die kommerziell erworbenen Kits wurden nach den Angaben der Hersteller benutzt.

Alle Tierexperimente erfolgten unter Einhaltung der Leitsätze der Gesellschaft für Versuchstierkunde sowie des Leitfadens für den Umgang und den Schutz von Labortieren (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1996). Das Versuchsvorhaben war zuvor vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt worden (Gen. Nr. B 2/274).

2.1. Versuchstiere

Für die Gewinnung der MSC aus dem Fettgewebe, die Isolation der adulten Kardiomyozyten sowie die Gewinnung extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus den gesunden und infarzierten Herzen wurden weibliche Mäuse des Stammes C57bl/6J (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) im Alter von 6 bis 10 Wochen verwendet.

2.2. Gewebsentnahme

Zur Entnahme von „gesunden“ und „infarzierten“ Herzen sowie Fettgewebe wurden die Mäuse euthanasiert. Durch die intraperitoneale Gabe von Xylazin (50 mg/kg Körpergewicht (KG)) und Ketamin (25 mg/kg KG) wurden die Tiere tief narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Für die operative Gewebsentnahme wurden die Tiere dann in die Rückenlage gebracht. Abdomen und Thoraxbereich wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Situseröffnung erfolgte mit einer feinen Schere zunächst im Bereich des Abdomens weit unterhalb des Sternums, anschließend wurde das Diaphragma durchtrennt und die Rippen ausgehend vom Processus xiphoideus nach axillär eingeschnitten. Die so abgetrennte anteriore Thoraxwand wurde mit einer Klemme über dem Kopf fixiert. Das Herz wurde zusammen mit den Lungen entnommen. Dafür wurde die Aorta möglichst weit distal abgeschnitten, um die anschließende Kanülierung und Perfusion zu ermöglichen. Für die Entnahme des Fettgewebes zur

Gewinnung der Fettstammzellen wurde abdominale Haut weiter nach kaudal eingeschnitten. Die Haut wurde mithilfe einer anatomischen Pinzette und Schere in kaudaler und lumbaler Richtung von der darunter liegenden Muskulatur abpräpariert und somit das Fettgewebe im Lenden- und Leistenbereich freigelegt.

2.3. Zellkultur

2.3.1. *Isolation der Fettstammzellen*

Für die Versuche verwendete Fettstammzellen wurden in unserem Labor nach der modifizierten Methode von Gimble und Bunnell isoliert (Gimble & Bunnell, 2011). Das subkutane Fettgewebe aus dem Lenden- und Leistenbereich wurde wie in Kapitel 2.2 beschrieben entnommen und in eine Schale mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), versetzt mit 5% Penicillin/Streptomycin (P/S), gegeben. Um die Kontamination mit Blut- und hämatopoetischen Zellen zu reduzieren, wurden die Fettstückchen in dieser Lösung gespült und in eine neue Schale mit PBS+5% P/S gegeben. Das Fettgewebe wurde mit einer sterilen Schere in kleine Stücke zerschnitten und mit 25 ml Kollagenaselösung versetzt. Die Zusammensetzung der Kollagenaselösung ist in Tabelle 1 dargestellt. Anschließend wurde das Fettgewebe in der Kollagenaselösung für 45 Minuten bei 37°C im Schüttelinkubator geschwenkt (65 rpm).

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kollagenaselösung für 25 ml.

Kollagenase Typ 2 (Worthington Biochemical Corporation, Lot Nr 41B12533)	25 mg
10-fach PBS	25 ml
CaCl ₂ 100 M	3,125 ml
BSA	25 mg

Nach der Inkubation wurde das Fettgewebe in der Kollagenaselösung mit einer 50 ml Pipette einige Male vorsichtig auf- und runterpipettiert, sodass das verdaute Fettgewebe zerfiel. Die Suspension wurde in ein 50 ml Falcon™ Tube überführt und für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Tubes aus der Zentrifuge genommen und gut durchgeschüttelt, sodass der Pellet sich wieder komplett auflöste. Dieser Schritt sollte die restlichen adulten Adipozyten von der Vascular Stromal Fraction trennen (Bunnell et al., 2008). Danach wurde nochmals fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, dabei ca. 1 ml über dem Pellet „stehen“

gelassen. Anschließend wurden 10 ml PBS mit 1% bovines Serumalbumin (BSA) zugegeben und der Pellet vorsichtig resuspendiert. Danach wurde erneut über fünf Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Der Zellpellet wurde im Nährmedium (DMEM + 10% iFCS + 1% G + 1% P/S) aufgenommen und durch einen 70 µm cell strainer gegeben, anschließend wurde mit 2 ml Nährmedium nachgespült, die Zellen wurden gezählt und mit einer Zelldichte von 5 000 Zellen/cm² ausplattiert (Bunnell et al., 2008; Gimble & Bunnell, 2011).

Die ausplattierten Zellen wurden für 48 Stunden im Inkubator kultiviert, danach wurde der Mediumwechsel durchgeführt. Dabei wurden die nicht adhärenen und toten Zellen entfernt.

Der Mediumwechsel wurde zweimal wöchentlich durchgeführt. Dafür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1,5 ml 10-fach PBS gewaschen, dann wurde die 10-fach PBS wieder abgesaugt und 2 ml frisches Nährmedium dazugegeben. So wurden die Zellen kultiviert, bis sie zu 80-90% konfluent wurden. Anschließend wurde eine Passage durchgeführt, um die Zellen aufzutrennen.

Nach der dritten Passage wurden die Zellen für die Versuche verwendet. Der Stammzellcharakter wurde überprüft, indem man die isolierten Zellen zu adipogenen und osteogenen Linien differenzieren lässt (Kapitel 2.3.7.1 und 2.3.7.2). Weiterhin wurde die Expression von für Fettstammzellen typischen Oberflächenmarkern CD90, CD105 und CD73 mittels FACS-Analyse untersucht (Kapitel 2.8).

2.3.2. **Mesenchymale Stammzellen**

Die mesenchymalen Stammzellen (MSC) wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Nach Angaben des Herstellers handelte es sich um MSC aus dem Knochenmark von Mäusen des Stammes C57Bl/6, die nicht älter als acht Wochen waren und unter sterilen Bedingungen isoliert wurden. Sie exprimierten zu mehr als 70% Oberflächenantigene CD29, CD34, CD44 und Sca-1 und waren negativ für CD117. Weiterhin ließen sie sich zu osteogenen, adipogenen und chondrogenen Linien differenzieren und wiesen somit ein mindestens trilineares Differenzierungspotential auf. Sie wurden in einem D-MEM/F-12 Medium mit 10% MSC-Qualified FBS vermehrt und nach der achten Passage im Kryokonservierungsmedium bestehend aus 60% D-MEM/F-12, 30% FBS und 10% DMSO eingefroren.

2.3.3. **Zellversorgung**

Die für die Versuche verwendeten Fettstammzellen und mesenchymalen Stammzellen wurden in einem Inkubator (Heraeus Med) bei 37°C, 5% CO₂ Gehalt in der Luft und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Das Nährmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Dafür wurde das verbrauchte Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von PBS gewaschen, dann wurde PBS wieder abgenommen und frisches vorgewärmtes Nährmedium dazugegeben.

Nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80-90 % wurde eine Passage durchgeführt. Dafür wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS einmalig gewaschen und, um die Zellen von den Kulturschalen zu lösen, Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und damit 5 Minuten im Inkubator inkubiert. Danach erfolgte eine mikroskopische Kontrolle, die Zellen sollten sich abgelöst haben und schwimmen. Anschließend wurde das Nährmedium im Verhältnis zu Trypsin/EDTA-Lösung 1:1 zugegeben. Die so entstandene Zellsuspension wurde in ein Falcon™ Tube überführt, vorsichtig durchmischt und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Der Pellet wurde in frischem vorgewärmtem Nährmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit einer Zelldichte von 5 000 Zellen/cm² erneut ausplattiert.

Das Nährmedium für MSCs setzte sich wie folgt zusammen: D-MEM/F-12 mit GlutaMAX-I, MSC Qualified FBS und 5µg/ml Gemtamycin. Die Substanzen wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Das Nährmedium für Fettstammzellen enthielt DMEM, 10% iFCS, 1% Gentamycin und 1% P/S der Firma c.c.pro.

2.3.4. **Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Konservierung der Fettstammzellen und der MSCs wurden sie in flüssigem Stickstoff bei -195°C eingefroren. Dafür wurde die Zellen wie in Kapitel 0 beschrieben pelletiert und im Kryokonservierungsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt und innerhalb von zwei Tagen in einem mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo Freezing Container auf -80°C abgekühlt. Danach wurden die Kryoröhrchen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Das Kryokonservierungsmedium für die MSCs bestand aus 60% D-MEM/F-12, 30% FBS und 10% DMSO. Das Kryokonservierungsmedium für die Fettstammzellen bestand aus 70% DMEM, 20% iFCS und 10% DMSO.

Zur Revitalisierung wurden die Zellen rasch (in weniger als zwei Minuten) in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut. Danach wurde entsprechendes, vorgewärmtes Nährmedium zugegeben und vorsichtig durchmischt. Anschließend wurde fünf Minuten bei 1 200 rpm zentrifugiert. Der Pellet wurde in Nährmedium aufgenommen, die Zellen wurden gezählt und mit einer Zelldichte von 5 000 Zellen/cm² ausplattiert.

2.3.5. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zellkammer verwendet. Dafür wurden die Zellen in einem definierten Volumen aufgenommen und 10 µl dieser homogenen Zellsuspension auf die Kammer aufgetragen. Die Zellen in vier Quadraten wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, anschließend wurde der Mittelwert bestimmt. Der Mittelwert multipliziert mit 10 000 ergab die Zellzahl pro Milliliter der Zellsuspension. Diese Zellzahl multipliziert mit dem Gesamtvolumen ergab die gesamte Zellzahl.

2.3.6. Isolation und Kultur adulter Kardiomyozyten

Die Methode zur Isolation und Kultur adulter Kardiomyozyten wurde in Anlehnung an das Protokoll von Ren und Wold etabliert (Jacobson & Piper, 1986; Ren & Wold, 2001). Die Isolation erfolgte durch intrakoronare Perfusion der Herzen mit einer Kollagenase-Typ-2-Lösung in einem modifizierten Langendorff System. Für alle Isolationen wurde immer die gleiche Charge der Kollagenase verwendet, um experimentelle Schwankungen zu vermeiden.

2.3.6.1. Herstellung der Perfusionslösung

Für die Herstellung der Perfusionsstocklösung wurden die in der Tabelle 2 aufgeführten Substanzen in entsprechenden Mengen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,46 eingestellt, anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Die Lösung war bei 4°C mindestens vier Wochen haltbar (Ren & Wold, 2001).

Tabelle 2: Perfusionsstocklösung

Substanz	Konzentration
NaCl	135 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Taurin	30 mM

Die Perfusionslösung wurde immer frisch zubereitet. Für 100 ml Perfusionslösung wurden zu 98 ml Perfusionsstocklösung 2 ml 2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) Stocklösung, 180 mg Glucose und 50 µl Insulin hinzugefügt. Die Endzusammensetzung der Perfusionslösung ist in der Tabelle 3 dargestellt (Ren & Wold, 2001).

Tabelle 3: Perfusionslösung

Substanz	Konzentration
NaCl	135 mM
KCl	4 mM
MgCl ₂	1 mM
HEPES	10 mM
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM
Glucose	10 mM
Butanedione	10 mM
Insulin	2 U pro 100 ml
Taurin	30 mM

2.3.6.2. 2,3-Butanedione-Monoxime Stocklösung

2,3-Butanedione-Monoxime (BDM) inhibiert die Myosin ATPase und verhindert eine terminale Hyperkontraktion der Kardiomyozyten.

Eine 500 mM Stocklösung wurde hergestellt, indem 2,53 g BDM in 50 ml ddH₂O gelöst wurden. Portionen zu je 2 ml wurden bei -20°C eingefroren und waren für zwei Wochen haltbar.

2.3.6.3. Kollagenaselösung

Es wurde eine vorher in unserem Labor getestete Kollagenase Typ II der Firma Worthington verwendet. Für alle Versuche wurde immer die gleiche Charge benutzt, um experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Für die Herstellung der Kollagenaselösung wurden 25 mg von Kollagenase Typ II in 1 ml Perfusionslösung aufgelöst und 3,125 µl 100 mM CaCl₂ Lösung hinzugefügt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kollagenaselösung

Kollagenase Typ II	25 mg
Perfusionslösung	1 ml
100 mM CaCl ₂ Lösung	3,125 µl

2.3.6.4. „Stopp“-Lösungen 1 und 2

Die „Stopp“-Lösungen neutralisieren die Wirkung von Kollagenase, waschen BDM aus und erhöhen die Kalzium-Toleranz der isolierten Kardiomyozyten. Für die Herstellung der „Stopp“-Lösung 1 wurden 9 ml der Perfusionslösung, 1 ml FCS und 12,5 µl 10 mM CaCl₂ Lösung gemischt. Für die Herstellung der „Stopp“-Lösung 2 wurden 9,5 ml der Perfusionslösung, 0,5 ml FCS und 12,5 µl 10 mM CaCl₂ Lösung gemischt (Tabelle 5 und Tabelle 6).

Tabelle 5: „Stopp“-Lösung 1

Perfusionslösung	9 ml
FCS	1 ml
10 mM CaCl ₂ Lösung	12,5 µl

Tabelle 6: „Stopp“-Lösung 2

Perfusionslösung	9,5 ml
FCS	0,5 ml
10 mM CaCl ₂ Lösung	12,5 µl

2.3.6.5. Langendorff-Perfusionssystem

Im Langendorff-Perfusionssystem (Abbildung 1) wird die Perfusionslösung von einem doppelwandigen Gefäß über ein Schlauchsystem, das an eine Pumpe angeschlossen ist, zur Perfusionskanüle geleitet. Die Perfusionskanüle wurde aus einer Injektionskanüle

(Braun), durch das Abschleifen der Spitze und Einschneiden einer Kerbe in der Werkstatt des Max-Planck-Institutes (Bad Nauheim) angefertigt. Die Perfusionskanüle ist an einem Stativ direkt über dem doppelwandigen Gefäß befestigt, so dass die Lösung zirkulieren kann. Durch die Gefäßwand fließt warmes Wasser, welches aus dem Wasserbad geleitet wird, was ermöglicht, die Temperatur der Perfusionslösung über die gesamte Dauer der Perfusion bei 37°C zu halten.

Vor Beginn der Kardiomyozytenisolation wurde das Perfusionssystem zur Keimzahlreduktion einige Minuten mit 80%igem Ethanol und anschließend mit ddH₂O gespült. Anschließend wurde die Perfusionslösung in das doppelwandige Gefäß gefüllt und das System eingeschaltet. So wurde die Perfusionslösung auf 37°C erwärmt und die Luftblasen aus dem System entfernt. Die Tropfgeschwindigkeit wurde auf 4-5 Tropfen/10 Sekunden eingestellt.

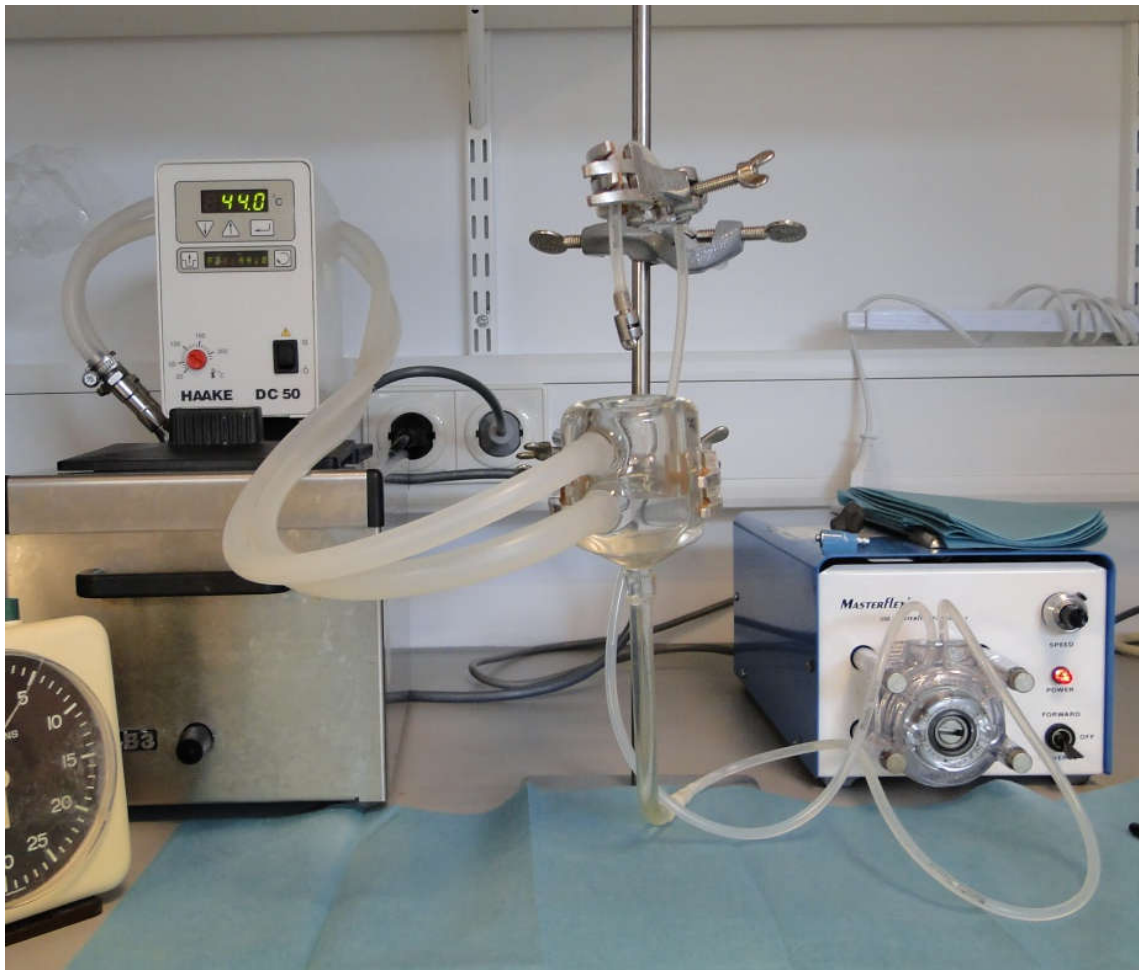


Abbildung 1: Langendorff-Perfusionssystem

2.3.6.6. Kanülierung und Verdau

Am Operationsplatz (Abbildung 2a) wurden eine Petrischale mit kalter Perfusionslösung und eine große Schale bereitgestellt. Eine 1ml-Spritze wurde mit Perfusionslösung gefüllt, über einen Dreiwegehahn mit einer abgeschliffenen Kanüle verbunden und die Luft herausgelassen. Die Spritze wurde über dem Rand der großen Schale so befestigt, dass die Kanülenspitze in einem Tropfen Perfusionslösung hing (Abbildung 2b). Die große Schale mit der Kanüle stand unter dem Mikroskop. Das Mikroskop wurde so eingestellt, dass die Kanülenspitze in dem Tropfen Perfusionslösung scharf zu sehen war. Um die Kanüle wurde eine Fadenschleife vorgebunden (Abbildung 2b). Das Herz wurde direkt nach der Entnahme in die Petrischale mit kalter Perfusionslösung gegeben und vorsichtig von Lungen- und Thymysgewebe befreit. Danach wurde das Herz in die große Schale überführt und ab diesem Punkt mit Mikroskop und feinen Pinzetten gearbeitet.

Die Aorta wurde aufgefunden und so über die abgeschliffene Kanüle gestülpt, dass die Kanülenspitze vor der Aortenklappe zum Liegen kam und die Abgänge der Koronararterien nicht verlegt wurden. Der Faden wurde zugezogen und das Herz somit an der Perfusionskanüle fixiert. Mit der Spritze wurde vorsichtig angespült und bei richtiger Kanülierung füllten sich die Koronargefäße mit der Perfusionslösung und das Herzgewebe blasste ab (Abbildung 2c). Diese initiale Perfusion mit der kalziumfreien Perfusionslösung führte bereits zur Unterbrechung der Gap Junctions. Der Dreiwegehahn wurde dann geschlossen, von der Spritze abgetrennt und die Kanüle mit dem Herzen so an das Perfusionssystem angeschlossen, dass keine Luftblasen entstanden (Abbildung 2d).

In das Perfusionssystem wurde 1 ml Kollagenaselösung dazu pipettiert. Das Herz wurde zwischen 30 und 45 Minuten perfundiert. Am Ende der Perfusion wurde das Gewebe blass, geschwollen und sehr weich. Anschließend wurde das Herz von der Kanüle abgenommen und in eine Schale mit der direkt aus dem Perfusionssystem entnommenen Perfusionslösung mit Kollagenase gegeben. In einer sterilen Bank wurde das Herzgewebe mit einer sterilen feinen Schere klein geschnitten und sanft mit einer 50 ml Pipette 60-90 Sekunden lang auf und runter pipettiert. Dabei zerfiel das Gewebe sehr leicht in die einzelnen Zellen und löste sich fast vollständig auf.

Sodann wurde eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. Bei einer erfolgreichen Isolation waren große, ziegelsteinförmige, noch schlagende vitale Kardiomyozyten zu sehen.

2.3.6.7. Neutralisation der Kollagenase

Die isolierten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon™ Tube überführt, die Schale wurde mit 2,5 ml „Stopp“-Lösung 1 ausgespült und zu dem Falcon™ Tube hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde noch 3-5 Minuten auf und runter pipettiert, danach wurden die isolierten Kardiomyozyten in einer Neubauer-Zellkammer gezählt und der Anteil der ziegelsteinförmigen Zellen berechnet. Anschließend ließen wir die Zellen sich für 8-10 Minuten bei Raumtemperatur absetzen. Der Überstand wurde fünf Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Beide Pellets wurden in „Stopp“-Lösung 2 mit einem Gesamtvolumen von 10 ml aufgenommen.

Die isolierten Kardiomyozyten wurden dann entweder direkt für die Isolation der Oberflächenproteine (Kapitel 2.4.1) verwendet oder für die Zellkultur vorbereitet.

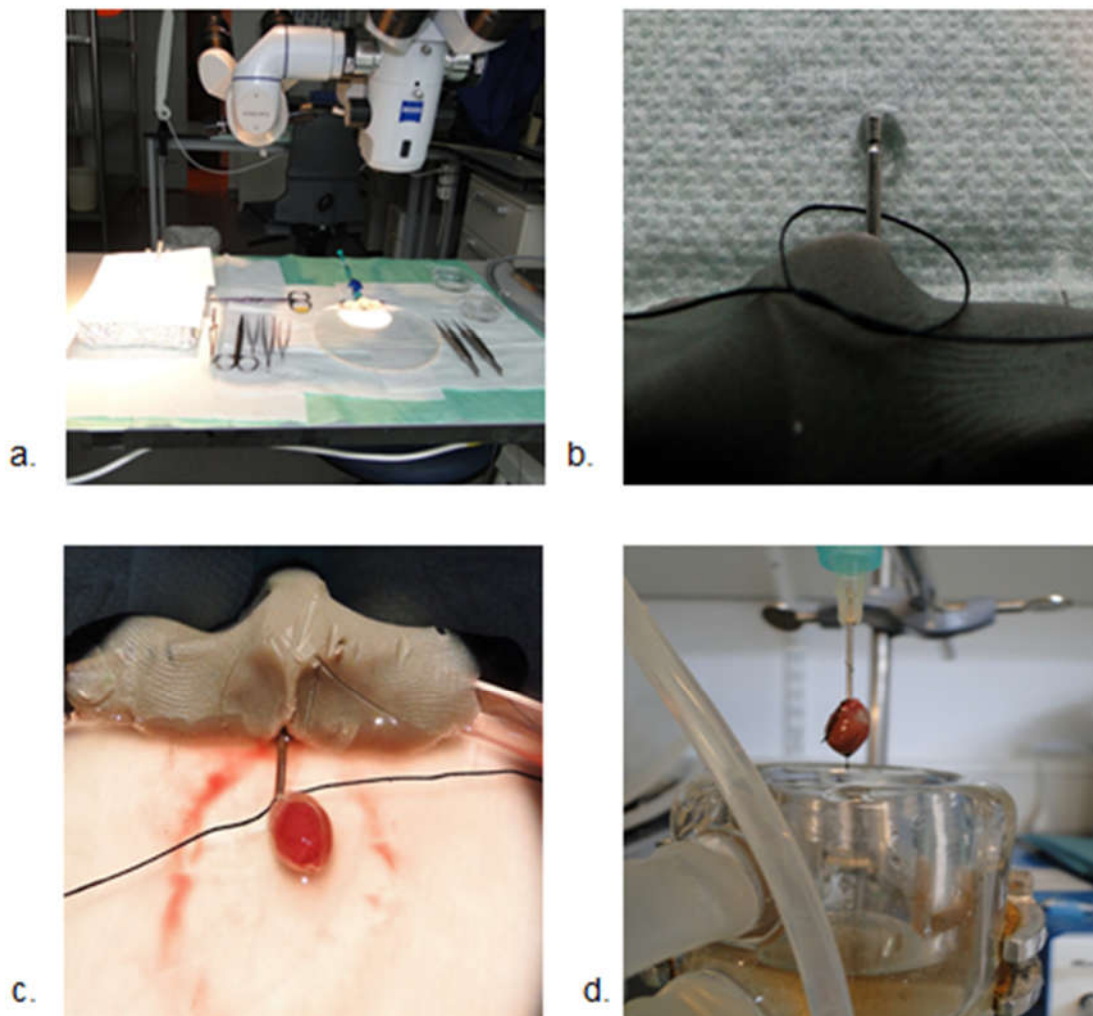


Abbildung 2: (a) Operationsplatz (b) Perfusionskanüle mit vorgebundenem Haltefaden (c) Herz, fixiert an der Perfusionskanüle mit abgeblassten Koronararterien, nach dem Anspülen mit der Perfusionslösung (d) Herz, fixiert an der Perfusionskanüle und angeschlossen an das Langendorff-Perfusionssystem

2.3.6.8. Kultur der isolierten adulten Kardiomyozyten

Für die Kultur der adulten Kardiomyozyten wurde zunächst die Kalziumkonzentration in der Zellsuspension stufenweise erhöht. Hierzu wurde in vierminütigem Abstand das entsprechende Volumen der 10 mM-Ca²⁺-Stocklösung dazu pipettiert (Tabelle 7) bis die Ca²⁺-Konzentration 1 mM erreichte.

Tabelle 7: Stufenweiser Anstieg der Ca²⁺-Konzentration

Dazugegebenes Volumen der 10mM-Ca ²⁺ -Stocklösung	Ca ²⁺ -Endkonzentration
50 µl	62 µM
50 µl	112 µM
100 µl	212 µM
30 µl	500 µM
50 µl	1 mM

Anschließend wurden die Kardiomyozyten in ein 15 ml Falcon™ Tube überführt und wir ließen die Zellen sich unter der eigenen Schwerkraft über 8-10 Minuten absetzen. Der Überstand wurde fünf Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Beide Pellets wurden vereinigt, in einem entsprechenden Volumen des Ausplattiermediums aufgenommen (25 000 Zellen/ml) und auf die Zellkulturplatten verteilt. Wir ließen die Zellen sich im Brutschrank für eine Stunde anheften. Nach einer Stunde wurde das Ausplattiermedium abgesaugt, die Zellen mit 1,5 ml Kulturmedium gewaschen, zum Schluss 1,5 ml Kulturmedium auf die Zellkulturplatten gegeben und in diesem Medium im Brutschrank kultiviert.

Die Zusammensetzungen der für Ausplattierung und Kultur der adulten Kardiomyozyten verwendeten Medien sind in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Medien für die Kultur adulter Kardiomyozyten

Medium	Zusammensetzung
Ausplattiermedium	45,5 ml M199 (ccPro) 2,5 ml iFCS (ccPro) 1 ml BDM 0,5 ml P/S (ccPro) 0,5 ml Glutamin (ccPro)

Kulturmedium	49 ml M199 (ccPro)
	50 µl BSA (ccPro)
	0,5 ml P/S (ccPro)
	0,5 ml Glutamin (ccPro)

2.3.7. Differenzierungsversuche

2.3.7.1. Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden die MSC aus dem Fettgewebe in 6-Well Platten ausgesät und im Nährmedium kultiviert, bis die Zellen zu 80-90% konfluent waren. Dann wurde das Nährmedium gegen das adipogene Differenzierungsmedium (Tabelle 9) (Ilmer, 2009) ausgetauscht. Pro Well wurden 2 ml Medium zugegeben. Für die Negativkontrolle wurden in zwei Wells die Zellen weiter mit dem Nährmedium behandelt. Das Medium wurde zweimal in der Woche gewechselt. Nach 14 Tagen wurden die Zellen zum Nachweis der adipogenen Differenzierung mit Oil-Red-O gefärbt.

Tabelle 9: Adipogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Endkonzentration im Medium
DMEM	39%
Ham F12	50%
Kaninchenserum	10%
Glutamin	1%
P/S	1%
Dexamethason	10 ⁻⁸ M
Insulin	0,01 mg/ml

2.3.7.2. Osteogene Differenzierung

Für die Induktion der osteogenen Differenzierung wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und nach Erreichen einer 80-90%iger Konfluenz wurde das Kulturmedium durch das osteogene Differenzierungsmedium ersetzt. Für die Herstellung des osteogenen Differenzierungsmediums wurde das Nährmedium mit osteogenen Zusätzen (Bunnell et al., 2008) supplementiert. Die Zusätze und deren Endkonzentration im Medium sind in Tabelle 10 dargestellt. Dexamethason wurde aus dem Arbeitsstock (100 µl/ml) zugegeben. Ascorbinsäure wurde immer frisch zubereitet und bei jedem Mediumwechsel frisch dazugegeben.

Wie auch bei den Versuchen zu adipogenen Differenzierung, wurden die Zellen in zwei Wells als Negativkontrolle weiter mit dem Nährmedium behandelt. Das Medium wurde zweimal in der Woche gewechselt.

Nach 14 Tagen wurde ein Teil der Zellen für die qRT-PCR-Analyse geerntet und auf eine Expression alkalischer Phosphatase untersucht, ein anderer Teil wurde histochemischen Färbungen nach Van Kossa sowie mit Alizarin rot unterzogen.

Tabelle 10: Osteogene Zusätze und deren Endkonzentration im Medium

Zusatz	Endkonzentration im Medium
Dexamethason	10^{-8} M
Ascorbinsäure -2-phosphat	0,3 mM
β-Glycerophosphat	10 mM

2.3.7.3. Kardiale Differenzierung der Stammzellen durch Stimulation mit 5-aza

In diesem Versuch sollte das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der MSC und der Fettstammzellen überprüft werden, indem diese Zellen einer demethylierenden Substanz, dem 5-aza, ausgesetzt wurden. Die Arbeit von Rangappa et al. hat gezeigt, dass die 5-aza Konzentration von 9 µmol/L und die Expositionsdauer mit 5-aza über 24 Stunden für die Induktion einer kardialen Differenzierung am besten geeignet sind. In der Arbeit von Rangappa et al. wurden die Zellen über zwei Monate in Kultur beobachtet, nach drei Wochen wurden spontane Kontraktionen beobachtet (Rangappa et al., 2003). Für unsere Versuche wurden die gleichen Parameter festgelegt, die Kulturdauer wurde auf drei Wochen begrenzt.

Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten mit einer Zelldichte von 25 000 pro Well sowie auf Chamber Slides mit einer Zelldichte von 10 000 pro Chamber ausplattiert. 24 Stunden nach der Aussaat erfolgte ein Mediumwechsel und es wurde das 5-aza-Stimulationsmedium (Tabelle 11) mit 9 µmol/L 5-aza zugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Stimulationsmedium entfernt und die Zellen über 21 Tage im Nährmedium kultiviert. Die Zellen für die Negativkontrolle wurden durchgehend im Nährmedium kultiviert. Nach 21 Tagen wurden die Zellen für qRT-PCR-Analysen geerntet und im Hinblick auf die Expression kardialer Marker untersucht. Die auf Chamber Slides kultivierten Stammzellen wurden für die immunhistologischen Färbungen mit Formaldehyd fixiert.

Tabelle 11: 5-aza Stimulationsmedium

Substanz	Menge
DMEM (mit 10% iFCS , 1% P/S, 1% G)	12 ml
5-azazytidine	9 µmol/L
1% ITS	120 µl

Die Fettstammzellen wurden wie in Kapitel 2.3.1 beschriebenen isoliert und zu ausreichenden Mengen expandiert (nicht älter als Passage 3). Parallel zur Stimulation mit 5-aza erfolgten Differenzierungsversuche zu adipogenen und zu osteogenen Linien, wie in Kapitel 2.3.7.1 und 2.3.7.2 beschrieben, um das multilineare Differenzierungspotential der isolierten Fettstammzellen zu zeigen.

2.3.7.4. Kardiale Differenzierung der Stammzellen durch die Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus gesunden Kardiomyozyten

Hier sollte untersucht werden, ob die aus gesunden Kardiomyozyten gewonnenen extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine eine kardiale Differenzierung hervorrufen. Hierfür sollten die Stammzellen über einen definierten Zeitraum unter der Zugabe dieser Proteine zum Nährmedium kultiviert werden. Die Gewinnung dieses Proteingemisches ist in Kapitel 2.4.1 beschrieben.

Zunächst sollte eine für die Versuche optimale Proteinkonzentration gefunden werden. Dafür wurde aus dem ursprünglichen Proteingemisch eine Verdünnungsreihe hergestellt. Somit erhielten wir Lösungen mit definierten Konzentrationen an extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen (Tabelle 12). Die Stammzellen wurden mit einer Zellzahl von 10 000 pro Kammer auf die Chamber Slides (acht Kammer pro Slide) ausgesät und im Nährmedium mit Zugabe einer entsprechenden Menge des Proteinlysats kultiviert.

Das Proteinlysate enthielt bedingt durch die Isolationsmethode SDS-Puffer. Um biologische Effekte des SDS-Puffers auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe angesetzt, in der Stammzellen im Nährmedium mit entsprechend verdünntem SDS-Puffer kultiviert wurden. Als Negativkontrolle dienten die Zellen, die im Nährmedium ohne Zusatz von Proteinen oder SDS-Puffer kultiviert wurden. Die Stimulationsdauer wurde in Anlehnung an die Arbeiten zur kardialen Differenzierung der Stammzellen auf 21 Tage festgelegt (Kajstura et al., 2008; Xing et al., 2012).

Am 22. Tag wurden die Zellen fixiert und immunhistochemisch auf die Expression von GATA4 und alpha-Actinin untersucht. Als optimal hat sich eine Proteinmenge von 1,5 µg

pro ml Nährmedium gezeigt (siehe Ergebnisse) und diese wurde daher für die weiteren Versuche verwendet.

Tabelle 12: Verdünnungsreihe

Verdünnung	Proteinkonzentration in der Verdünnung
1:100	3,89 µg/ml
1:250	1,5 µg/ml
1:500	0,78 µg/ml
1:1000	0,39 µg/ml
1:4000	0,09 µg/ml

Für die Bestimmung der Expression kardialer Marker mittels qRT-PCR bzw. immunhistochemischem Nachweis wurden Stammzellen auf die 6-Well-Platten bzw. Chamber Slides mit einer Zelldichte von 25 000 pro Well bzw. 10 000 pro Chamber ausgesät. Das Proteinlysate (1,5 µg pro ml Nährmedium) wurde dem Nährmedium ab Tag 1 zugegeben. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und das Proteinlysate immer frisch dazu pipettiert. Als Negativkontrolle dienten im Nährmedium kultivierte Stammzellen. Zum Ausschluss biologischer Effekte des SDS-Puffers wurde eine weitere Kontrolle geführt, bei der dem Nährmedium die entsprechende Menge SDS-Puffer zugegeben wurde. Nach 21 Tagen wurden die Zellen für qRT-PCR-Analysen geerntet und im Hinblick auf die Expression kardialer Marker untersucht. Die auf Chamber Slides kultivierten Stammzellen wurden für die immunhistologischen Färbungen mit Formaldehyd fixiert.

2.3.7.5. Kardiale Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen durch Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus dem Infarktgebiet

In diesem Versuch stellten die aus dem Infarktgebiet isolierten extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine einen inflammatorischen Stimulus für die Stammzellen dar. Es sollte untersucht werden, ob das kardiale Differenzierungspotential dadurch beeinflusst wird. Der Versuchsaufbau erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.4 beschrieben mit Zugabe von verdünntem Proteinlysate aus dem Infarktgebiet in der Menge von 1,5 µg pro ml Medium.

2.3.7.6. Kardiale Differenzierung der Stammzellen unter dem Einfluss von Lipopolysaccharid

In diesem Versuch wurde die Auswirkung von Lipopolysaccharid (LPS) auf die kardiale Differenzierung von MSC untersucht. Hierzu wurden MSCs in den 6-Well-Platten kultiviert. Eine Gruppe (N=6) wurde unter der Zugabe von 5-aza und 100 ng LPS pro ml Nährmedium kultiviert (Ti et al., 2015)), die andere Gruppe (N=6) nur unter der Zugabe von 5-aza. Als Kontrolle dienten MSCs, welche nur im Nährmedium kultiviert wurden. Die Stimulation mit 5-aza erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.3 beschrieben. Für die Herstellung des 5-aza/100ng LPS-Stimulationsmediums wurde LPS in Aqua dest. gelöst und das entsprechende Volumen dieser Lösung wurde in das 5-aza Stimulationsmedium (Kapitel 2.3.7.3) gegeben. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden, danach wurden die MSC im Nährmedium kultiviert (Chen et al., 2015). Nach 21 Tagen wurden alle MSC geerntet und auf die Expression kardialer Differenzierungsmarker mittels qRT-PCR-Analyse sowie immunhistologisch untersucht.

2.3.7.7. Kardiale Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von Tumornekrosefaktor alpha

In diesem Versuch wurde die Auswirkung von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) auf die kardiale Differenzierung von MSC untersucht. Die MSC wurden in den 6-Well-Platten kultiviert. Eine Gruppe (N=6) wurde unter der Zugabe von 5-aza und 100 ng TNF- α pro ml Nährmedium kultiviert, die andere Gruppe (N=6) nur unter der Zugabe von 5-aza. Als Kontrolle dienten MSC, welche nur im Nährmedium kultiviert wurden (Katanov et al., 2015; Lin et al., 2015). Die Stimulation mit 5-aza erfolgte wie im Kapitel 2.3.7.3 beschrieben. TNF- α wurde in Aqua dest. gelöst, die Lösung wurde entsprechend in das 5-aza Stimulationsmedium gegeben. Die Stimulationsdauer betrug 24 Stunden, danach wurde im Nährmedium kultiviert. Nach 21 Tagen wurden alle Zellen geerntet und das Ausmaß der kardialen Differenzierung mithilfe der qRT-PCR –Analyse untersucht.

2.3.7.8. Kardiale Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in der direkten Kokultur mit adulten Kardiomyozyten

In diesem Versuch sollte durch die Kokultur mit adulten Kardiomyozyten eine physiologische kardiale Differenzierungsnische nachgeahmt werden und das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der MSC gezeigt werden. Die adulten Kardiomyozyten für den Kokultur Versuch wurden wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben isoliert und auf die Chamber Slides (zwei Kammern pro Slide) mit einer Zellzahl von 20000 Zellen pro Kammer ausplattiert. Nach dem Anheften der Kardiomyozyten wurden

die MSC in der gleichen Zellzahl pro Kammer dazu ausplattiert. Als Negativkontrolle dienten im Nährmedium kultivierten MSC. Die Kokultur wurde über 21 Tage durchgeführt. Das Nährmedium wurde zweimal in der Woche gewechselt. Anschließend wurden die Zellen für immunhistochemische Färbungen fixiert (siehe Kapitel 2.6.4.4).

2.4. Gewinnung extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus dem Herzgewebe

2.4.1. *Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus gesunden adulten Kardiomyozyten*

Die adulten Kardiomyozyten für die Gewinnung der Proteine wurden wie im Kapitel 2.3.6 beschrieben isoliert. Die Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine erfolgte mit dem Pierce™ Cell Surface Protein Isolation Kit der Firma Thermo Fisher nach genauen Anweisungen des Herstellers. Das Prinzip der Isolationsmethode beruhte darauf, dass die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine der intakten Zellen mit Biotin markiert werden. Anschließend wurde Biotin neutralisiert und die Zellen lysiert. Die mit Biotin markierten Proteine wurden in einer Agarosesäule gebunden und eluiert. Die Proteinmenge wurde in allen gewonnenen Proben photometrisch nach Lowry bestimmt. Jede Probe wurde auf Vorhandensein intrazellulärer und extrazellulärer Proteine mittels Western Blot-Analyse untersucht. Alle Proben, welche frei von intrazellulären Proteinen waren, wurden zu einem Proteingemisch zusammengefügt und die Proteinmenge wurde nochmals bestimmt. Dieses Proteingemisch wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.2. *Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus infarziertem Herzgewebe*

Die Entnahme infarzierter Herzen erfolgte wie im Kapitel 2.2 beschrieben. Das Gewebe wurde in PBS-Lösung gebracht und mit einer feinen sterilen Schere in kleine Stückchen zerschnitten und in ein Gefäß mit 24 ml Perfusionslösung (Tabelle 3) mit 1 ml Kollagenaselösung (Tabelle 4) gegeben. In einem Schüttelinkubator wurde 45 Minuten inkubiert, bis das Gewebe ganz weich wurde. Anschließend wurde wie in den Kapiteln 2.3.6.7 und 2.4.1 beschrieben vorgegangen mit dem Unterschied, dass kein Wert auf das Vorhandensein der ziegelsteinförmigen Zellen gelegt wurde.

2.4.3. **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Proteine erfolgte photometrisch nach Lowry (Lowry et al., 1951). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Proteine in einer alkalischen Lösung Kupferionen binden. Anschließend werden Phosphormolybdänsäure und Phosphorwolframsäure durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan des zu messenden Proteins reduziert, wodurch ein Farbwechsel zu blau erfolgt. Die Intensität der Färbung ist linear proportional zur Proteinkonzentration und wird photometrisch gemessen. Als Standard diente eine Kalibrierungskurve, die mit Rinderserumalbumin erstellt wurde. Alle Proben wurden als Triplikate mit je 5 µl auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Anschließend wurde 24,5 µl Reagenz A, 0,5 µl Reagenz S und 200 µl Reagenz B pipettiert (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Danach wurde über 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend die Extinktion bei 690 nm am Elisa-Reader gemessen. Die Analyse erfolgte mit Magellan™ 5 Software.

2.5. **Western-Blot**

Western-Blot ist ein Verfahren zum Nachweis und zur Identifizierung bestimmter Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Dafür werden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Die Detektion der Proteine erfolgt mittels Antikörper, welche an ein Visualisierungssystem gekoppelt sind.

2.5.1. **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine nach deren Molekularmasse auf. Dabei binden die Proteine im Überschuss zugesetztes Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate = SDS) und erhalten dadurch eine negative Ladung. Es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse (1,4 g SDS pro 1 g Protein). Die negativ geladenen linearisierten Proteine werden in Abhängigkeit von ihrer Molekularmasse im elektrischen Feld aufgetrennt.

Es wurden kommerziell erworbene NuPage® 4-12% Bis-Tris Gele der Firma Invitrogen verwendet und eine korrespondierende Gelelektrophoresekammer. Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden die Gele zweifach mit dem NuPage® MES-Laufpuffer gespült. Die Geltaschen wurden mit 5 µg Protein beladen. Das entsprechende Lysatvolumen

wurde mit 1,67 µl SDS-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde die erste Geltasche mit einem Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein™ Western CTM-Standard beladen. Die Elektrophorese erfolgte über 30 Minuten bei 60 Volt und anschließend über 90 Minuten bei 160 Volt.

2.5.2. **Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran**

Nach Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran in einem Semi-Dry-Western-Blot Verfahren. Filterpapier und Nitrozellulosemembran wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Auf die untere Elektrodenplatte der Blotkammer wurden sechs Blatt Filterpapier gelegt, auf den Filterpapierstapel wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und dann das Gel aufgelegt. Das Filterpapier und die Membran wurden zuvor im Transferpuffer eingeweicht. Auf das Gel wurden noch sechs Blatt Filterpapier gelegt. Die Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab entfernt. Überschüssiger Transferpuffer wurde mit einem Filterpapier aufgesaugt. Der Proteintransfer erfolgte über zwei Stunden. Die Stromstärke wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Membranlänge in cm} \times \text{Membranbreite in cm} \times 1,5 = \text{Stromstärke in mA.}$$

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung und des Proteintransfers wurde die Membran nach dem Transfer mit Ponceau S Lösung angefärbt und das Ergebnis mithilfe des ChemiDoc™ XRS Imaging Systems visualisiert.

2.5.3. **Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern**

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen bei Raumtemperatur für mindestens eine Stunde mit 5 % Milchpulver in TBS/Tween®-Puffer inkubiert.

Die Primärantikörper wurden in 10 ml 5 % Milchpulver in TBS/Tween®-Puffer entsprechend verdünnt und die Membran wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper fünfmal für sieben Minuten mit TBS/Tween®-Puffer gewaschen. Die Spalte mit Standardbanden wurde abgeschnitten und separat mit 1 µl HRP-konjugiertem StrepTactin in Milchpulver eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und nach Ablauf der Inkubationszeit dreimal für sieben Minuten mit TBS/Tween®-Puffer gewaschen.

Der Sekundärantikörper wurde in einem Verhältnis 1:5000 in 5 % Milchpulver in TBS/Tween®-Puffer verdünnt. Die Membran wurde mit dem Sekundärantikörper für eine

Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal für sieben Minuten mit TBS/Tween®-Puffer gewaschen.

Für die Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers wurde eine Chemilumineszenz Substrat Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate verwendet. Fluoreszenzsignale wurden mit dem ChemiDoc™ XRS Imaging System digitalisiert und mit der Software Image Lab 3.0.1 ausgewertet.

Die verwendeten Primärantikörper sind in der Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Primärantikörper Western-Blot

Antikörper	Protein- größe	Klon	Wirt	Konzen- tration	Hersteller
Anti-Cardiac Troponin T	35,4 kDa	1F11	Maus	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti- α_{2B} - Adrenorezeptor	50 kDa	Poly- klonal	Kaninchen	1:200	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA

Zur Detektion der Primärantikörper verwendete Sekundärantikörper sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Sekundärantikörper Western-Blot

Antikörper	Klon	Wirt	Konzentration	Hersteller
ECL anti-mouse IgG- HRP	Polyklonal	Schaf	1:5 000	GE Healthcare GmbH, Freiburg, D
Anti-rabbit IgG- HRP	Polyklonal	Esel	1:5 000	Santa Cruz Biotechnology Inc, USA

2.6. Histologische und immunhistologische Färbungen

2.6.1. *Oil-Red-O Färbung*

Die Oil-Red-O Färbung dient zur Darstellung der Lipide. Zum Durchführen dieser Färbung wurde zuerst eine 0,3%ige Stocklösung von Oil-Red-O hergestellt. Dazu wurden 150 mg Oil-Red-O eingewogen und in 50 ml Isopropanol gelöst. Diese Lösung

war bei Raumtemperatur einen Monat haltbar. Die 0,2%ige Arbeitslösung wurde dann aus dieser Stocklösung hergestellt, dafür wurden 1 ml Stocklösung mit 8 ml Aqua dest. vermischt, zehn Minuten inkubiert und anschließend durch 0,2 µm Filter filtriert. Die Arbeitslösung sollte innerhalb von drei Stunden verwendet werden.

Die Zellen wurden direkt in den 6-Well-Platten gefärbt. Dafür wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellen kurz an der Luft getrocknet. Danach wurden die Zellen mit 10%igem Formalin bedeckt und bei Raumtemperatur eine Stunde fixiert. Anschließend wurde das Formalin abgenommen und die Zellen zweimal vorsichtig mit 50%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit Oil-Red-O Arbeitslösung bedeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurde die Oil-Red-O Lösung abgenommen und die Zellen wurden dreimal mit Aqua dest. gewaschen.

Zum längeren Aufbewahren der gefärbten Platten wurden die Zellen mit destilliertem Wasser bedeckt und bei +4°C gelagert. Die gefärbten Zellen wurden im inverten Mikroskop betrachtet.

2.6.2. Alizarin Rot Färbung

Für die Herstellung der Arbeitslösung wurden 411 mg Alizarin Rot in 30 ml Aqua dest. unter Erhitzen auf 50°C und rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter filtriert und der pH-Wert wurde auf 4,1-4,3 eingestellt.

Um die Zellen für die Färbung zu fixieren, wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Anschließend wurden sie mit 70%igem Ethanol bedeckt und bei -20°C für eine Stunde fixiert. Danach wurde das Ethanol abgenommen, die Zellen zweimal vorsichtig mit Aqua dest. gewaschen, anschließend mit Alizarin Rot Arbeitslösung bedeckt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Alizarin Rot abgenommen und die Zellen nochmals dreimal mit PBS gewaschen. Die gefärbten Zellen wurden bedeckt mit PBS bei +4°C aufbewahrt. Die gefärbten Zellen wurden im inverten Mikroskop betrachtet.

2.6.3. Van Kossa Färbung

Bei der Van Kossa Färbung werden Calcium Ionen in der extrazellulären Matrix nachgewiesen, indem sie gegen Silberionen ausgetauscht werden. Die Zellen wurden in den 6-Well-Platten fixiert indem sie für 15 Minuten mit Methanol und anschließend für 20 Minuten mit Aqua dest. inkubiert wurden.

Zur Herstellung einer 5%igen Silbernitratlösung wurden 25 g Silbernitrat in 500 ml Aqua dest. gelöst. Diese Lösung war lichtgeschützt bei 4°C ein Jahr haltbar. Zum Färben wurden die Zellen mit der 5%igen Silbernitratlösung bedeckt und ins helle Tageslicht, für eine Stunde oder so lange bis die Lösung sich schwarz färbte, gestellt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, zwischen den Färbeschritten wurden die Zellen mit Aqua dest. gespült. Danach wurden die Zellen mit einer 2%igen Natriumthiosulfat Lösung bedeckt und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. gespült und Nuklear Fast Red Lösung zugegeben. Nach fünf Minuten wurde erneut mit Aqua dest. gespült. Die gefärbten Zellen wurden mit Aqua dest. bedeckt und bei +4°C aufbewahrt. Die gefärbten Zellen wurden im invertierten Mikroskop betrachtet.

2.6.4. Immunhistochemische Färbung

Bei der immunhistochemischen Färbung werden die gesuchten Strukturen mit den spezifischen Primärantikörpern markiert, sodass Antigen-Antikörper-Komplexe entstehen. Um diese sichtbar zu machen, wird ein Sekundärantikörper verwendet, welcher an ein Fluorochrom gekoppelt ist und an den Primärantikörper bindet. Mehrere Sekundärantikörper können an einen Primärantikörper binden, was zu einer Signalverstärkung führt. Das Fluorochrom kann durch das Licht einer definierten Wellenlänge zu Fluoreszenz angeregt werden und wird in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Dabei erzeugen Farbfilter Licht entsprechender Wellenlänge und regen eine Emissionsstrahlung an. Die Analyse erfolgte im Auflichtverfahren bei 40-facher Vergrößerung mittels Ölimmersionsobjektiv. Die Bilder wurden mit dem Kamerasystem digital erfasst und mithilfe des Bildmanagersystems Leica Application Suite Version 3.4.3 ausgewertet. Um verschiedene Antigene in einem Präparat darzustellen, wurden Mehrfachmarkierungen (Kofärbungen) mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

2.6.4.1. Primärantikörper

Die spezifischen monoklonalen und polyklonalen Antikörper die zur Detektion definierter Proteine verwendet wurden sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Primärantikörper Immunhistologie

Primärantikörper	Klon	Wirt	Konzentration	Hersteller
Heavy chain cardiac Myosin (beta-MHC)	3-48	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, UK
GATA4	G-4	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc. USA
Cardiac Troponin T	1F11	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Sca-1	Polyklonal	Kaninchen	1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phalloidin FITC		Amanita phalloides	1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.6.4.2. Sekundärantikörper

Die verwendeten Sekundärantikörper sind in der Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Sekundärantikörper Immunhistologie

Sekundärantikörper	Klon	Wirt	Konzentration	Emissionsfarbe	Hersteller
Anti-mouse Cy 3	Polyklonal	Esel	1:300	Rot	Abcam, Cambridge, UK

2.6.4.3. Kernfarbstoffe

Die Zellkerne wurden mit DAPI (4,6-diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), einem Fluoreszenz-Kernfarbstoff dargestellt. Die Färbung wurde mit einer Verdünnung von 1:1000 durchgeführt und die Zellkerne stellten sich blau dar.

2.6.4.4. Durchführung der Färbungen

Für die immunhistochemische Untersuchung der Expression der frühen kardialen Marker GATA4, beta-MHC und Troponin T wurden die Zellen auf den Chamber Slides unter entsprechenden Versuchsbedingungen kultiviert. Nach der Beendigung des Differenzierungsversuches wurden die Zellen fixiert. Dafür wurden die Chamber Slides

für 10 Minuten in 4%ige Paraformaldehydlösung (PFA) eingetaucht. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen mit 1% BSA-Lösung für 15 Minuten behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,01% Triton X-100 25 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellen dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Die Primärantikörper wurden entsprechend mit PBS verdünnt und auf die Chamber Slides aufgetragen. Die Zellen wurden in der Feuchtkammer für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Chamber Slides dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörper wurden entsprechend mit PBS verdünnt und auf die Chamber Slides aufgetragen. Inkubiert wurde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer für eine Stunde. Anschließend wurde der Kernfarbstoff DAPI in der Verdünnung 1:1000 dazugegeben und noch weitere 20 Minuten inkubiert. Danach wurden die Chamber Slides dreimal für drei Minuten mit PBS gewaschen, die Kammern wurden vorsichtig entfernt und die Objektträger mit Mowiol® beschichteten Deckgläsern eingedeckelt. Die Objektträger wurden bei 4°C im Dunklen gelagert, um ein Ausbleichen zu vermeiden und wurden nach dem Aushärten im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. RNA-Isolation aus Zellen

Die RNA-Isolation fand in einem separaten Raum statt, der ausschließlich zu diesem Zweck genutzt wurde. Die Flächen wurden vor Arbeitsbeginn mit RNase ExitusPlus™ (AppliChem) sauber gemacht.

Zur Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen wurden diese mit dem Lysepuffer aufgenommen. Der Lysepuffer besteht aus β -Mercaptoethanol 1:100 verdünnt in RLT-Puffer. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder™-Säule pipettiert und zwei Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss konnte bei -80°C aufbewahrt werden oder direkt für die Isolation der Gesamt-RNA bearbeitet werden. Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy® Mini-Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Hier wurden Silikat-Gel-Membranen als RNA-bindende Matrix verwendet. Es wurde 1 Vol (=350 μ l) von 70%igem Ethanol zu dem Zelllysate gegeben und gründlich vermischt. Das Gesamtvolumen (700 μ l Lösung) wurde danach auf eine RNeasy® Mini-Säule, die in einem 2 ml Auffanggefäß steckte, überführt und für 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das abzentrifugierte Eluat wurde verworfen. Anschließend wurden 350 μ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben, diese 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert

(Waschschrift 1) und das Eluat wiederum verworfen. Der folgende Schritt war notwendig, um die DNA-Kontaminationen durch eine DNase-Behandlung zu entfernen. Die DNase-Lösung bestand je Probe aus 10 µl DNase I Stocklösung und 70 µl RDD-Puffer. Nach der Zugabe dieses DNase-Inkubationsmixes (80 µl) wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde zunächst 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und nach einer Zentrifugation von 15 Sekunden bei 10 000 rpm (Waschschrift 2) wurde das Eluat verworfen. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer zugegeben und 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und erneut wurden 500 µl PRE-Puffer zugegeben und für 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule auf ein neues Sammelgefäß aufgesetzt und 1 Minute bei 13 000 rpm trocken zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein neues Sammelgefäß aufgesetzt. Für die Elution der RNA von der Säule wurden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Um eine möglichst große RNA-Menge zu eluieren wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und nochmals bei 13 000 eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend verworfen und das gewonnene Eluat enthielt die RNA.

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde photometrisch mittels Spektralphotometer bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der Software ND-1000 V 3.7.1. Als Qualitätskriterien wurden eine RNA-Konzentration von mindestens 30 ng/µl und ein Quotient $OD_{260/280}$ von 1,8 festgelegt.

2.7.2. *Reverse Transkription*

Mittels reverser Transkription wurde aus der Gesamt-RNA die komplementäre DNA (cDNA) hergestellt. Dazu wurde die RNA zu einer Konzentration von 1000 ng in 10 µl mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Zu den 10µl RNA wurden 1µl Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) zugegeben und 1 µl Random Primer (200 ng/µl). Der Ansatz wurde auf 65°C erhitzt und 5 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente dem Denaturieren der Sekundärstrukturen der RNA damit die Primer hybridisieren können. Die Random Primer sind zufällige Hexamerprimer, die irgendwo an die mRNA hybridisieren, somit sind anschließend alle mRNA-Bereiche in der cDNA vertreten (Mülhardt, 2009).

Anschließend werden 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT), 4 µl 5xFirst-Strand Buffer, 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ und 1 µl RNaseOut dazu pipettiert und zwei Minuten bei 25°C inkubiert. Zuletzt wird 1 µl Reverse Transkriptase SuperScript® II zugegeben und der Ansatz erst zehn Minuten bei 25°C und dann 50

Minuten bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion erfolgt die Inkubation für 15 Minuten bei 70°C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.7.3. *Primerauswahl*

Die Auswahl der sequenzspezifischen Primer erfolgte mithilfe des Programms FastPCR, anhand der über das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ermittelten cDNA-Sequenzen. Es wurde neben der Transkriptspezifität darauf geachtet, dass die Größe des PCR-Produkts für die quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) zwischen 100 und 200 Basenpaaren lag. Die Primer wurden mittels einer temperaturabhängigen Endpunkt-PCR mit anschließender analytischer Agarose-Gelelektrophorese getestet. In der Tabelle 17 sind alle verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 17: Primer

Target	Sequenz
GATA4 sense	TCAAACCAGAAAACGGAAGC
GATA4 antisense	GCTAGTGGCATTGCTGGAGT
Nkx 2.5 sense	ACATTTTACCCGGGAGCCTACGGTG
Nkx 2.5 antisense	GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGCGTG
Troponin I sense	CATGGAGGTGAAGGTGCAGA
Troponin I antisense	CTCTTGAACTTGCCCCTCAGG
Alpha MHC sense	ACGACCTGAAGGAGAACATCGCCA
Alpha MHC antisense	CCCGCAGCTCCTCCACGTCC
Alpha cardiac Actin sense	CCGCCCTAGCACGCCTACA
Alpha cardiac Actin antisense	GGGGCGTCATCACCCGCAAA
Cx 43 sense	TGGGGGAAAGGCGTGAGGGA
Cx 43 antisense	ACCCATGTCTGGGCACCTCTCTT
ANP sense	ATTGACAGGATTGGAGCCCAGAGT
ANP antisense	TGACACACCACAAGGGCTTAGGAT
Mef 2c sense	TGCCCTCAGTCAGTTGGGAGCTT
Mef 2c antisense	GTGGCGCGTGGTGTGTTGTG
Vimentin sense	GCCGAAAGCACCTGCAGTCA
Vimentin antisense	GCCTGCAGCTCCTGGATCTCTTCA
vWF sense	AGGCATGGTCCGGCACGAAA
vWF antisense	ACTTCCGCTCCCGGCAG

CD11b sense	CTCCGGTAGCATCAACAACA
CD11b antisense	CTCGTCCGAGTACTGCATCA

2.7.4. **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Polymerase-Kettenreaktion führt zu Amplifikation der DNA-Fragmente. Für die Durchführung werden dNTPs, Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase sowie Ausgangs-DNA (Template) und Reaktionspuffer benötigt. Die Komponenten wurden folgendermaßen zusammengefügt: 18,9 µl Aqua dest., 2,5 µl 10xPCR Reaktionspuffer, 0,5 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,5 µl vorwärts Primer, 0,5 µl rückwärts Primer und 0,5 µl Taq-Polymerase. Zu diesem Mastermix wurde 1 µl Template gegeben. Im Thermocycler fand die Reaktion statt: Denaturierung über 30 Sekunden bei 94°C, Annealing über 30 Sekunden mit einem Temperaturgradienten zwischen 54°C und 64°C, um die optimale Arbeitstemperatur für den jeweiligen Primer zu ermitteln, die Elongation bei 72°C für 45 Sekunden umfasste einen Amplifikationszyklus. Benötigt wurden 40 Amplifikationszyklen.

2.7.5. **Gelelektrophorese**

Zur Verifikation der Gradienten-PCR wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert im Agarosegel im elektrischen Feld zum Pluspol und wird dabei nach ihrer Größe aufgetrennt.

Das Agarosegel wurde hergestellt, indem 0,42 g Agarose in 35 ml einfach konzentriertem Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgelöst wurde. Dafür wurde die Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurden dem flüssigen Gel 1,5 µl Ethidiumbromid zugefügt. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und ermöglicht somit die Visualisierung im UV-Licht. Das flüssige Gel wurde in die Elektrophoresekammer gegossen und ein Kamm mit der benötigten Anzahl der Zähne wurde platziert. Nach dem Aushärten des Gels entstanden somit Taschen, wohin die zu untersuchenden PCR-Produkte aufgetragen wurden. Es wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 3 µl DNA-Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Ebenso wurde 5 µl DNA-Marker aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1xTBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 5 Milliampere Stromstärke und 70 Volt Spannung über 45 Minuten. Die Visualisierung erfolgte mithilfe des Imagersystems Chemidoc™ XRS. Die Banden der amplifizierten Sequenzen wurden zum DNA-Marker in Bezug gesetzt und die Positionen anhand der bekannten Produktgrößen der Primer verifiziert.

2.7.6. **Quantitative Real-Time PCR**

Mittels einer quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) ist es möglich ein bestimmtes cDNA-Fragment nicht nur zu amplifizieren, sondern auch quantitativ zu bestimmen. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Dafür wird in dem qRT-PCR Ansatz ein fluoreszierender Farbstoff verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieses Farbstoffes ansteigt. Die Vermehrung der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Für die quantitative Auswertung wird die Kinetik der stattfindenden PCR genutzt. Anfangs steigt die Anzahl amplifizierter DNA-Fragmente exponentiell an. Wenn das Produkt akkumuliert, steigen auch die störenden Einflüsse und die Reaktion verlangsamt sich zu einem linearen Verlauf bis hin zum Stillstand. Man nimmt daher als Richtwert die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt (Ct-Wert), weil zu diesem Zeitpunkt die Vermehrung noch exponentiell ist. Parallel werden bekannte Templatemengen amplifiziert und verglichen, welchen Ct-Wert man für welche Templatemenge erhält. Daraus wird eine Standardkurve erstellt, aus der sich dann umgekehrt aus einem CT-Wert auf die Templatemenge schließen lässt (Mülhardt, 2009).

Wir verwendeten für die Durchführung der qRT-PCR Power SYBR® Green PCR Master Mix von Applied Biosystems. Dieser enthält den Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green 1, DNA-Polymerase AmpliTaq Gold®, dNTPs, Reaktionspuffer sowie Referenz-Template. Jede qRT-PCR wurde als Triplikat durchgeführt, um experimentelle Schwankungen zu vermeiden. Die 25 µl qRT-PCR-Ansätze wurden in einer Reinbank auf Eis pipettiert und setzten sie wie folgend dargestellt zusammen:

1000 ng cDNA
0,3 µl forward Primer
0,3 µl reverse Primer
7,5 µl Power SYBR® Green PCR Master Mix
ad 25 µl ddH₂O.

Die Ansätze wurden durchmischt, abzentrifugiert und die Amplifikation in dem qRT-PCR-Cycler nach genspezifischem Thermoprofil durchgeführt. Die relative Menge an mRNA des Zielgens wurde gegenüber einem konstitutiv exprimiertem Gen normalisiert (hier GAPDH). Wir verwendeten für die quantitative Auswertung die Bio-Rad CFX Manager 3.0 Software von Bio-Rad Laboratories. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode. Hier werden die jeweiligen Ct-Werte auf den Ct-Wert der endogenen Kontrolle kalibriert (GAPDH) und miteinander verglichen. Die relative Quantifizierung der mRNA wird als relative mRNA Menge gegenüber der Kontroll-RNA ausgedrückt (Pfaffl, 2001).

2.8. Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie, engl. „fluorescence activated cell sorting“ (FACS), werden zelluläre Antigene mit einem Antikörper markiert. Dieser Antikörper ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die so markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden. Dadurch kommt es zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff bekommt man somit ein spezifisches Signal.

Für die Messung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, danach mittels Trypsinierung von den Zellschalen abgelöst und pelletiert. Der Zellpellet wurde nochmals mit 10 ml PBS/5 mM EDTA gewaschen und nach dem Pelletieren in 1,5 ml PBS/5 mM EDTA aufgenommen. Je 100 µl der Zellsuspension wurde in elf FACS-Tubes verteilt: ein Tube pro Antikörper, ein Tube mit allen Antikörpern und ein Tube ungefärbt. Die Antikörper wurden nach dem in Tabelle 18 abgebildeten Schema dazu pipettiert.

Tabelle 18: FACS-Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Volumen
CD90	FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D	2 µl
CD133	PE	BioLegend, San Diego, USA	5 µl
CD117	Pac Blue	BioLegend, San Diego, USA	2 µl
CD105	PeCy7	BioLegend, San Diego, USA	5 µl
CD73	AF 647	BioLegend, San Diego, USA	2 µl
CD11b	AF 700	BioLegend, San Diego, USA	2 µl
CD45	e Fluor 605	BioLegend, San Diego, USA	5 µl

Danach wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS/5 mM EDTA gewaschen und für die Messung in 300 µl PBS/5 mM EDTA aufgenommen. Die Untersuchung erfolgte an einem LSR II Durchflusszytometer von Firma BD. Zur Auswertung wurde die Software CellQuest® Pro verwendet und die Daten wurden mittels der Software FlowJo V 9.1 analysiert.

2.9. Statistische Methoden

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler (MV ± SEM) angegeben. Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism für Windows (Version 10.6.0) durchgeführt. Die statistischen Untersuchungen der stimulierten Stammzellen und der Kontrollgruppen wurden bei Normalverteilung und zwei Vergleichsgruppen mit einem T-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt. Bei drei Vergleichsgruppen wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz eine 1-Wege-Varianz-Analyse (ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Vergleich (Tukey) zwischen den einzelnen Gruppen durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) gewertet. Ob bei unterschiedlichen N-Zahlen eine Normalverteilung vorliegt, wurde mithilfe von Shapiro-Wilk Test überprüft.

2.10. Laborzubehör, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemikalien

2.10.1. Operative Geräte, Verbrauchsmaterialien, Medikamente und Chemikalien

In der Tabelle 19 sind Geräte und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die bei den Operationen an den Mäusen benutzt wurden.

Tabelle 19: Geräte und Verbrauchsmaterialien bei Operationen an den Mäusen

Gerät	Hersteller
Beatmungsgerät MiniVent® Typ 845	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Elektrokardiogramm	Diefenbach GmbH, Frankfurt am Main, D
Faden Perma-Hand® Seide 5-0, Nadel C-1	Ethicon Inc., Somerville, USA
Faden Prolene® 7-0 mit BV-Nadel	Ethicon Inc., Somerville, USA

Filter für Isofluran-Verdampfer Veterinary Fluosorber®	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Isofluran-Filtersystem Fluovac®	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Kauter "low temperature micro fine tip cautery"	Aaron Medical, St. Petersburg, USA
Ligaturhilfe "Ultra fine ligation aid"	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Narkosegerät Mouse Ventilation Minivent Typ 845	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Olivenschlundsonde	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Operationsmikroskop OPMI®-1FR	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Spritze (1ml) Omnifix®	B. Braun AG, Melsungen, D
Wärmeplatte für Kleintieroperationen	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D

In Tabelle 20 sind Medikamente und Chemikalien, die bei den Operationen an den Mäusen verwendet wurden, dargestellt

Tabelle 20: Medikamente und Chemikalien bei Operationen an den Mäusen

Medikamente bzw. Chemikalien	Hersteller
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, D
Braunol® Desinfektionsmittel	B. Braun AG, Melsungen, D
Buprenorphin (Temgesic®)	Essex Pharma, München, D
Ethanol 70%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Isofluran (Forene®)	Abbot GmbH & Co. KG, Wiesbaden, D
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun AG, Melsungen, D
Ketamin	Medistar Arzneimittel-Vertrieb GmbH, Holzwickede, D
Mepivacainhydrochlorid 2% Spray	Astra Zeneca GmbH, Wedel, D
Veet® Enthaarungscreme	Reckitt Benckiser Deutschland, GmbH, Mannheim, D
Xylazin 2%	Serum-Werke Bernburg AG, Bernburg, D

2.10.2. **Geräte, Verbrauchsmaterialien und Medien der Zellkultur**

In Tabelle 21 sind Geräte, Verbrauchsmaterialien und Medien aufgeführt, die in den Zellkulturversuchen verwendet wurden.

Tabelle 21: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Medien der Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Begasungsbrutschrank Heraeus Cytopen	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Sicherheitswerkbank Heraeus Laminair® HLB 2448 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
GFL-Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D
Inversionsmikroskop Aiovert 100 TV	Carl Zeiss AG, Göttingen, D
Digitalkamera Fujix HC-300 Z	Fujifilm GmbH, Düsseldorf, D
Kühlzentrifuge Rotanta RPC	Hettich GmbH & Co. KG, Tübingen, D
6-Well Platte Cellstar®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Zellkultur Schale Cellstar®, Ps, 35/10	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Zellkultur Schale Cellstar®, Ps, 100/20	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Einfrierröhrchen Cryovials®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Nunc® Lab-Tek® II chambered coverglass 8 wells	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Nunc® Lab-Tek® II chambered coverglass 2 wells	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Zellschaber	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Einmalpipetten Cellstar®, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
BD Falcon™ Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Life Sciences, Heidelberg, D
Millex® Spritzenvorsatzsterilfilter 0,2 µm	Merck Millipore, Darmstadt, D
Neubauer Zellkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Deckgläser für die Neubauer Zellkammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
BD Falcon™ Cell strainer	BD Life Sciences, Heidelberg, D
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA
Nährmedium DMEM	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D

Nährmedium Ham F 12	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Nährmedium M199	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Fötales Kälberserum (FCS)	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Kaninchenserum	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin)	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Glutamin	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
D-MEM/F-12	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
GlutaMAX-I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
MSC Qualified FBS	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Innova™ 4200 Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison NJ, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	c.c.pro GmbH, Oberdorla, D
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	Nalge Nunc International Corp., Roskilde Dänemark
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Insulin Insuman® Rapid 40 IE	Sanofi Aventis Deutschland GmbH, D
Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
2 Phospho-L-Ascorbin-Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
5-azacytidine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
ITS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Taurin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
2,3-Butanedionemonoxim	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Pumpe Masterflex®	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, D
Wasserbad DC 50-B3	Haake Technik GmbH, Vreden, D
Lipopolysaccharid	Invivogen, San Diego, USA
Tumornekrosefaktor alpha	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

2.10.3. **Geräte, Reagenzien und Chemikalien für histologische und immunhistologische Methoden**

In der Tabelle 22 sind Geräte, Reagenzien und Chemikalien dargestellt, die für histologische und immunhistologische Methoden benutzt wurden.

Tabelle 22: Geräte, Reagenzien und Chemikalien für histologische und immunhistologische Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Lichtmikroskop mit Fluoreszenzvorrichtung Leica DM1000LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Digitalkamera Leica DFC 420 C für Lichtmikroskop mit Fluoreszenzvorrichtung	Leica Microsystems GmbH, Weztlar, D
Lichtmikroskop Leica DM1000LED	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Magnetrührer RCTbasic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
pH-Meter pH526	WTW GmbH, Weilheim, D
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Nuklear Fast Red Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Mowiol 4-88®	Carl Roth GmbH und Co, KG, Karlsruhe, D
Triton™ X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Alizarin Red	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Silbernitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

2.10.4. **Geräte, Chemikalien und molekularbiologische Kits für die quantitative RNA-Analyse**

In der Tabelle 23 sind Geräte, Chemikalien und molekularbiologische Kits aufgeführt, die für quantitative RNA-Analysen verwendet wurden.

Tabelle 23: Geräte, Chemikalien und molekularbiologische Kits für die quantitative RNA-Analyse

Bezeichnung	Hersteller
7500 Fast Peal Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Thermocycler	SensoQuest Biomedizinische Elektronik GmbH, Göttingen, D
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D

QIAshredder™-Säule	Qiagen GmbH, Hilden, D
QIA Gen RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Desoxyribonukleotidtriphosphate -Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Random Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
RLT-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
RNaseOut	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
RNeasy-Mini-Kit®	Qiagen GmbH, Hilden, D
Primer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
0,1 M Dithiothreitol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
10xPCR Reaktionspuffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
5x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Superscript-II-Reverse-Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
DNA-Marker short-run extendes	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
DNase I stock Lösung	Qiagen GmbH, Hilden, D
Ethidiumbromid	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, D
Borsäure	Carl Roth GmbH &Co. KG, Karlsruhe, D
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
RT-PCR-Platte Abgene®	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D
Schwingmühle Mixer Mill 301	Retsch GmbH, Haan, D
Spannungsquelle für Gelelektrophorese Consort E143	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Thermomixer Compact	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge für RT-PCR-Platten Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Abdeckfolie für RT-PCR-Platte MicroAmp™	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, D
Mikrozentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, D
MS 2 IKA® Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D

Nanodrop® ND-1000 Spektrophotometer	PEGLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PCR-Werkbank CaptairBio	Erlab® D.F.S. S.A.S., Köln, D
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D

2.10.5. **Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für Western-Blot und Proteinbestimmung**

In Tabelle 24 sind Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien aufgeführt, die für die Western-Blot-Analyse und Proteinbestimmung verwendet wurden.

Tabelle 24: Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für Western-Blot

Bezeichnung	Hersteller
Laufpuffer NuPage® MES SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Pierce™ Cell Surface Protein Isolation Kit	Thermo Fischer Scientific GmbH, Darmstadt, D
NuPage® Transferpuffer (20x)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Bis-Tris Gele NuPage® 4-12%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Gelelektrophoresekammer	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Spannungsquelle Power Ease 500	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Nitrozellulosemembran Roti® -NC 0,2 µm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Ponceau S Solution 0,1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Chemilumineszenz Substrat Super Signal™ West Dura Extended Duration Substrate	ThermoFischer Scientific GmbH, Darmstadt, D
Lowry Protein-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Magermilchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
HRP-konjugiertes Strep Tactin	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
TWEEN®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Taumelrollenmischer CAT RM 5-40	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH, Ballrechten-Dottingen, D

Precision Plus Protein™ Western C™ Standard	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
ELISA-Reader Sunrise-basic	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
96-Well-Platte Cellstar®	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Semidry-Blot Transferkammer	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, D
Filterpapier Rotilabo-Blotting papers 0,75 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rinderserumalbumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Zentrifuge Fresco 17	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D

2.10.6. **Reagenzien und Chemikalien**

In Tabelle 25 sind alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien, die nicht bereits oben erwähnt wurden, aufgelistet.

Tabelle 25: Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Tris	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D

2.10.7. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 26 sind alle Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien, die nicht bereits oben erwähnt sind, aufgelistet.

Tabelle 26: Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Autoclav (VX-95)	Systec GmbH, Wettenberg, D
Feinwaage (ALJ 160-4NM)	Kern & Sohn GmbH, Balingen, D
Heizplatte Magnetrührer (TCT basic)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Brutschrank (Heraeus Med CO2-Auto-Zero)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Objektive (PL Fluotar 10x, 20x PH2, HI Plan 4x, HI Plan 10x, HI Plan 100x Öl, 25x Öl)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Pipetten (1000 µl, 100 µl, 10 µl)	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, D
Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl, 10 µl, 2,5 µl, 1 µl)	Eppendorf Research AG, Hamburg, D
Rollenmischer (Assistent RM5)	Karl Hecht KG, Sandheim, D
Schüttelwasserbad (1083)	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Burgwedel, D
Schwenktisch (PMR 30)	Grant Instruments Ltd, Royston, Großbritannien
Spülmaschine (Mielabor G7783)	Miele & Cie. KG, Gütersloh, D
Sterilisator (T6060)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Vortex (K MS2 MINISHAKER)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Wasseraufbereiter (Milli-Q Plus)	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Zentrifuge (5415C/D)	Eppendorf Research AG, Hamburg, D
Zentrifuge (Sorvall RC-5B)	Du Pont Instruments Corp., Marlborough, USA
Zentrifuge (Multige 3S-R)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Sterilbank (Biocap DNA/RNA)	Erlab D.F.S S.A.S, Val de Reuil Cedex, Frankreich
pH-Meter (pH 526)	Nova Analytics Corp., Wakefield, USA
Abschlussfolie Parafilm® M	Bemis Manufacturing Company, Sheboygan Falls, USA
Wägeschälchen Rotilabo®	Carl-Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, D
Glasflaschen (200 ml, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott AG, Mainz, D

2.10.8. **Puffer und Lösungen**

Im Folgenden sind die Zubereitung und Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen dargestellt, die nicht bereits oben beschrieben sind.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): die Stammlösung wurde hergestellt, indem 397,4 g NaCl, 10 g KCl, 10 g H₂PO₄ und 88,75 g Na₂HPO₄*H₂O in doppeldestilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und auf ein Volumen von 5 L aufgefüllt wurden. Für die Gebrauchslösung wurden 500 ml der Stammlösung 10-fach mit ddH₂O verdünnt. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Formaldehydlösung 10%: 100 g Paraformaldehyd wurde in 1 L PBS gelöst und der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde in 50 ml Falcon™ Tubes portioniert, bei -20°C gelagert und jeweils für den Gebrauch aufgetaut.

Formaldehydlösung 4%: 40 g Paraformaldehyd wurde in 1 L PBS gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde in 50 ml Falcon™ Tubes portioniert, bei -20°C gelagert und jeweils für den Gebrauch aufgetaut.

1M CaCl₂ Lösung: 14,7 g CaCl₂ in 100 ml ddH₂O gelöst und steril filtriert.

10 mM CaCl₂ Lösung: 1 ml der 1M CaCl₂ Lösung wurde mit ddH₂O auf 10 ml aufgefüllt.

100 mM CaCl₂ Lösung: 1,47 g CaCl₂ in 100 ml ddH₂O gelöst und steril filtriert.

BSA: 5 g BSA in 50 ml ddH₂O gelöst.

Eindeckmedium für Immunhistologie: 50 g Mowiol4-88® wurden mit 200 ml PBS (pH 8,0) über 16 Stunden mit dem Magnetrührer gerührt. Danach wurde 25 ml wasserfreies Glycerin zugegeben und über weitere 16 Stunden gerührt. Danach wurde die Lösung bei 17.000 U/min über 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand stellte das fertige Eindeckmedium dar und wurde bei 4° gelagert.

Natriumthiosulfat 5% Lösung: 5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Agua dest. gelöst.

20x TBS/Tween®-Puffer: 12,1 g Tris Chlorid, 9 g NaCl und 1 ml Tween® 20 in ddH₂O gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

Transferpuffer für Western-Blot: 100 ml 20xTBS/Tween®-Puffer mit 100 ml Methanol gemischt und mit ddH₂O auf 1000 ml aufgefüllt.

Milchpulver 5% in TBS/Tween®-Puffer: 5 g Magermilchpulver in 100 ml 20xTBS/Tween®-Puffer gelöst.

4xTris-Cl/SDS-Puffer: 6,05 g Tris Base wurde in 40 ml ddH₂O gelöst, der pH-Wert auf 6,8 einstellt, mit ddH₂O auf 100 ml auffüllt und die Lösung durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Anschließend wurde 0,4 g SDS darin gelöst und der fertige 4xTris-Cl/SDS-Puffer konnte bei 4° gelagert werden.

SDS-Ladepuffer: für 10 ml SDS-Ladepuffer wurden 7 ml 4xTris-Cl/SDS-Puffer, 3 ml Glycerol, 1 g SDS, 0,93 g DTT und 1,2 mg Bromphenolblau zusammengemischt, portioniert je 1 ml und bei -20°C aufbewahrt.

10-fach konzentrierter Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer: für 1000 ml wurde 108 g Tris Base, 55 g Borsäure und 20 ml 0,5 M EDTA-Lösung in destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert auf 8,5 eingestellt.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersuchte das kardiale Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen (MSC) und Fettstammzellen sowie den Einfluss inflammatorischer Stimuli auf dieses Potential.

Für beide Zelltypen wurde zunächst untersucht, ob diese sich kardial differenzieren. Anschließend wurde der Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die kardiale Differenzierung untersucht.

3.1. Etablierung der Methoden

Für die Durchführung der Kokulturversuche mit den adulten Kardiomyozyten und für die Gewinnung extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine zur Etablierung einer kardialen Differenzierungsnische in der Zellkultur war eine Methode erforderlich um das Herz einer Maus möglichst schonend in die einzelnen Zellen zu zerlegen. Die Kardiomyozyten und auch andere Zellen des Herzmuskels sollten dabei vital bleiben und noch einige Zeit in der Zellkultur überleben. Die gewonnenen Proteine sollten einen gesunden Zustand des Herzmuskels möglichst widerspiegeln und damit eine physiologische kardiale Differenzierungsnische nachahmen.

Weiterhin sollte der Stammzellcharakter der in unserem Labor isolierten Fettstammzellen belegt werden. Hierzu wurden Differenzierungsstudien zu adipogenen und osteogenen Linien durchgeführt, sowie die stammzellspezifischen Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse bestimmt.

3.1.1. Zellisolation aus dem Herzen

Die Isolation der Zellen aus den murinen Herzen erfolgte wie im Kapitel 2.3.6 beschrieben. Die Abbildung 3 zeigt die frisch isolierten Zellen. Die Gesamtzellzahl variierte bei den einzelnen Isolationen zwischen 1,5 und 2 Mio. Zellen. Der Anteil von ziegelsteinförmigen Kardiomyozyten an der Gesamtzellzahl lag bei 15-20%. Die Kontraktionsfähigkeit wurde visuell durch die Lichtmikroskopie geprüft.

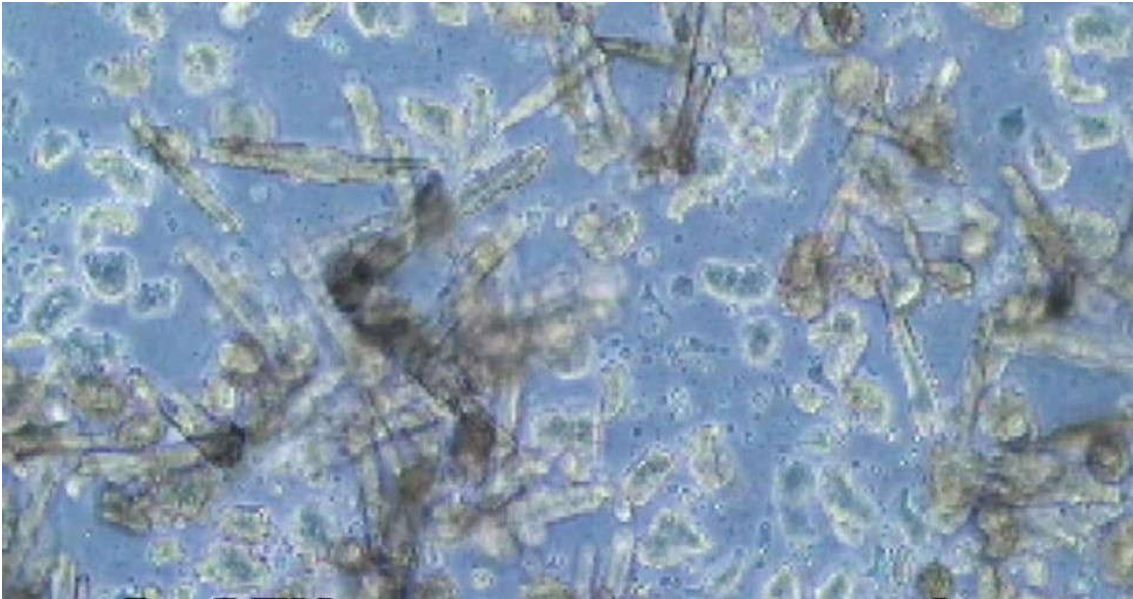


Abbildung 3: adulte murine Kardiomyozyten im Lichtmikroskop direkt nach der Isolation.

3.1.2. **Isolation extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine**

Die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine wurden wie im Kapitel 2.4.1 beschrieben aus den gesunden murinen Herzen gewonnen. Es wurden insgesamt 23 Isolationen durchgeführt. Die Proteinmengen einzelner Isolationen variierten zwischen 5,7 µg und 188,5 µg. Alle Proben wurden auf das Vorhandensein intrazellulärer Proteine mittels Western-Blot untersucht. Als Marker für die extrazellulären Proteine wurde der alpha-Adrenorezeptor und als Marker für die intrazellulären Proteine Troponin T gewählt. Von 23 gewonnenen Proteinlysaten enthielten sieben intrazelluläre Proteine und wurden nicht für Stimulationsversuche verwendet.

Die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine aus den infarzierten murinen Herzen wurden wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben gewonnen. Es wurden zehn Isolationen durchgeführt, die gewonnene Proteinmenge pro Isolation lag zwischen 104,8 µg und 155 µg. Drei von zehn Proben enthielten intrazelluläre Proteine.

3.1.3. **Isolation der Fettstammzellen und Nachweis des Stammzellcharakters**

Die Isolation der Fettstammzellen erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Die nach der Isolation erfolgte Zellkultur wurde bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 80% durchgeführt und dauerte drei bis fünf Tage. Vor der Verwendung im Versuch wurden die isolierten

Fettstammzellen dreimal bis maximal fünfmal passagiert, um mögliche spontane Differenzierungsvorgänge auszuschließen. Die Qualität der Isolation wurde nach den Kriterien der International Society for Cellular Therapy überprüft (Dominici et al., 2006).

Die drei definierenden Kriterien für mesenchymale Stammzellen sind:

- Adhärenz zu Plastik
- Spezifische Oberflächenantigene: >90% CD105, CD90, CD73; <2% CD45, CD11b, CD34, CD14, CD79, CD19 und HLA II.
- Differenzierungspotential zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten (Dominici et al., 2006)

Das **erste Kriterium** konnte bereits bei der Isolation überprüft werden, denn die Zellen waren rasch an den Plastikschalen adhärent.

Zum Nachweis spezifischer Oberflächen-Marker (**zweites Kriterium**) wurden die Fettstammzellen mithilfe der FACS-Analyse immunphenotypisiert. Wie in der Abbildung 5 dargestellt, waren 21% der Fettstammzellen positiv für CD90+, 48% waren positiv für CD105+ und 19% waren positiv für CD73+. Für alle drei fettstammzellspezifischen Oberflächenmarker CD105+, CD73+ und CD90+ waren 4,9 % der isolierten Fettstammzellen positiv (Abbildung 4).

Die isolierte Zellpopulation wies keine für CD45 und CD133 positiven Zellen auf. CD11b exprimierten 1% der Zellpopulation.

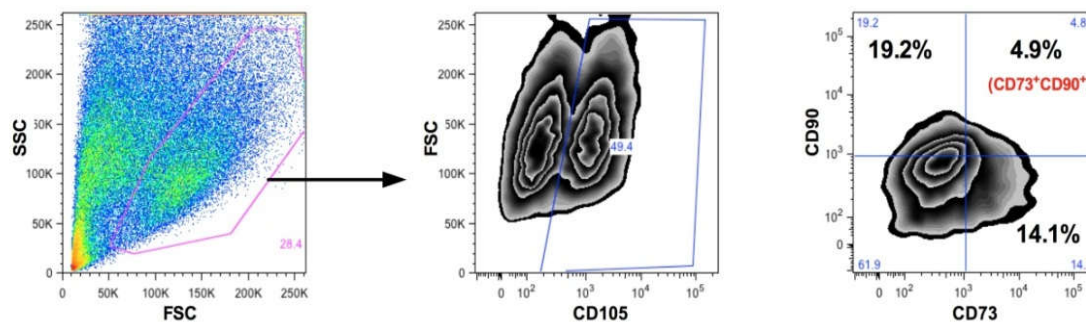


Abbildung 4: Expression spezifischer Oberflächenantigene durch die Fettstammzellen. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen aus der Population der isolierten Fettstammzellen welche alle drei Oberflächenantigene CD105+, CD73+ und CD90+ exprimieren.

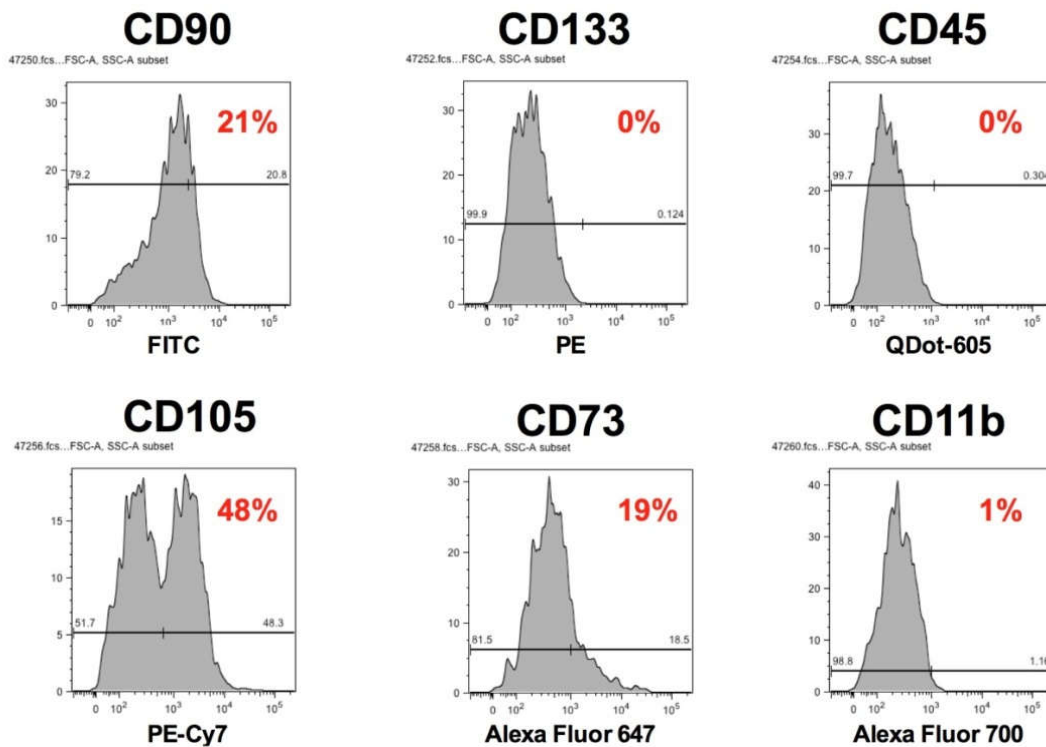


Abbildung 5: Expression spezifischer Oberflächenmarker durch die Fettstammzellen. Die Abbildung zeigt welcher Anteil der Zellen aus der gesamten isolierten Zellpopulation die spezifischen Oberflächenantigene aufweist

Weiterhin war um die isolierten Fettstammzellen als Stammzellen zu definieren der Nachweis eines multilinearen Differenzierungspotentials (**drittes Kriterium**) erforderlich. Dafür wurden die Zellen, wie in den Kapiteln 2.3.7.1 und 2.3.7.2 beschrieben, adipogen und osteogen differenziert.

Die adipogene Differenzierung wurde anhand der Oil-Red-O Färbung gezeigt (Abbildung 6). Zellen, die sich zu Adipozyten differenzierten, reicherten Fettvakuolen an und diese stellten sich in der Färbung rot dar. Zur quantitativen Auswertung wurden in den einzelnen Wells die Fettvakuolen anreichernden Zellen ausgezählt und auf die Gesamtzellzahl bezogen. Demnach hatten sich ca. 40% der Fettstammzellen zu Adipozyten differenziert. Dieses Ergebnis war für alle adipogenen Differenzierungsversuche repräsentativ.

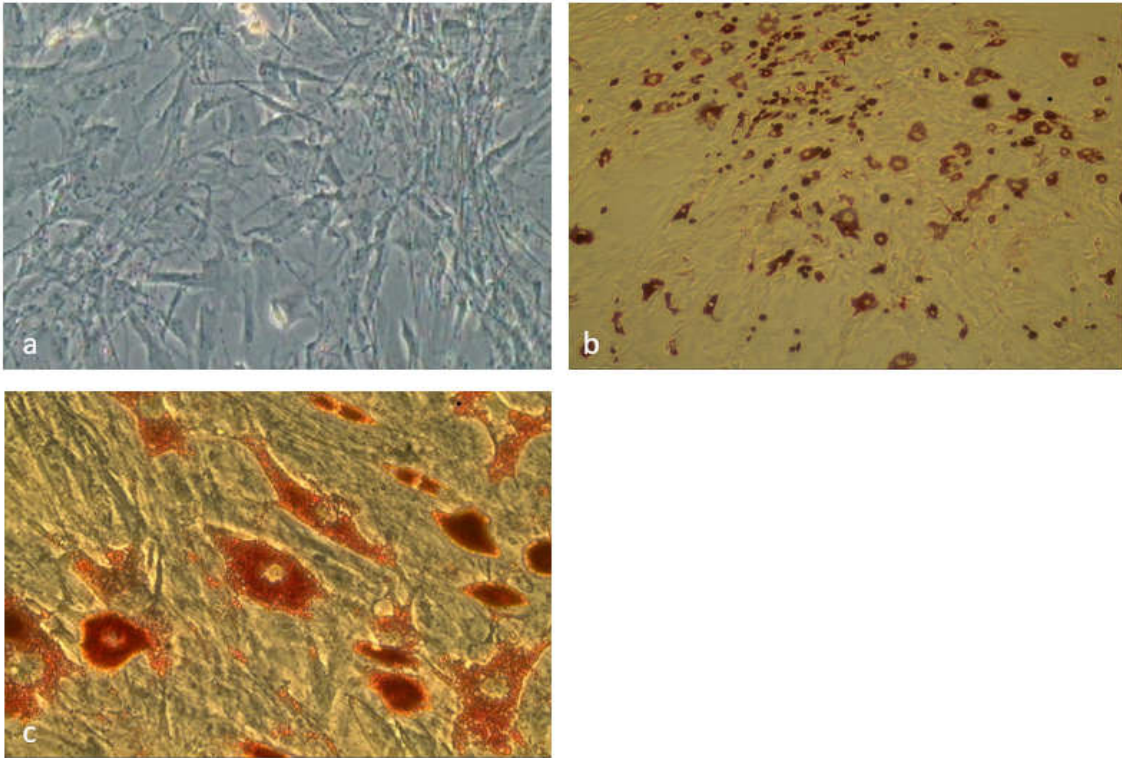


Abbildung 6: Nachweis adipogener Differenzierung der Fettstammzellen mit Oil-Red-O Färbung. In der Kontrollgruppe (a) zeigen sich keine Fettvakuolen. Fettstammzellen, die im adipogenen Differenzierungsmedium kultiviert wurden, reichern Fettvakuolen an, welche sich rot anfärben (b und c).

Die osteogen differenzierten Zellen fielen bereits bei der Betrachtung der Nativpräparate durch morphologische Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen auf. Sie verloren ihr spindelförmiges Aussehen und nahmen eine rundliche Form an, die den Osteoblasten ähnelte (Abbildung 7). Fettstammzellen in der Kontrollgruppe behielten ihre spindelförmige Form, es war nur eine Zunahme der Zellzahl im Sinne einer Proliferation zu erkennen (Abbildung 7 a).

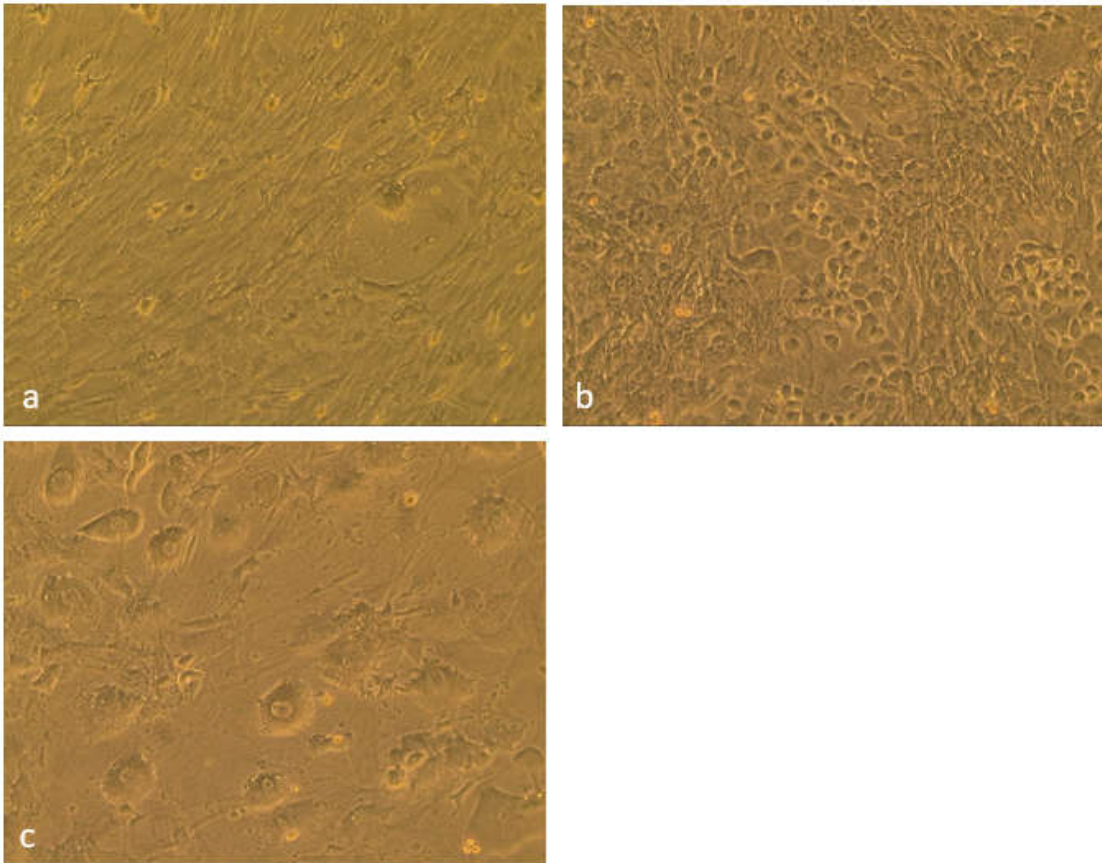


Abbildung 7: Osteogene Differenzierung der Fettstammzellen (Nativpräparat): Abb. (a) zeigt das Nativpräparat der Fettstammzellen welches im Medium ohne osteogene Zusätze kultiviert wurde (Negativkontrolle) (b) und (c) zeigen die Fettstammzellen nach 14 Tage Kultur in osteogenem Medium.

Weiterhin wiesen osteogen differenzierte Fettstammzellen eine signifikant höhere Expression alkalischer Phosphatase (MV=5,552, SEM=0,083) im Vergleich zur Kontrollgruppe (MV=1,038, SEM=0,0382) bei $p < 0,0001$ auf (Abbildung 8).

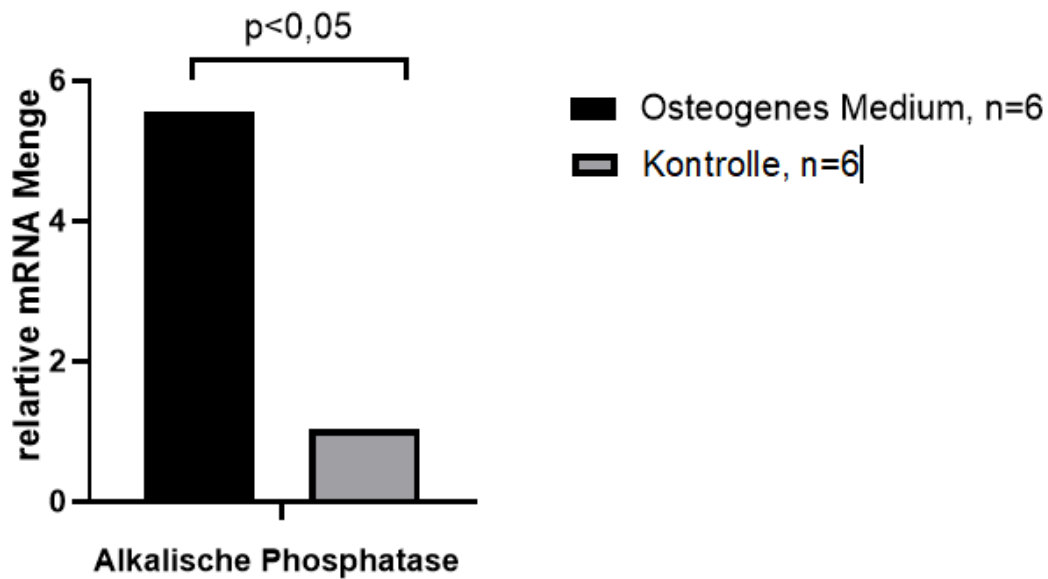


Abbildung 8: qRT-PCR der alkalischen Phosphatase in den osteogen differenzierten Zellen. Die Expression der alkalischen Phosphatase ist dargestellt als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle als Mittelwert +/-SEM. $P < 0,05$, $n=6$

Für den histochemischen Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden die Zellen mit Alizarin-Rot sowie nach Van Kossa gefärbt. Die Alizarin-Rot Färbung machte die mineralisierte extrazelluläre Matrix sichtbar, indem sie sie rot einfärbte (Abbildung 9). In der Färbung nach Van Kossa wurde die extrazelluläre Matrix durch den Austausch der Ca^{2+} Ionen durch Silberionen schwarz eingefärbt (Abbildung 10). Die quantitative Auswertung ergab, dass 27% der Stammzellen sich osteogen differenzierten.

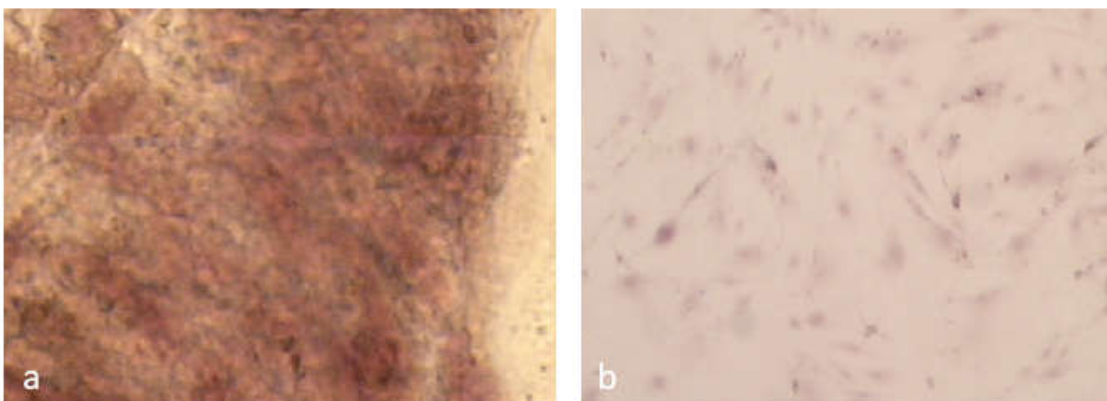


Abbildung 9: Färbung osteogen differenzierter Fettstammzellen mit Alizarin-Rot. Die mineralisierte extrazelluläre Matrix stellt sich rot dar Abb. (a), keine Rotfärbung der extrazellulären Matrix in der Negativkontrolle Abb. (b).

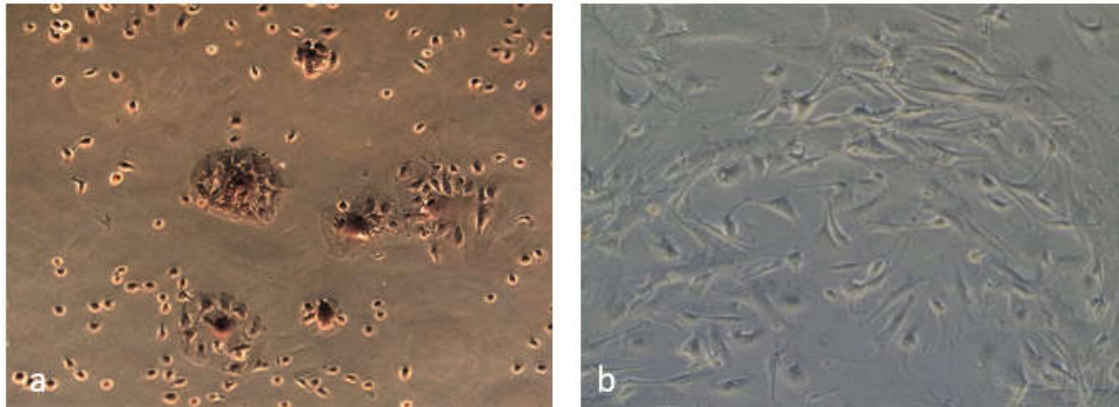


Abbildung 10: Färbung osteogen differenzierter Fettstammzellen nach Van Kossa. In Abb. (a) färbt sich die mineralisierte extrazelluläre Matrix durch Austausch von Ca^{2+} Ionen durch Silberionen schwarz. Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle.

3.2. Nachweis der kardiomyozytären Plastizität der MSCs und der Fettstammzellen

Die kardiomyozytäre Plastizität der MSCs und der Fettstammzellen wurde unter Verwendung der drei folgenden Ansätze überprüft:

- Epigenetische Stimulation mit 5-aza
- Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen
- Kokultur mit adulten Kardiomyozyten

3.2.1. Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza

Die Stimulation der isolierten Fettstammzellen mit 5-aza erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.3 beschrieben. Nach 21 Tagen Inkubationszeit wurden die Proben geerntet und auf die Expression kardialer Differenzierungsmarker mittels qRT-PCR und immunhistochemischer Färbung untersucht.

Die Expression der frühen kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 (MV=5,987, SEM=1,719) und Mef2c (MV=2,258, SEM=0,19) war in der 5-aza Gruppe signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (GATA4 MV=0,9971, SEM=0,1338; Mef2c MV=0,9996; SEM=0,1452). Die Expression reifer kardialer Marker Cx43 (MV=1,983, SEM=0,057) und Troponin T (MV=2,909, SEM=0,3825) war in der 5-aza Gruppe

ebenfalls signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe (CX43 MV=1,01, SEM=0,191; Troponin T MV=0,9718, SEM=0,1065).

Die Expression von Nkx2.5 und beta-MHC war in der 5-aza Gruppe erhöht, jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 11).

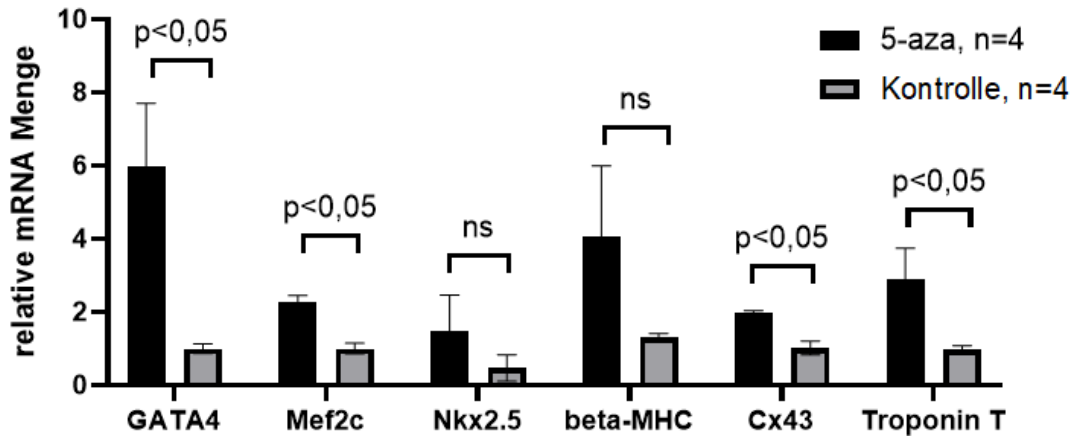


Abbildung 11: qRT-PCR von kardialen Differenzierungsmarkern in den Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza. Die Expression von Cx43, Troponin T, GATA4, Nkx2.5, beta-MHC und Mef2c ist als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle abgebildet. Signifikanz ist bei $p < 0,05$ gegeben, $n=4$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.

Die immunhistochemische Färbung zeigte, dass 31% der mit 5-aza stimulierten Fettstammzellen positiv für GATA4 waren. Für beta-MHC waren sowohl die mit 5-aza behandelten Fettstammzellen als auch die Fettstammzellen in der Kontrollgruppe positiv (Abbildung 12).

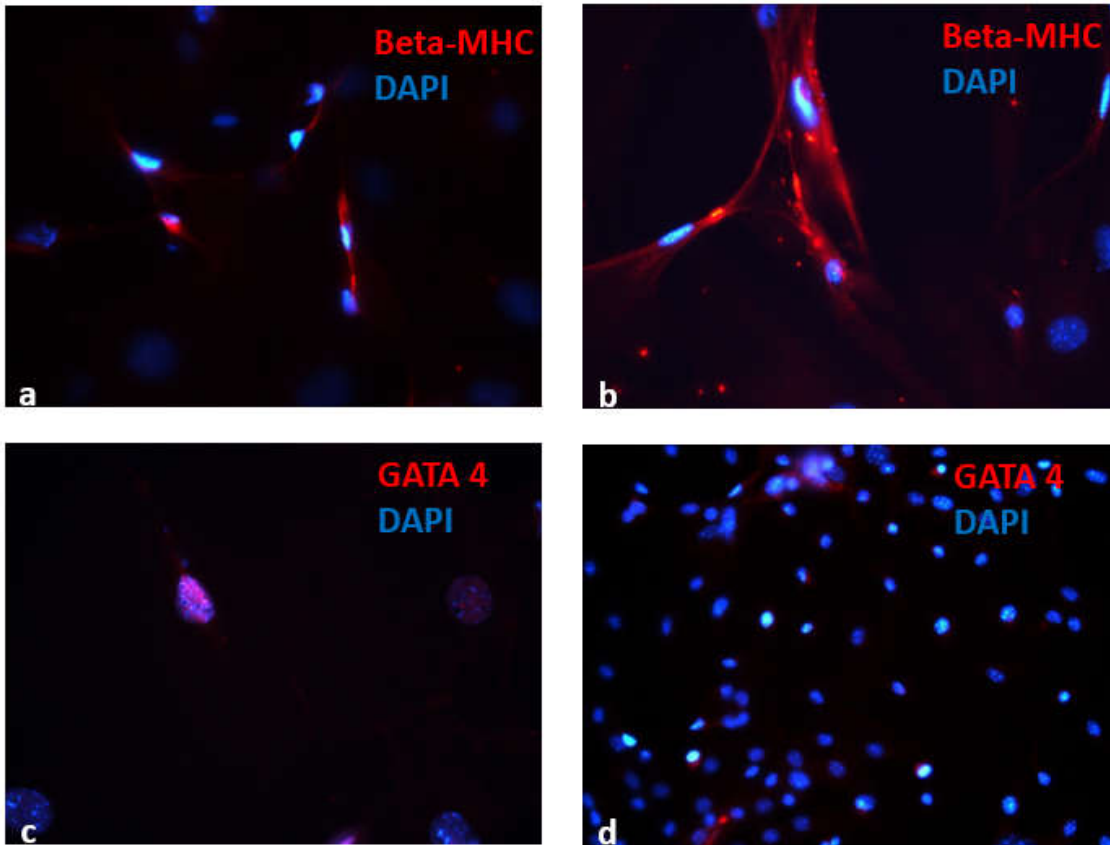


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza. Abb. (a) zeigt Fettstammzellen, die mit 5-aza stimuliert wurden mit nachweisbarem beta-MHC (rot) im Zytoplasma, in den nicht stimulierten Kontrollzellen (b) ist ebenfalls beta-MHC (rot) im Zytoplasma nachweisbar. Abb. (c) zeigt die Expression von GATA4 (rot) in den Zellkernen in den mit 5-aza stimulierten Fettstammzellen. Die Kontrollzellen (d) sind negativ für GATA4. Kernfärbung mit DAPI (blau).

3.2.2. *Ermittlung der optimalen Konzentration der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine für Stimulationsversuche*

Der Dosisfindungsversuch wurde wie im Kapitel 2.3.7.4 beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Proteinlysateverdünnung 1:100 zelltoxisch gewirkt hat, denn die Zellen starben ab, lösten sich von den Schalen und wurden durch Mediumwechsel weggespült. Die Verdünnungen 1:500, 1:1 000 und 1:4 000 zeigten keine Effekte auf die Stammzellen. Es wurden weder morphologische Veränderungen beobachtet, noch zeigten die Fettstammzellen eine Expression kardialer Differenzierungsmarker. Zellen die der Verdünnung 1:250 ausgesetzt waren, zeigten nach 21 Tagen in der immunhistochemischen Färbung eine Expression von GATA4. Die wirksame

Proteinkonzentration in dieser Verdünnung betrug 1,5 µg/ml (Tabelle 12) und wurde für weitere Stimulationsversuche sowohl mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus gesunden Herzen als auch mit Infarktproteinen verwendet.

In der Kontrollgruppe, die zum Ausschluss biologischer Effekte des SDS-Puffers geführt wurde, zeigten sich keinerlei Veränderungen im morphologischen Aussehen der Zellen oder der Expression kardialer Differenzierungsmarker. Der SDS-Puffer, in dem die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine gelöst waren, übte daher keine biologischen Einflüsse auf die untersuchten Stammzellen aus.

3.2.3. **Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen**

Bei der Stimulation der MSC mit den extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen zeigten die behandelten Zellen nach 21 Tagen eine signifikant erhöhte Expression von GATA4 (MV=1,978, SEM=0,1729, $p=0,003$) zur Kontrollgruppe (MV=0,986, SEM=0,0558), Nkx2.5 (MV=2,186, SEM=0,105, $p<0,0001$), zur Kontrollgruppe (MV=1,008, SEM=0,07038), beta-MHC (MV=3,006, SEM=0,68, $p=0,0153$), zur Kontrollgruppe (MV=1,001, SEM=0,0949), Cx43 (MV=2,041, SEM=0,0103, $p=0,0004$), zur Kontrollgruppe (MV=1,298, SEM=0,0786) und Troponin T (MV=1,625, SEM=0,16, $p=0,0448$) zur Kontrollgruppe (MV=1,06, SEM=0,1829).

Die Expression von Mef2c blieb in den behandelten Zellen auf dem Kontrollniveau.

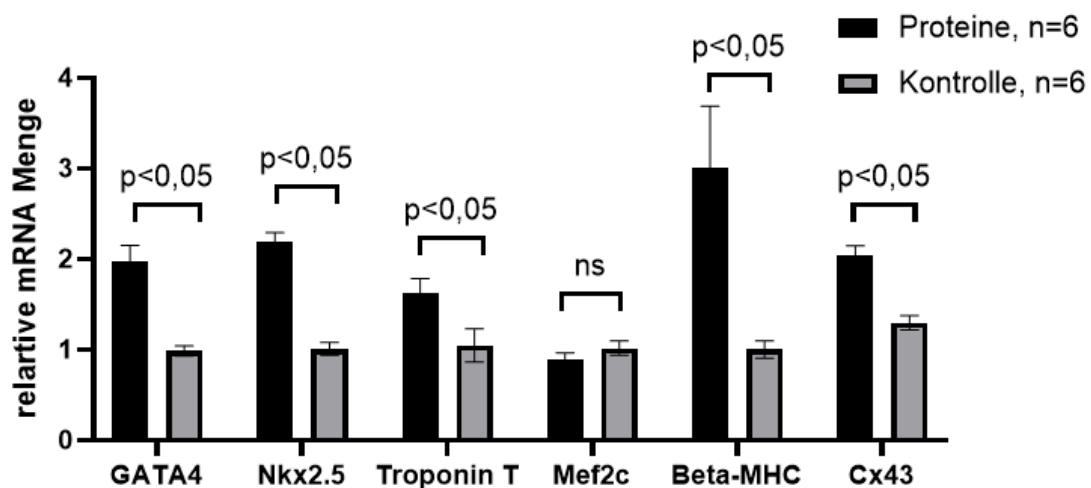


Abbildung 13: qRT-PCR von kardialen Markern in den MSC nach Stimulation mit gesunden extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen (Proteine). Die Expression von beta-MHC, Cx43, Troponin T, Nkx2.5, GATA4 und Mef2c ist als relative

mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. $p < 0.05$, $n = 6$

In den immunhistochemischen Färbungen konnte die Expression von GATA4 und beta-MHC nachgewiesen werden (Abbildung 14). MSCs, die mit „gesunden“ extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen behandelt wurden, exprimierten zu 9% GATA4 und zu 18% beta-MHC.

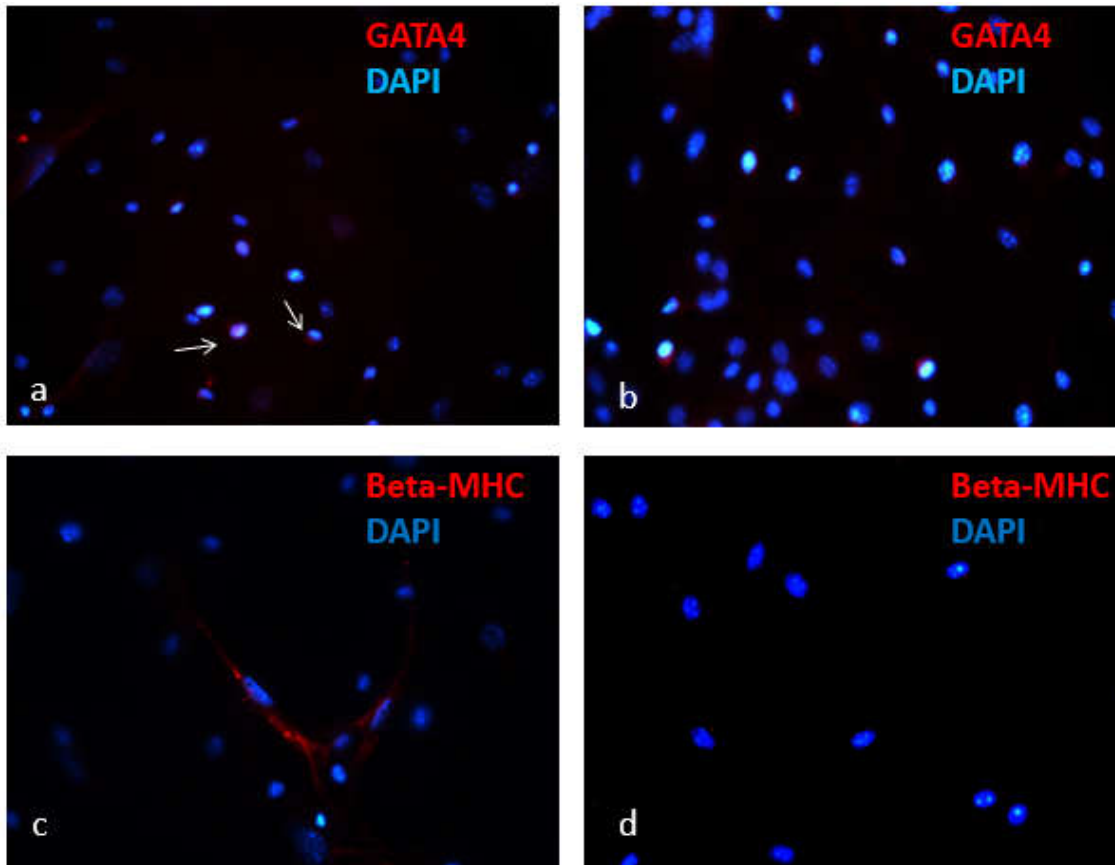


Abbildung 14: Nachweis von GATA4 und beta-MHC in MSCs nach Stimulation mit „gesunden“ extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen. Abb. (a) zeigt für GATA4 positive Zellen (rot). Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle ohne Nachweis von GATA4. Abb. (c) beta-MHC im Zytoplasma stellt sich rot dar. Abb. (d) zeigt die Negativkontrolle ohne Nachweis von beta-MHC. Kernfärbung mit DAPI (blau).

3.2.4. **Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen**

Die Stimulation der Fettstammzellen mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen erfolgte wie in Kapitel 2.3.7.4 beschrieben. Die Stimulationsdauer betrug 21 Tage. Untersucht wurden sechs Proben (n=6). Eine kardiale Differenzierung ließ sich durch den Nachweis der Expression kardialer Differenzierungsmarker mittels qRT-PCR sowie immunhistochemischer Färbung für GATA4 zeigen. Nach 21 Tagen war die Expression von GATA4 (MV=3,051, SEM=0,1485), Cx43 (MV=3,360, SEM=0,3156) und beta-MHC (MV=21,54, SEM=2,595) in den stimulierten Fettstammzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (GATA4: MV=0,9981, SEM=0,5379; Cx43: MV=0,9983, SEM=0,5139; beta-MHC: MV=0,9893, SEM=0,7689) signifikant erhöht (p<0,05). Für die kardialen Transkriptionfaktoren Mef2c (MV=2,246, SEM=0,1332), Nkx2.5 (MV=1,969, SEM=0,3108) sowie Troponin T (MV=1,579, SEM=0,3156) war die Expression in der mit den Oberflächenproteinen behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen tendenziell ebenfalls erhöht, jedoch ohne Signifikanz (Mef2c: MV=1,0300, SEM=0,5455; Nkx2,5: MV=0,0070, SEM=0,4017; Troponin T: MV=1,0010, SEM=0,4980) (p>0,05) (Abbildung 15).

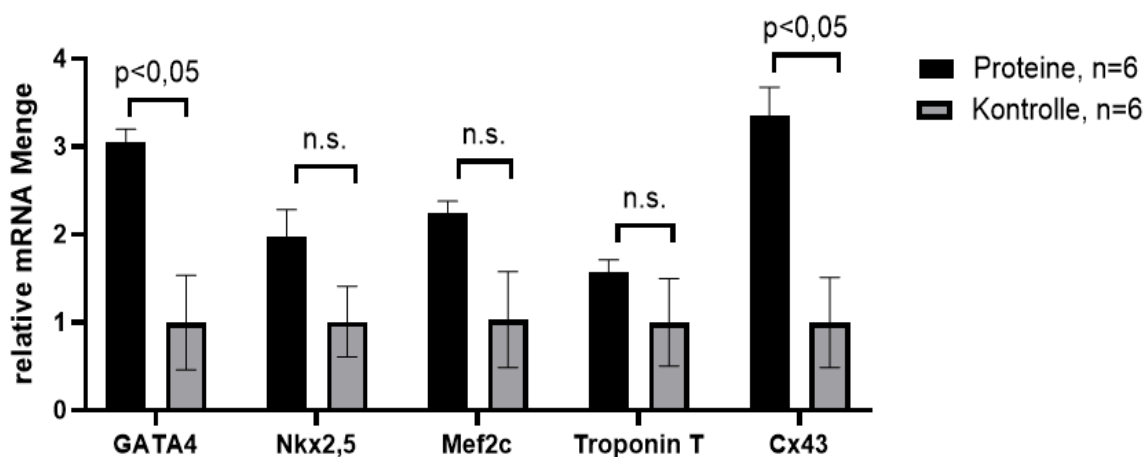


Abbildung 15: qRT-PCR von kardialen Markern in den Fettstammzellen nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen. Die Expression von GATA4, NKx2.5, Mef2c, beta-MHC, Troponin T und Cx43 ist als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. Signifikanz bei p<0,05, n=6

In der immunhistochemischen Färbung konnte die Expression von GATA4 in den Kernen stimulierter Fettstammzellen nachgewiesen werden. Die Auswertung zeigte, dass 34% der Zellen GATA4 exprimierten (Abbildung 16).

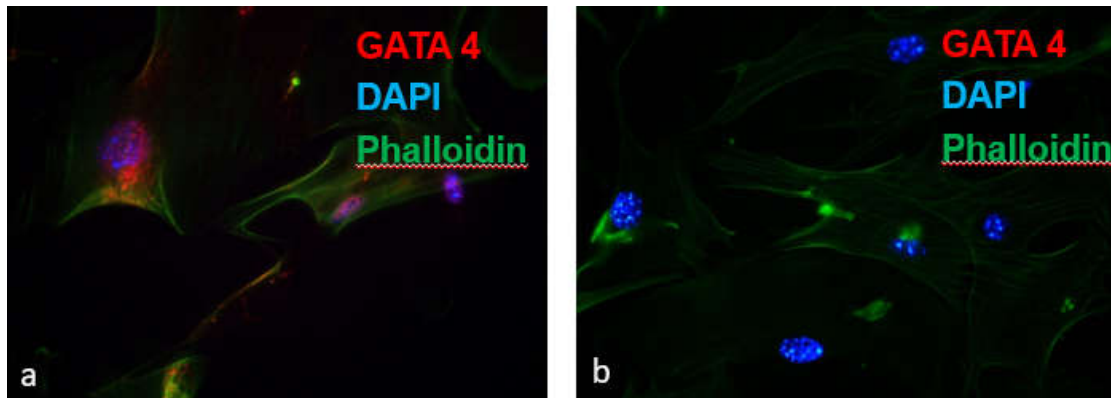


Abbildung 16: Nachweis von GATA4 in den Fettstammzellen nach der Stimulation mit den gesunden extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen. Abb. (a) GATA4 (rot) ist in den Zellkernen stimulierter Fettstammzellen nachweisbar. Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle ohne Expression von GATA4. Kernfärbung mit DAPI (blau). Zytoskelett Färbung mit Phalloidin (grün).

3.2.5. **Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC nach direkter Kokultur mit adulten Kardiomyozyten**

Beim Betrachten der Nativpräparate, während der Kokultur der MSC mit adulten murinen Kardiomyozyten, war aufgefallen, dass die adulten Kardiomyozyten mit der Zeit die Kontraktionen einstellten, sich abrundeten und sich vom Boden der Kulturschalen ablösten. Beim Wechsel des Nährmediums wurden die adulten Kardiomyozyten nach und nach entfernt, so dass nach 21 Tagen nur noch sehr wenige davon vorhanden waren. Die MSCs hingegen zeigten eine mäßige Proliferation.

Die Untersuchung der MSC auf die kardiomyozytäre Differenzierung erfolgte mithilfe der immunhistochemischen Färbung für GATA4 und beta-MHC. Um die differenzierten MSC von den adulten Kardiomyozyten unterscheiden zu können, wurde eine Kofärbung mit dem Stammzellmarker Sca1 durchgeführt.

MSC aus der Kokultur waren zu 10-12% positiv für GATA4 und zu 9% für beta-MHC (Abbildung 17). Die GATA4 und beta-MHC positiven Zellen waren gleichzeitig positiv für Sca1.

In den MSC aus der Negativkontrollgruppe konnten keine für GATA4 und beta-MHC positiven Zellen nachgewiesen werden.

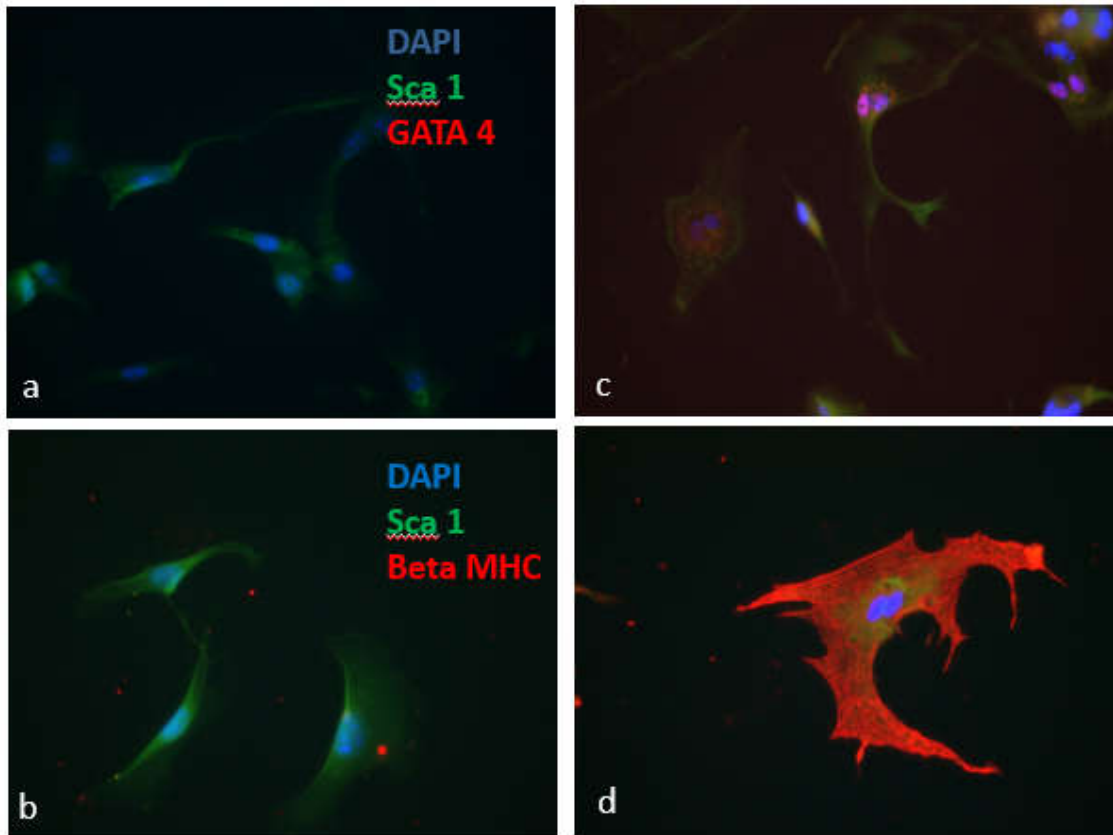


Abbildung 17: Kokultur der MSC mit adulten murinen Kardiomyozyten. Abb. (a) und (b) zeigen MSCs aus der Kontrollgruppe, sie exprimieren den Stammzellmarker Sca1 (grün) und sind negativ für GATA4 und beta-MHC. Abb. (c) und (d) zeigen MSCs, die mit den adulten Kardiomyozyten kokultiviert wurden. Hier exprimieren sie gleichzeitig Sca1 (grün) und GATA4 (rot) (c) bzw. Sca1 (grün) und beta-MHC (rot) (d). Kernfärbung mit DAPI (blau).

3.3. Auswirkung inflammatorischer Stimuli auf die kardiomyozytäre Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen

Um den Einfluss inflammatorischer Stimuli auf die kardiale Differenzierung der MSC zu untersuchen, wurden die mit 5-aza stimulierten MSC mit inflammatorischen Agentien LPS und TNF-alpha behandelt.

Für die Fettstammzellen wurde in der Zellkultur eine inflammatorische Nische nachgeahmt, indem extrazelluläre und plasmamembranständige Proteine aus den infarzierten Herzen in das Kulturmedium gegeben wurden.

3.3.1. **Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC unter dem Einfluss von LPS**

In den Zellen, die dem Einfluss von LPS ausgesetzt waren, zeigte sich im Vergleich zu den Zellen die mit 5-aza stimuliert wurden, eine signifikant niedrigere Expression der reifen kardialen Marker Troponin T (MV=7,893, SEM=1,848 vs. MV=18,01, SEM=2,934) und alpha cardiac actin (MV=206,5, SEM=53,66 vs. MV=892,7, SEM=89,98). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Nkx2,5, Mlc2v und Cx43. Die Expression des frühen kardialen Transkriptionsfaktors GATA4 war in der 5-aza Gruppe signifikant höher als in der 5-aza+LPS-Gruppe (MV=0,5633, SEM=0,03361 vs. MV=0,3191, SEM=0,05681). In der Kontrollgruppe (MV= 0,9409, SEM=0,07621) war die Expression von GATA4 wiederum signifikant höher als in den 5-aza+LPS und 5-aza-Gruppen.

Die Expression des frühen Transkriptionsfaktors Mef2c war in den mit LPS behandelten Zellen (MV=2,113, SEM=0,2791) signifikant niedriger als in der 5-aza Gruppe (MV=3,201, SEM=0,3012).

Weiterhin zeigte sich in den Zellen, die mit LPS behandelt wurden, im Vergleich zu den Kontrollzellen und den nur mit 5-aza behandelten Zellen, eine signifikant erhöhte Expression des Entzündungsmarkers IL6 (5-aza+LPS: MV=0,6456, SEM=0,1508 vs. 5-aza: MV=0,2035, SEM=0,03967 vs. Kontrolle: MV=0,1232, SEM=0,02890) (Abbildung 18).

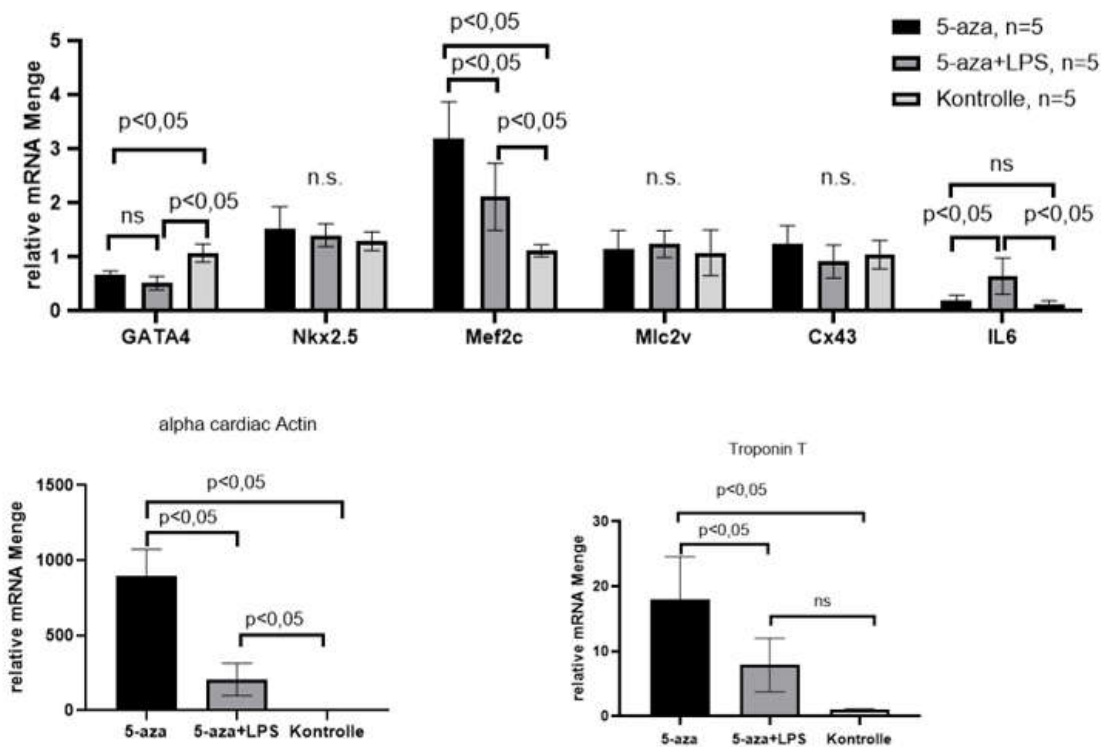


Abbildung 18: qRT-PCR der kardialen Differenzierungsmarker GATA4, Nkx2.5, Mef2c, Mlc2v, alpha cardiac Actin, Troponin T, Cx43 sowie des Entzündungsparameters IL6 in MSCs unter dem Einfluss von LPS. 5-aza = nur mit 5-aza behandelte MSCs, 5-aza+LPS = mit 5-aza und LPS behandelte MSCs. Kontrolle = unbehandelte MSCs. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. Signifikanz bei $p < 0,05$, $n = 5$

In der immunhistologischen Färbung zeigten in der 5-aza+LPS-Gruppe 11% der Zellen eine Expression von Troponin T (Abbildung 19). Die Expression von beta-MHC konnte in dieser Gruppe nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19 c.) In der 5-aza-Gruppe exprimierten 30 % der Zellen Troponin T und 20 % beta-MHC (Abbildung 19 a. und d.). In der Kontrollgruppe exprimierten 8 % der Zellen Troponin T, die Expression von beta-MHC konnte nicht nachgewiesen werden.

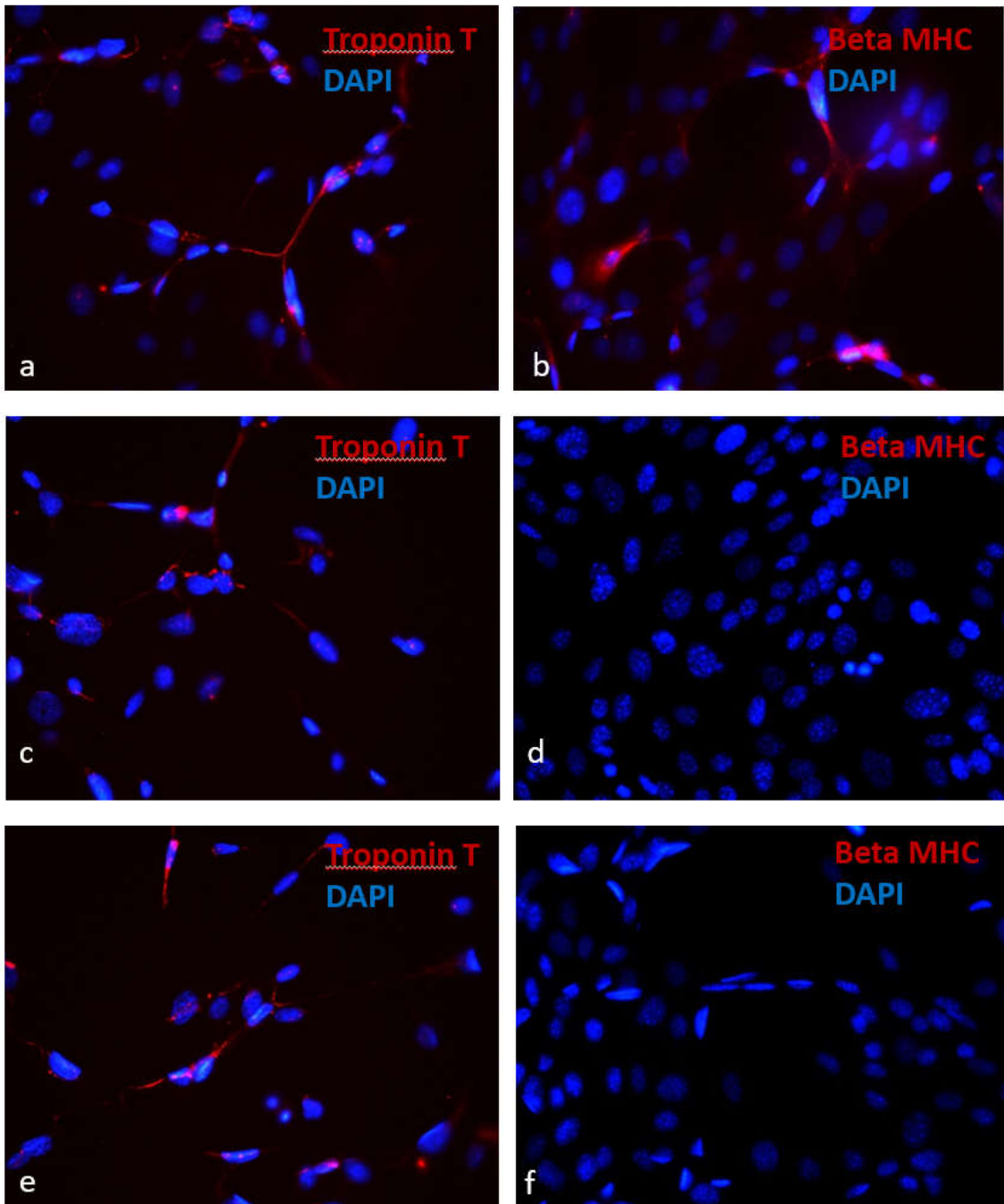


Abbildung 19: Expression von Troponin T und beta-MHC in MSC nach Stimulation mit 5-aza und LPS: immunhistologische Färbung. Abb. (a) und (b) zeigen MSCs, die mit 5-aza stimuliert wurden, hier exprimierten die Zellen zu 30% Troponin T (Abb. (a) rot) und zu 20% beta-MHC (Abb. (b) rot). In Abb. (c) und (d) sind die Zellen abgebildet, die zusätzlich zu 5-aza mit LPS behandelt wurden, sie exprimierten zu 11% Troponin T (Abb. (c)), die Expression von beta-MHC konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. (d)). Abb. (e) und (f) zeigen die Negativkontrolle, hier exprimieren ca. 8% der Zellen Troponin T (e), beta-MHC wird nicht exprimiert (f).

3.3.2. **Kardiomyozytäre Differenzierung der MSC unter dem Einfluss von TNF-alpha**

Die mit 5-aza und TNF-alpha behandelten MSC zeigten im Vergleich zu den nur mit 5-aza behandelten Zellen eine signifikant niedrigere Expression der frühen Transkriptionsfaktoren GATA4 (MV=0,7699, SEM=0,046 vs. MV=0,3842, SEM=0,0170) und Mef2c (MV=3,9460, SEM=0,346 vs. MV=2,355, SEM=0,3015). Die Expression von GATA4 in der Kontrollgruppe war im Vergleich zu 5-aza- und 5-aza+TNF-alpha-Gruppen signifikant erhöht (MV=1,2100, SEM=0,1254).

Die Expression der reifen Differenzierungsmarker Beta-MHC und alpha cardiac Actin war sowohl in der 5-aza- als auch in der 5-aza+TNF-alpha-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Expression von Beta-MHC und alpha cardiac Actin in der 5-aza+TNF-alpha-Gruppe war signifikant niedriger als in der 5-aza-Gruppe. (Beta-MHC: MV=1,2600, SEM=0,0700 in 5-aza-Gruppe vs. MV=0,4288, SEM=0,637 in 5-aza+TNF-alpha-Gruppe; alpha cardiac Actin: MV=0,9703, SEM=0,0800 in 5-aza Gruppe vs. MV=0,2577, SEM=0,0421 in 5-aza+TNF-alpha-Gruppe). Die Expression von Troponin T in der Kontrollgruppe (MV=1,331, SEM=0,1435) war im Vergleich zu 5-aza- und 5-aza+TNF-alpha-Gruppe signifikant erhöht. Zwischen den 5-aza- und 5-aza+TNF-alpha-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von Troponin T (MV=0,8627, SEM=0,0702 in 5-aza-Gruppe; MV=0,8144, SEM=0,1056 in 5-aza+TNF-alpha-Gruppe).

Die Expression von Mlc2v war in der 5-aza-Gruppen (MV=1,499, SEM=0,2070 in 5-aza Gruppe; MV=1,029, SEM=0,0580 in 5-aza+TNF-alpha-Gruppe) im Vergleich zu Kontrolle (MV=0,5042, SEM=0,06990) signifikant erhöht, in der 5-aza+TNF gruppe war die vermehrte Expression ohne Signifikanz. In der 5-aza+TNF-alpha-Gruppe war die Expression von Mlc2v niedriger als in der 5-aza-Gruppe, jedoch ohne Signifikanz (Abbildung 20).

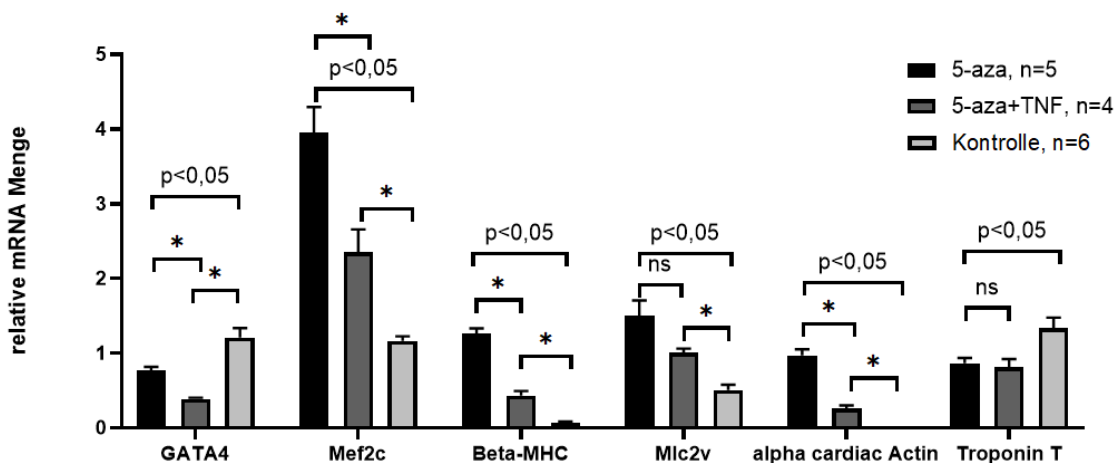


Abbildung 20: qRT-PCR für Expression kardialer Differenzierungsmarker in den mit 5-aza stimulierten MSC unter dem Einfluss von TNF-alpha (5-aza+TNF) im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) und zu den nur mit 5-aza stimulierten MSC. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM; ns= nicht signifikant; * p<0,05.

3.3.3. Kardiomyozytäre Differenzierung der Fettstammzellen unter dem Einfluss extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine aus den infarzierten Herzen

In diesem Versuch stellten die aus den infarzierten Herzen gewonnenen extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine (Infarktproteine) einen inflammatorischen Stimulus in der Zellkultur dar. Proteine, die aus den gesunden murinen Herzen gewonnen wurden (Gesundproteine), simulierten eine physiologische Nische (siehe Kapitel 3.2.4).

Die Expression der frühen kardialen Differenzierungsmarker GATA4 (MV=0,8624, SEM=0,07216) und Nkx2.5 (MV=1,2200, SEM=0,05297) sowie der reifen kardialen Differenzierungsmarker beta-MHC (MV=1,1060, SEM=0,05544) und Troponin T (MV=1,0160, SEM=0,08750) in den mit Infarktproteinen behandelten Fettstammzellen blieb im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen aus der Kontrollgruppe unverändert. Hingegen war die Expression dieser Marker in den Fettstammzellen, die mit Gesundproteinen stimuliert wurden, signifikant erhöht (GATA4: MV=1,9780, SEM=0,1729; Nkx2,5: MV=2,1860, SEM=0,1050; beta-MHC: MV=3,006, SEM=0,68030; Troponin T: MV=1,6250, SEM=0,16040). Die Expression von Mef2c blieb in allen Gruppen auf dem gleichen Niveau.

Die Expression von Cx43 war in beiden Gruppen im Vergleich zur Kontrolle (MV=0.9750, SEM=0,03348) signifikant erhöht, in der Infarktprotein-Gruppe (MV=1.2990, SEM=0,04119) jedoch signifikant niedriger als in der Gesundprotein-Gruppe (MV=2,041, SEM=0.1033).

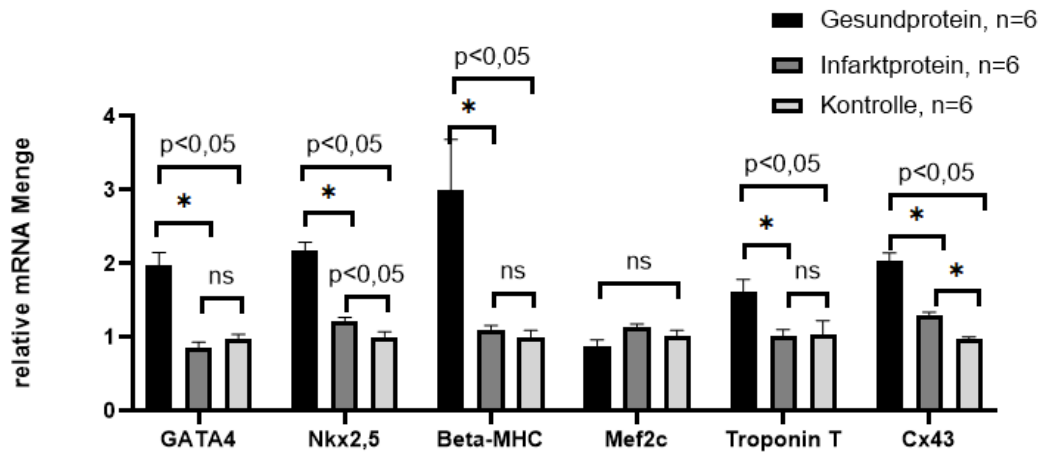


Abbildung 21: qRT-PCR kardialer Differenzierungsmarker in den Fettstammzellen unter dem Einfluss von Gesundproteinen und Infarktproteinen im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. Signifikanz bei $p < 0.05$; *= $p < 0.05$; ns=nicht signifikant, n (gesamt)=18: Gesundprotein=6, Infarktprotein=6, Kontrolle=6.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass eine inflammatorische Nische die kardiale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen deutlich beeinträchtigt. Dieses Erkenntnis könnte für die weitere Erforschung der Stammzelltherapie eines Herzinfarktes aufgegriffen werden. Nachdem die Anfänge dieser Therapie sehr vielversprechend waren, haben die aktuellen Studien keinen eindeutigen Mehrwert zeigen können. Die Vorstellung ein Herz nach dem Infarkt heilen zu können sollte jedoch Antrieb für weitere Untersuchungen sein. Weitere Studien könnten zum einen darauf gerichtet sein, die kardiale Differenzierung störende Faktoren genauer zu identifizieren. Zum anderen könnte ein weiterer Ansatzpunkt für die Forschung eine Modulation der Inflammation sein, was zu einer besseren Differenzierung der injizierten Stammzellen führen könnte.

Für die Durchführung dieser Arbeit, und um die Fragestellung zu beantworten, war es notwendig einige Methoden zu etablieren. Es wurden mesenchymale Stammzellen in einem Zellkulturmodell zunächst auf die kardiomyozytäre Plastizität untersucht. Wir starteten mit der Isolation der Fettstammzellen - einer vielversprechenden Art der mesenchymalen Stammzellen. Die Fettstammzellen lassen sich theoretisch einfach und in großer Menge im Labor isolieren, sind somit potentiell kostengünstig und in großer Zahl verfügbar. In der Praxis mussten wir feststellen, dass sich die einzelnen Isolationen von der Qualität deutlich voneinander unterschieden. Zudem war für jede Isolation die Überprüfung des Stammzellcharakters notwendig, denn bevor wir die kardialen Differenzierungsversuche starten konnten, mussten wir sicher sein, dass die Zellen tatsächlich differenzierungsfähig waren. Dadurch war das gesamte Procedere sehr zeitaufwendig. Als Folge wurde entschieden, ein Teil der Versuche mit den kommerziell erworbenen MSC durchzuführen, um die Arbeitsschritte zur Testung des Stammzellcharakters einzusparen. Entsprechend konnten nicht alle Versuche mit beiden Zellarten in gleicher Weise durchgeführt werden.

Die generelle kardiomyozytäre Plastizität beider Zellarten wurde einerseits durch die Stimulation mit einer demethylierenden Substanz (5-aza) überprüft, andererseits durch die Simulation einer kardialen Differenzierungsnische in der Zellkultur.

Die kardiale Differenzierungsnische wurde durch die Zugabe der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine aus gesunden Herzen zum Nährmedium simuliert. Ein weiterer Ansatz eine kardiale Differenzierungsnische herzustellen war eine direkte Kokultur mit adulten murinen Kardiomyozyten.

Für die Simulation einer inflammatorischen Nische wurden dem Nährmedium die inflammatorischen Stimuli LPS bzw. TNF-alpha zugegeben, ebenso aus den infarzierten Herzen isolierte extrazelluläre und plasmamembranständige Proteine.

4.1. Isolation adulter Kardiomyozyten

Sowohl die Kokultur mit den adulten Kardiomyozyten als auch die Stimulationsversuche mit den extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen sollten eine gesunde physiologische kardiale Differenzierungsnische für die mesenchymalen Stammzellen nachahmen. Eine Methode zur möglichst schonenden Isolation von vitalen und unbeschädigten Kardiomyozyten aus den murinen Herzen war erforderlich. Basierend auf dem Protokoll von Ren und Wold wurde eine solche Methode etabliert (Kapitel 2.3.6). Zur Unterbrechung der Zell-Zell-Kontakte am Glanzstreifen, wurden die murinen Herzen über die Koronargefäße mit einer zunächst Ca^{2+} -freien Lösung perfundiert (Louch et al., 2011). Durch anschließende Perfusion mit einer Kollagenaselösung mit geringem Kalziumgehalt wurde die extrazelluläre Matrix aufgelöst und die Herzmuskelzellen fielen auseinander. Zur Wiederherstellung der Kalziumhomöostase und Vermeidung einer irreversiblen Depolarisation der Herzmuskelzellen erfolgte im Anschluss eine langsame Erhöhung der Kalziumkonzentration (Louch et al., 2011).

Für die Beurteilung der Qualität der Isolationen, wurden von Ren und Wold etablierte Kriterien herangezogen. Die Form der isolierten Kardiomyozyten sollte „dachziegelartig“ sein (sog. *rodshaped*), und der Anteil der *rodshaped* Kardiomyozyten bei 70-80% liegen (Ren & Wold, 2001). Nach unserer Berechnung lag der Anteil an *rodshaped* Kardiomyozyten bei 15-20%, dies jedoch auf die Gesamtzellzahl bezogen. Wenn wir berücksichtigen, dass das Herz nur zu 20% aus den Kardiomyozyten und zu 80% aus anderen Zellarten wie Fibroblasten, Neuronen und endothelialen Zellen besteht (Jacobson & Piper, 1986), entspricht dieser Ertrag den Anforderungen.

Ein Vorteil der Methode bestand auch darin, dass nicht nur die Kardiomyozyten, sondern auch andere zelluläre Bestandteile des Herzgewebes schonend isoliert werden konnten, sodass die nachfolgend isolierten Proteine annähernd das *in vivo* Spektrum umfassten (Jacobson & Piper, 1986). Dies stellte aus theoretischer Sicht eine gute Voraussetzung für das Nachahmen einer kardialen Differenzierungsnische dar.

4.2. Isolation der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine zur Simulation einer physiologischen kardialen Differenzierungsnische

Die Isolation der Proteine erfolgte aus den zuvor frisch isolierten adulten Kardiomyozyten mithilfe eines kommerziell erworbenen Pierce™ Cell Surface Proteine Isolation Kits. Das Prinzip der Isolationsmethode beruhte auf der Biotinilierung und anschließender Eluation aller mit Biotin markierten Proteine. Somit wurden alle plasmamembranständigen und freien extrazellulären Proteine erfasst. Dabei wurden nicht nur bestimmte Proteine isoliert, sondern die Gesamtheit der extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine. Es konnte ein Proteingemisch gewonnen werden, dem eine Stammzelle, die *in vivo* in das Herz gelangt, auch exponiert wäre.

Um eine Verunreinigung mit den intrazellulären Proteinen auszuschließen, wurden die extrahierten Proteine mittels Western-Blot-Analyse auf intrazelluläre und extrazelluläre Bestandteile untersucht. Als Marker für die Verunreinigung mit intrazellulären Proteinen wurde Troponin T gewählt, ein Protein des kontraktiven Apparates, das ausschließlich intrazellulär vorkommt. Alle Proben, die Troponin T aufwiesen wurden für die Stimulationsversuche nicht verwendet, denn das Vorhandensein der intrazellulären Proteine (wobei Troponin T nur eines von vielen ist) würde am ehesten eine inflammatorische Nische simulieren.

Proben, die frei von intrazellulären Proteinen waren, wurden gepoolt, womit ausgeschlossen werden konnte, dass unterschiedliche Isolationen, unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen und unterschiedliche Effekte hervorrufen.

Ein wesentliches Problem bei der Gewinnung dieses, für die nachfolgenden Versuche notwendigen Proteingemisches, war die geringe Menge an gewonnenem Protein. Pro Isolation betrug sie 5,7 µg bis 188,5 µg. Auch wiesen einige Proben eine Verunreinigung mit intrazellulären Proteinen auf und konnten nicht verwendet werden. Somit waren die nachfolgenden Versuche in ihrer Anzahl limitiert. Die Methode, stellte sich als sehr zeit- und kostenintensiv dar.

Außerdem war bei der Verwendung der Proteingemische für die Stimulationsversuche zu bedenken, dass die Proteine in SDS-Puffer gelöst waren, und auch nur in dieser Lösung dem Nährmedium zugegeben werden konnten. Es war also wichtig, mögliche biologische Einflüsse von SDS auszuschließen. Die zu diesem Zweck durchgeführten Versuche konnten diese Bedenken jedoch ausräumen (Kapitel 3.2.2) – es zeigten sich keine Hinweise für biologische Effekte des SDS.

4.3. Isolation der Fettstammzellen

Unsere anfängliche Motivation, primär die Fettstammzellen in dem Versuchsvorhaben zu verwenden, beruhte darauf, dass sie sich, im Gegensatz zu den mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, in viel größeren Mengen gewinnen lassen könnten. Wenn man bedenkt, dass nach einem Myokardinfarkt bis zu 1,5 Billionen Kardiomyozyten zugrunde gehen (Paul et al., 2009) und eine kurative Therapie diese Zahl an Kardiomyozyten wiederherstellen sollte, und zudem nur ein Teil an injizierten Stammzellen das Zielorgan erreicht, wäre eine möglichst große Zahl an zur kardialen Differenzierung fähigen, transplantierten Zellen von Vorteil.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Isolation von Fettstammzellen wurde von Rodbell et al. beschrieben. Die nach Verdau mit Kollagenase isolierte Zellpopulation wird als „Stromal vascular Fraction“ bezeichnet und stellt eine sehr heterogene Zellpopulation dar. Sie beinhaltet multipotente Fettstammzellen, aber auch zirkulierende Blutzellen, wie Leukozyten, hämatopoetischen Stammzellen, Fibroblasten, Perizyten, Endothelzellen und auch Präadipozyten (Locke et al., 2009). Die Selektion der Fettstammzellen erfolgte durch Zentrifugationsschritte und Adhärenz dieser Zellen zu den Zellkulturschalen (Locke et al., 2009).

Der Stammzellcharakter wurde anhand der Kriterien der International Society for Cellular Therapy überprüft. Eines dieser Kriterien ist Adhärenz zu Plastik. Das zweite Kriterium ist ein multilineares Differenzierungspotential. Das Differenzierungspotential wurde anhand der Differenzierungsstudien zu Osteoblasten und Adipozyten untersucht (30). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die von uns isolierten Fettstammzellen diese Kriterien erfüllten – sie waren adhärent und differenzierungsfähig.

Das dritte Kriterium ist die Expression spezifischer Oberflächenantigene. Die International society for cellular Therapy bestimmte CD90, CD73 und CD105 als spezifisch für Fettstammzellen, dabei sollten mehr als 90% der Zellen diese Oberflächenantigene aufweisen (Dominici et al., 2006). Laut unserer FACS-Analyse waren nur 4,9% der isolierten Zellen positiv für alle drei Marker. Das hätte bedeutet, dass nur 4,9% der Zellen tatsächlich Stammzellcharakter aufwiesen. Dies steht aber im Widerspruch zu unseren Differenzierungsstudien. Hier konnten mindestens 40% der Zellen zu adipogenen und 27% zu osteogenen Linien differenziert werden.

Auch vielen Experten zufolge scheint die Definition des Stammzellcharakters anhand der Oberflächenmarker generell schwierig zu sein. Grund ist, dass in der Zellkultur die Oberflächenmarker permanent hoch- und runterreguliert werden. So zeigten Mitchell et

al., dass die frisch isolierten Fettstammzellen nur zu 5 bis 54% CD73, CD90 und CD73 exprimieren (Mitchell et al., 2006) und dass die Expression dieser stammzelldefinierenden Marker nach einigen Passagen steigt (Mitchell et al., 2006). Es gibt aber auch Literaturquellen, die zeigen, dass die Stammzellen mit höheren Passagen Differenzierungseigenschaften verlieren könnten oder sich bereits spontan differenzieren (Anjos-Afonso & Bonnet, 2011).

Aufgrund dieser uneinheitlichen Literaturangaben zu den stammzelldefinierenden Oberflächenantigenen wurde für diese Arbeit der Stammzellcharakter anhand der Differenzierungsstudien zu adipogenen und osteogenen Linien und der Adhärenz zu Plastik festgelegt (Mosna et al., 2010) und die Zellen der gleichen Linie und Passage direkt für die kardialen Differenzierungsversuche verwendet. Im weiteren Verlauf haben wir, aufgrund des sehr zeitaufwendigen Verfahrens, mit kommerziell erworbenen MSCs gearbeitet.

4.4. Kardiomyozytäre Plastizität der MSC und der Fettstammzellen

Um den Einfluss der inflammatorischen Stimuli auf das kardiomyozytäre Differenzierungspotential in unserem Zellkulturmodell beurteilen zu können, sollte zunächst gezeigt werden, dass MSC und Fettstammzellen generell über ein solches Differenzierungspotential verfügen.

Die erfolgreiche Induktion kardialer Differenzierung mit 5-aza ist in der Literatur mehrfach beschrieben (Dijk et al., 2008; Rangappa et al., 2003; Vassalli & Moccetti, 2011), sodass wir zunächst diese Methode zum Nachweis kardiomyozytärer Plastizität verwendeten.

In den Fettstammzellen führte die Stimulation mit 5-aza zu einem signifikanten Anstieg der Expression der frühen kardiomyozytären Marker wie GATA 4 und Mef2c, nicht jedoch Nkx 2,5. Bei einem natürlichen Prozess kardialer Ausdifferenzierung sind die frühen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 von großer Bedeutung, denn sie aktivieren weitere für die kardiale Differenzierung notwendige Gene (Rangappa et al., 2003). Die fehlende Expression von Nkx2,5 könnte durch den Wirkmechanismus von 5-aza erklärt werden. 5-aza ist eine demethylierende Substanz und wirkt auf epigenetischer Ebene durch die Veränderung des Methylierungszustandes der DNA (Zingg & Jones, 1997). So könnten die Demethylierungsprozesse direkt zur Expression von reifen kardialen Markern führen, ohne die sonst dafür notwendigen frühen Transkriptionsfaktoren zu involvieren.

Die Expression reifer kardialer Marker wie Troponin T und Cx43 war wiederum signifikant erhöht, was dafür sprechen könnte, dass die Zellen Gap junctions ausbilden, was auf

Ca²⁺ Austausch und Funktionalität hinweist. Eine solche Annahme bleibt jedoch spekulativ, weil wir die Gap junctions in dieser Konstellation nicht sehen konnten.

Die Expression von beta-MHC war nicht signifikant erhöht. In den immunhistochemischen Färbungen konnten jedoch für beta-MHC positive Zellen nachgewiesen werden.

Wir beobachteten also in der mit 5-aza stimulierten Zellen im Vergleich zu Kontrolle eine deutliche Expression und auch histochemische Nachweisbarkeit für die Kardiomyozyten spezifischen Marker und Proteine. Entsprechend ließ sich nach Stimulation mit 5-aza ein kardiales Differenzierungspotential der in dieser Arbeit verwendeten Fettstammzellen feststellen. Von einer kardialen Differenzierung können wir leider nicht sprechen, dafür war die morphologische Differenzierung nicht eindeutig genug nachzuweisen.

In vivo sind Stammzellen, die in eine kardiale Nische gebracht werden, nicht nur den plasmamembranständigen und extrazellulären Proteinen ausgesetzt, sondern auch den mechanischen Reizen, die durch Kontraktionen entstehen. Um eine solche Nische in der Zellkultur nachzuahmen, führten wir die Kokultur-Versuche mit adulten Kardiomyozyten durch. In den Kokultur-Versuchen mit den neonatalen Kardiomyozyten einer Ratte konnte bereits eine kardiale Differenzierung beschrieben werden (Choi et al., 2010). Kokultur-Versuche mit adulten murinen Kardiomyozyten wurden bisher in der Literatur wenig beschrieben, denn die Durchführung solcher Versuche hat sich als problematisch dargestellt. Unser Versuch hat gezeigt, dass adulte murine Kardiomyozyten nicht sehr lange in einer Kultur überleben. Die Kontraktionen wurden nach drei bis sechs Tagen eingestellt, die Zellen rundeten sich ab und lösten sich von den Versuchsschalen. Es liegt nahe, dass durch das Absterben der Kardiomyozyten ein Milieu erzeugt wurde, das nicht einer physiologischen Differenzierungsnische entsprach, sondern eher einem Zustand wie nach einem Infarkt. So musste die initiale Vorstellung, dass mit einem Kokultur-Versuch eine gesunde Differenzierungsnische nachgeahmt wird, verworfen werden, vielmehr wurde eine inflammatorische Nische simuliert. Wie die immunhistochemischen Färbungen gezeigt haben, waren 9-12% der Stammzellen trotz des inflammatorischen Niveaus positiv für kardiale Differenzierungsmarker. Wir beobachteten, dass der Kontakt zu den adulten Kardiomyozyten eine kardiomyozytäre Differenzierung hervorruft, können allerdings keine Aussage dazu treffen, welche Rolle die inflammatorische Komponente spielt. Die Haupteckkenntnis aus dem Versuch war, dass unsere MSC über ein kardiales Differenzierungspotential verfügten. Auf die molekulargenetische Untersuchung haben wir in diesem Fall verzichtet, da die Stammzellen nicht von den Kardiomyozyten getrennt werden konnten.

Zwar konnten wir durch den Kokultur-Versuch keine "gesunde" kardiale Differenzierungsnische simulieren, konnten aber auch unter diesen Bedingungen ein kardiales Differenzierungspotential der MSC zeigen.

Der Nachweis, dass unsere MSCs grundsätzlich zu kardialer Differenzierung fähig sind, war für die nachfolgenden Versuche grundlegend wichtig. Denn um die eigentliche Frage des Projekts zu beantworten, wollten wir untersuchen, ob die MSCs unterschiedlich auf die Proteinextrakte aus gesunden Herzen und aus infarzierten Herzen reagieren.

Eine Induktion kardialer Differenzierung in den Stammzellen mithilfe von Proteinextrakten wurde bereits in der Literatur beschrieben. Gaustad et al. haben mit Streptolysin O permeabilisierte humane Fettstammzellen mit Proteinextrakten aus Rattenkardiomyozyten behandelt und dadurch eine kardiale Differenzierung erzielt (Gaustad et al., 2004). Dieser Ansatz zeigte, dass ein unbekannter Bestandteil dieses Proteingemisches eine Rolle für die Induktion der kardialen Differenzierung spielt. Da die Stammzellen zuvor permeabilisiert wurden, konnte nicht unterschieden werden, ob die Wirkung auf der Ebene der Plasmamembranrezeptoren oder über den direkten Einfluss auf die DNA eintritt.

In vivo sind die Stammzellen, die in das Herz gelangen im Normalfall intakt und den extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen ausgesetzt. Wir simulierten eine kardiale Differenzierungsnische, indem wir die extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine, die aus den gesunden murinen Herzen isoliert wurden, in die Zellkultur gaben. Zu bedenken ist, dass wir zwar von einer Differenzierungsnische in der Zellkultur sprechen, uns aber im Klaren sind, dass diese niemals vollständig sein kann. Wir fügten nur die isolierten Proteine hinzu und berücksichtigen andere Faktoren wie die Phospholipide, Membranbestandteile, Wachstumsfaktoren etc. nicht. Auch kannten wir die Zusammensetzung des Proteingemisches nicht. Die Zusammensetzung war allerdings für uns nicht entscheidend, denn eine Differenzierungsnische ist als Zusammenspiel mehrerer Faktoren, oder in unserem Fall mehrerer Proteine, zu sehen. Weiterhin war die Auswahl der verwendeten Proteinkonzentration willkürlich gewählt. Wir haben zwar eine Verdünnungsreihe hergestellt, um eine wirksame bzw. toxische Konzentration zu bestimmen, konnten diese aufgrund einer limitierten Menge zur Verfügung stehenden Proteingemisches jedoch nicht fortführen. Ob eine Proteinmenge zwischen den wirksamen 1,5 µg/ml und den toxischen 3,89 µg/ml ein schöneres Ergebnis bezüglich der Differenzierung erzielt hätte, können wir so nicht beurteilen, wobei die Zelltoxizität am ehesten durch den enthaltenen SDS-Puffer zu erklären war. Die Menge an SDS konnten wir leider methodenbedingt nicht beeinflussen.

Sowohl die Fettstammzellen als auch die MSCs, wurden in der Zellkultur unter dem Einfluss extrazellulärer und plasmamembranständiger Proteine kultiviert und exprimierten nach 21 Tagen sowohl die Transkriptionsfaktoren früher Kardiogenese (GATA4 und Nkx2.5), als auch die reiferen Marker Troponin T, beta-MHC und Cx43. Die Expression dieser Marker in den Zellen der Kontrollgruppe war signifikant geringer, somit können wir annehmen, dass sich unter dem Einfluss der kardialen Proteine kultivierten Stammzellen auf dem Weg der kardialen Differenzierung befanden. Von einer kardialen Ausdifferenzierung sprechen wir an dieser Stelle nicht, da die morphologischen Beweise hierfür fehlen. Die Tendenz, dass das Vorhandensein kardialer Stimuli eine kardiale Differenzierung anstößt, war für uns entscheidend. In der Literatur wird zum Teil sogar das Auftreten schlagender Zellverbände und somit die Entstehung eines funktionellen Zellverbandes beschrieben (Choi et al., 2010). Solche Kontraktionen konnten wir nicht beobachten.

Zusammenfassend haben die oben diskutierten Versuche für uns wichtige Erkenntnisse gebracht. Wir haben gezeigt, dass die mesenchymalen Stammzellen, die wir für unsere Versuche verwendeten, über ein kardiales Differenzierungspotential verfügten und dass die Zugabe der isolierten plasmamembranständigen und intrazellulären Proteine aus den gesunden murinen Herzen zum Kulturmedium eine kardiale Differenzierung der Stammzellen anstößt.

Eine Kokultur mit adulten Kardiomyozyten entsprach eher einer inflammatorischen Nische, aber auch unter diesen Bedingungen kultivierte Stammzellen zeigten die Expression kardialer Marker, weshalb wir hier ein Potential zur kardialen Differenzierung annehmen.

4.5. Auswirkung inflammatorischer Stimuli auf das kardiomyozytäre Differenzierungspotential der Stammzellen

Wir simulierten die Inflammation in der Zellkultur, indem wir potente inflammatorische Stimuli zugaben.

Lipopolysaccharide (LPS) sind strukturelle Bestandteile der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien und stellen sehr potente inflammatorische Stimuli dar. In vivo werden LPS bei der Lyse der Bakterien bzw. bei der Zellteilung freigesetzt und lösen eine Reihe von inflammatorischen Reaktionen aus. Es kommt zur Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen und alternativen Weg, lysosomale Granula werden von neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Es kommt zur Aktivierung von

Monozyten und Makrophagen, mit vermehrter Bildung von lysosomalen Enzymen sowie einer Sekretion von Mediatoren, wie TNF-alpha, Interleukin-1 und colony stimulating factor (CSF). Daneben kommt es zur Stimulation der Leukozytopoese und Aktivierung des Kinin- und Gerinnungssystems (Böcker, 2012).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass in Anwesenheit von LPS die Expression kardialer Differenzierungsmarker in Stammzellen deutlich geringer ausgeprägt war, als bei alleiniger Stimulation mit 5-aza. So exprimierten in der 5-aza+LPS-Gruppe nur 11% der Zellen Troponin T, in der 5-aza Gruppe waren es 30 %. Wenn man die Expression einzelner Marker betrachtet, fällt auf, dass die frühen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 bei den 5-aza- und 5-aza+LPS-Gruppen auf gleichem Niveau blieb. Hier kann die Wirkungsweise von 5-aza ursächlich sein und die Demethylierung zu einer direkten Expression reifer kardialer Marker führen. In der Kontrollgruppe war GATA4 sogar signifikant stärker exprimiert (Abbildung 18). Nach einem Infarkt ist LPS jedoch normalerweise nicht in das Inflammationsgeschehen involviert, es stimuliert jedoch unter anderem die Sekretion von TNF-alpha, was wiederum eine wichtige Rolle bei den Entzündungsreaktionen nach einem Infarkt spielt.

Auch die direkte Zugabe von TNF-alpha zu den zuvor mit 5-aza behandelten Zellen führte dazu, dass die kardiale Differenzierung deutlich weniger ausgeprägt war (Kapitel 3.3.2). Die Expression aller untersuchter kardialer Differenzierungsmarker war in der 5-aza Gruppe im Vergleich zu der 5-aza+ TNF-alpha-Gruppe erhöht.

Es fiel auch auf, dass die Expression von GATA4 und Troponin T in den unbehandelten Zellen signifikant höher war als in der 5-aza- und 5-aza+TNF-alpha-Gruppe (siehe Abb. 24) Eine Erklärung dafür könnte eine spontane Differenzierung der unbehandelten Zellen sein. Solch eine spontane kardiale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen ist mehrfach in der Literatur beschrieben (Planat-Benard, 2004; Planat-Bénard et al., 2004). Dass die weiteren Differenzierungsmarker wie Mef2c, beta-MHC und Mlc2v in den Kontrollzellen nicht erhöht waren, spricht wahrscheinlich für eine sehr frühe spontane Differenzierung, denn GATA4 gilt als wichtiger Transkriptionsfaktor für die frühe Kardiogenese.

Ob die unbehandelten MSC sich spontan auch zu anderen Zellreihen differenzieren, haben wir nicht untersucht, denkbar wäre das. Auch die MSC aus den 5-aza und 5-aza +TNF-alpha-Gruppen könnten potentiell auch andere als nur kardiale Differenzierungsmerkmale aufwiesen, zum Beispiel die der Gefäßzellen oder der Bindegewebe. Vermutlich könnte eine längere Verweildauer in der Zellkultur und weitere Untersuchungen der Differenzierung genauere Erkenntnisse liefern.

Natürlich haben die Versuche und deren Interpretation Einschränkungen. Verwendet wurden einzelne Substanzen, deren Wirkung keinesfalls die komplexen Vorgänge in vivo

widerspiegeln. Zudem wurde nur die Expression kardialer Marker als Hinweis für eine kardiale Differenzierung untersucht. Wir können keine Aussage zur morphologischen Ausdifferenzierung treffen und nur anhand der Expression von Cx43 eine Funktionalität vermuten. Andererseits ist eine morphologische Ausdifferenzierung ohne der Genexpression früher und reifer kardialer Differenzierungsmarker nicht möglich. Als Tendenz zeichnet sich jedoch ab: ein bekannter kardialer Differenzierungsstimulus (5-aza) führt zur Expression kardialer Differenzierungsmarker und die Expression dieser Marker ist nach der Zugabe von inflammatorischen Agentien signifikant geringer ausgeprägt. Wenn wir nur auf die Grundfrage des Projekts blicken, ob sich die „gesunden“ Stimuli der physiologischen Nische und die der Inflammation unterschiedlich auf das kardiale Differenzierungsverhalten auswirken, so ist diese Frage mit „ja“ zu beantworten. Die Unterschiede im Differenzierungsverhalten wurden anhand unterschiedlicher Expressionsraten kardialer Marker beurteilt.

4.5.1. *Proteinextrakt aus dem infarzierten Herzen als inflammatorischer Stimulus*

Die Inflammation nach einem Herzinfarkt ist ein kompliziertes Geschehen, in dem sehr viele Mediatoren eine Rolle spielen und gemeinsam die Inflammationsnische bilden. Zunächst hatten wir TNF-alpha als Inflammationsstimulus verwendet. Jedoch scheint TNF-alpha nicht nur negative Effekte zu haben, sondern auch eine gewisse protektive Rolle zu spielen (Frangogiannis, 2002; Monden et al., 2007; Sack et al., 2000). Im Tiermodell hat eine TNF-alpha Blockade mit Infliximab langfristig einen eher negativen Einfluss auf das Remodeling (Maleki Dizaji et al., 2021).

Um die Inflammationsnische annähernd in die Zellkultur zu bringen, haben wir ein Proteingemisch aus den infarzierten Herzen gewonnen und dieses dem Zellkulturmedium zugesetzt, in der gleichen Konzentration, in der auch das Gemisch aus „gesunden“ extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen zugesetzt wurde. Dieses Proteingemisch aus den infarzierten Herzen wurde nach der gleichen Methode wie auch die „gesunden“ extrazellulären und plasmamembranständigen Proteine gewonnen. Durch die identische Prozedur der Proteingewinnung konnte sichergestellt werden, dass sich die Bedingungen in den beiden Zellkulturmedien nur durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Proteingemische unterscheiden. So wurden in einem Zellkulturmodell zwei Nischen nachgeahmt, eine „gesunde“ und eine inflammatorische, und das Differenzierungsverhalten der Stammzellen konnte innerhalb einer „gesunden“ Differenzierungsnische und eines Infarktes direkt miteinander verglichen werden. Auch hier gelten die Einschränkungen, dass die für die Stimulation

verwendeten Proteingemische nicht genau analysiert wurden. Wir können jedoch anhand der Isolationsmethode annehmen, dass die „Infarktproteine“ unter anderem „damage-associated molecular pattern“ (DAMP) enthalten. DAMPs sind zelluläre Bestandteile, die von sterbenden Zellen freigesetzt werden und eine sterile inflammatorische Reaktion auslösen. Weiterhin wären in vivo weitere Moleküle wie DNA-Fragmente, Zellmembranfragmente, ATP als Bestandteile der inflammatorischen Nische vertreten. Diese wurden in unseren Stimulationsversuchen methodenbedingt nicht berücksichtigt. Nichtsdestotrotz zeigten die Stammzellen, die in der Zellkultur nur dem Proteingemisch aus den infarzierten Herzen ausgesetzt waren, eine geringere Expression kardialer Marker als die, die dem Proteingemisch aus den gesunden Herzen ausgesetzt waren. Auch hier gilt die Einschränkung, dass wir nur die Expression kardialer Marker untersucht haben und darüber auf die beginnende kardiale Differenzierung schließen. Wir können keine Aussage zur morphologischen Ausdifferenzierung treffen, sehen jedoch auch in diesem Versuchsaufbau die Tendenz, dass die Inflammation eine kardiale Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen beeinträchtigt.

Seit über 20 Jahren wird der Einsatz der Stammzellen für die Folgen der koronaren Herzkrankheit untersucht, der Nutzen dieser Therapie wird strittig diskutiert. Die Studienlage zur Effektivität der Stammzelltherapie wurde wiederholt in Metaanalysen dargelegt mit dem Ergebnis, dass ein Teil der Studien eine Verbesserung der LVEF und des Outcomes zeigt und der andere kein Benefit der Stammzelltherapie sieht. Allerdings wurden auch unterschiedliche Zellarten verwendet. So ist bekannt, dass die Knochenmarkstammzellen vor allem über die parakrinen Effekte ihre positive Wirkung zeigen. Jedoch liegen vergleichsweise wenige Studien mit MSCs vor, bei denen man am Ehesten eine direkte Differenzierung zu Kardiomyozyten erwarten könnte. Auch spielen die Anzahl und Art injizierter Zellen sowie der Applikationsweg sicherlich eine Rolle. Mathiasen et al. berichten beispielsweise über eine deutliche Verbesserung der LVEF, Reduktion der Infarktnarbe und Verringerung des endsystolischen Volumens nach direkter Injektion der MSC in das Myokard. Die betrachtete Patientengruppe hatte eine Ausgangs-LVEF < 45%, eine Herzinsuffizienz NYHA II bis III und keine verfügbaren Therapieoptionen (Mathiasen et al., 2020).

Die Mehrheit der Autoren ist sich einig, dass eine direkte kardiale Differenzierung im Herzen nicht für die positiven Effekte verantwortlich ist, denn diese findet nur in einem sehr geringen Umfang statt. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass unter anderem die Inflammation die direkte Differenzierung der Stammzellen beeinträchtigt. Auch weitere Faktoren könnten für die direkte Differenzierung eine Rolle spielen und sollten weiter

untersucht werden. Auch wenn die konventionellen Therapiestrategien immer weiter optimiert wurden und sich die Möglichkeiten einer raschen Intervention in den letzten 24 Jahren dramatisch verbessert haben, so sehen wir das Potential der Stammzelltherapie immer noch als vorhanden. Insbesondere, wenn es gelingen würde die Regeneration des geschädigten Herzmuskels zu erzielen.

5. Zusammenfassende Beurteilung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein inflammatorisches Milieu eine kardiale Differenzierung der Stammzellen beeinträchtigt.

Die Metaanalysen ergeben, dass Stammzelltherapien die Mortalität deutlich senken und die LVEF moderat, aber signifikant verbessern. Der erhoffte Effekt, nämlich eine Regeneration von infarziertem Gewebe, bleibt jedoch aus.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das nach einem Herzinfarkt herrschende inflammatorische Milieu die kardiale Differenzierung der Stammzellen negativ beeinflusst. Die Modulation der inflammatorischen Nische könnte die kardiale Differenzierungsrate der Stammzellen verbessern und somit die Regeneration des geschädigten Herzmuskels erreichen. Weitere Studien könnten darauf gerichtet sein, die kardiale Differenzierung störende Faktoren genauer zu identifizieren. Ein weiterer Ansatzpunkt für die Forschung könnte eine Modulation der Inflammation sein, die zu einer besseren Differenzierung der injizierten Stammzellen führen würde.

6. Summary

The results of this project show that an inflammatory environment impairs the cardiac differentiation of stem cells.

The meta-analyses show that stem cell therapies significantly reduce mortality and improve LVEF moderately, but significantly. However, the effect that was hoped for, namely the regeneration of infarcted tissue, does not materialize.

The results of this study show that the inflammatory environment prevailing after a heart attack has a negative effect on the cardiac differentiation of stem cells. Modulation of the inflammatory niche could improve the cardiac differentiation rate of stem cells and thus achieve regeneration of the damaged myocardium. Further studies could focus on identifying factors that interfere with cardiac differentiation more precisely. Another starting point for research could be the modulation of inflammation, which would lead to better differentiation of the injected stem cells.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Langendorff-Perfusionssystem	23
Abbildung 2: (a) Operationsplatz (b) Perfusionskanüle mit vorgebundenem Haltefaden (c) Herz, fixiert an der Perfusionskanüle mit abgeblassten Koronararterien, nach dem Anspülen mit der Perfusionslösung (d) Herz, fixiert an der Perfusionskanüle und angeschlossen an das Langendorff-Perfusionssystem.....	25
Abbildung 3: adulte murine Kardiomyozyten im Lichtmikroskop direkt nach der Isolation.....	57
Abbildung 4: Expression spezifischer Oberflächenantigene durch die Fettstammzellen. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen aus der Population der isolierten Fettstammzellen welche alle drei Oberflächenantigene CD105+, CD73+ und CD90+ exprimieren.	58
Abbildung 5: Expression spezifischer Oberflächenmarker durch die Fettstammzellen. Die Abbildung zeigt welcher Anteil der Zellen aus der gesamten isolierten Zellpopulation die spezifischen Oberflächenantigene aufweist	59
Abbildung 6: Nachweis adipogener Differenzierung der Fettstammzellen mit Oil-Red-O Färbung. In der Kontrollgruppe (a) zeigen sich keine Fettvakuolen. Fettstammzellen, die im adipogenen Differenzierungsmedium kultiviert wurden, reichern Fettvakuolen an, welche sich rot anfärben (b und c).....	60
Abbildung 7: Osteogene Differenzierung der Fettstammzellen (Nativpräparat): Abb. (a) zeigt das Nativpräparat der Fettstammzellen welches im Medium ohne osteogene Zusätze kultiviert wurde (Negativkontrolle) (b) und (c) zeigen die Fettstammzellen nach 14 Tage Kultur in osteogenem Medium.	61
Abbildung 8: qRT-PCR der alkalischen Phosphatase in den osteogen differenzierten Zellen. Die Expression der alkalischen Phosphatase ist dargestellt als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle als Mittelwert +/-SEM. $P < 0,05$	62
Abbildung 9: Färbung osteogen differenzierter Fettstammzellen mit Alizarin-Rot. Die mineralisierte extrazelluläre Matrix stellt sich rot dar Abb. (a), keine Rotfärbung der extrazellulären Matrix in der Negativkontrolle Abb. (b).....	62
Abbildung 10: Färbung osteogen differenzierter Fettstammzellen nach Van Kossa. In Abb. (a) färbt sich die mineralisierte extrazelluläre Matrix durch Austausch von Ca^{2+} Ionen durch Silberionen schwarz. Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle.....	63
Abbildung 11: qRT-PCR von kardialen Differenzierungsmarkern in den Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza. Die Expression von Cx43, Troponin T, GATA4, Nkx2.5, beta-MHC und Mef2c ist als relative mRNA-Menge gegenüber der	

Kontrolle abgebildet. Signifikanz ist bei $p < 0,05$ gegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM.	64
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von Fettstammzellen nach Stimulation mit 5-aza. Abb. (a) zeigt Fettstammzellen, die mit 5-aza stimuliert wurden mit nachweisbarem beta-MHC (rot) im Zytoplasma, in den nicht stimulierten Kontrollzellen (b) ist ebenfalls beta-MHC (rot) im Zytoplasma nachweisbar. Abb. (c) zeigt die Expression von GATA4 (rot) in den Zellkernen in den mit 5-aza stimulierten Fettstammzellen. Die Kontrollzellen (d) sind negativ für GATA4. Kernfärbung mit DAPI (blau).....	65
Abbildung 13: qRT-PCR von kardialen Markern in den MSC nach Stimulation mit gesunden extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen (Proteine). Die Expression von beta-MHC, Cx43, Troponin T, Nkx2.5, GATA4 und Mef2c ist als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. $p < 0.05$	66
Abbildung 14: Nachweis von GATA4 und beta-MHC in MSCs nach Stimulation mit „gesunden“ extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen. Abb. (a) zeigt für GATA4 positive Zellen (rot). Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle ohne Nachweis von GATA4. Abb. (c) beta-MHC im Zytoplasma stellt sich rot dar. Abb. (d) zeigt die Negativkontrolle ohne Nachweis von beta-MHC. Kernfärbung mit DAPI (blau).	67
Abbildung 15: qRT-PCR von kardialen Markern in den Fettstammzellen nach Stimulation mit extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen aus den gesunden Herzen. Die Expression von GATA4, NKx2.5, Mef2c, beta-MHC, Troponin T und Cx43 ist als relative mRNA-Menge gegenüber der Kontrolle gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Signifikanz bei $p < 0,05$	68
Abbildung 16: Nachweis von GATA4 in den Fettstammzellen nach der Stimulation mit den gesunden extrazellulären und plasmamembranständigen Proteinen. Abb. (a) GATA4 (rot) ist in den Zellkernen stimulierter Fettstammzellen nachweisbar. Abb. (b) zeigt die Negativkontrolle ohne Expression von GATA4. Kernfärbung mit DAPI (blau). Zytoskelett Färbung mit Phalloidin (grün).	69
Abbildung 17: Kokultur der MSC mit adulten murinen Kardiomyozyten. Abb. (a) und (b) zeigen MSCs aus der Kontrollgruppe, sie exprimieren den Stammzellmarker Sca1 (grün) und sind negativ für GATA4 und beta-MHC. Abb. (c) und (d) zeigen MSCs, die mit den adulten Kardiomyozyten kokultiviert wurden. Hier exprimieren sie gleichzeitig Sca1 (grün) und GATA4 (rot) (c) bzw. Sca1 (grün) und beta-MHC (rot) (d). Kernfärbung mit DAPI (blau).....	70
Abbildung 18: qRT-PCR der kardialen Differenzierungsmarker GATA4, Nkx2.5, Mef2c, Mlc2v, alpha cardiac Actin, Troponin T, Cx43 sowie des Entzündungsparameters IL6	

in MSCs unter dem Einfluss von LPS. 5-aza = nur mit 5-aza behandelte MSCs, 5-aza+LPS = mit 5-aza und LPS behandelte MSCs. Kontrolle = unbehandelte MSCs. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. Signifikanz bei $p < 0,05$ 72

Abbildung 19: Expression von Troponin T und beta-MHC in MSC nach Stimulation mit 5-aza und LPS: immunhistologische Färbung. Abb. (a) und (b) zeigen MSCs, die mit 5-aza stimuliert wurden, hier exprimierten die Zellen zu 30% Troponin T (Abb. (a) rot) und zu 20% beta-MHC (Abb. (b) rot). In Abb. (c) und (d) sind die Zellen abgebildet, die zusätzlich zu 5-aza mit LPS behandelt wurden, sie exprimierten zu 11% Troponin T (Abb. (c)), die Expression von beta-MHC konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. (d)). Abb. (e) und (f) zeigen die Negativkontrolle, hier exprimieren ca. 8% der Zellen Troponin T (e), beta-MHC wird nicht exprimiert (f)..... 73

Abbildung 20: qRT-PCR für Expression kardialer Differenzierungsmarker in den mit 5-aza stimulierten MSC unter dem Einfluss von TNF-alpha (5-aza+TNF) im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (Kontrolle) und zu den nur mit 5-aza stimulierten MSC. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM; ns= nicht signifikant; * $p < 0,05$ 75

Abbildung 21: qRT-PCR kardialer Differenzierungsmarker in den Fettstammzellen unter dem Einfluss von Gesundproteinen und Infarktproteinen im Vergleich zu den nicht stimulierten Kontrollzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM. Signifikanz bei $p < 0,05$; * $p < 0,05$; ns=nicht signifikant, n (gesamt)=18: Gesundprotein=6, Infarktprotein=6, Kontrolle=6. 76

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Kollagenaselösung für 25 ml.....	17
Tabelle 2: Perfusionsstocklösung	21
Tabelle 3: Perfusionslösung	21
Tabelle 4: Kollagenaselösung.....	22
Tabelle 5: „Stopp“-Lösung 1	22
Tabelle 6: „Stopp“-Lösung 2	22
Tabelle 7: Stufenweiser Anstieg der Ca ²⁺ -Konzentration	26
Tabelle 8: Medien für die Kultur adulter Kardiomyozyten.....	26
Tabelle 9: Adipogenes Differenzierungsmedium.....	27
Tabelle 10: Osteogene Zusätze und deren Endkonzentration im Medium	28
Tabelle 11: 5-aza Stimulationsmedium.....	29
Tabelle 12: Verdünnungsreihe.....	30
Tabelle 13: Primärantikörper Western-Blot.....	35
Tabelle 14: Sekundärantikörper Western-Blot	35
Tabelle 15: Primärantikörper Immunhistologie.....	38
Tabelle 16: Sekundärantikörper Immunhistologie	38
Tabelle 17: Primer	41
Tabelle 18: FACS-Antikörper.....	44
Tabelle 19: Geräte und Verbrauchsmaterialien bei Operationen an den Mäusen	45
Tabelle 20: Medikamente und Chemikalien bei Operationen an den Mäusen.....	46
Tabelle 21: Geräte, Verbrauchsmaterialien und Medien der Zellkultur	47
Tabelle 22: Geräte, Reagenzien und Chemikalien für histologische und immunhistologische Methoden	49
Tabelle 23: Geräte, Chemikalien und molekularbiologische Kits für die quantitative RNA-Analyse.....	49
Tabelle 24: Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien für Western-Blot.....	51
Tabelle 25: Reagenzien und Chemikalien	52
Tabelle 26: Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	53

9. Abkürzungsverzeichnis

+ = positiv

- = negativ

A = Ampere

Abb. = Abbildung

ATP = Adenosintriphosphat

Bis-Tris = Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan

Ca²⁺ = Kalzium

ca. = circa

CD = cluster of differentiation

Cy = Carbocyanin

DMSO = Dimethylsulfoxid

ddH₂O = oppeltdestilliertes Wasser

5-aza = 5-azazytidine

LPS = Lipopolysaccharid

TNF-α = Tumornekrosefaktor alpha

MSC = mesenchymale Stammzellen

ROS = reaktive Sauerstoffradikale

NF-κB = Nuclear Factor – κB

IL-6 = Interleukin-6

MMP = Matrix-Metalloproteinasen

BMC = Knochenmarkstammzellen

iPSC = induzierte pluripotente Stammzellen

EGFP = enhanced green fluorescent protein

LVEF = linksventrikulären Pumpfunktion

ASC = Fettstammzellen (adipose derived stem cells)

LAD = Ramus interventricularis anterior

KG = Körpergewicht

EKG = Elektrokardiogramm

BSA = bovines Serumalbumin

SDS = sodium dodecyl sulfat

PFA = Paraformaldehyd

cDNA = komplementäre DNA

dNTP = Desoxyribonukleosidtriphosphaten

DTT = Dithiotheithol

BLAST = Basic Local Alignment Search Tool
NCBI = National Center for Biotechnology Information
PCR = Polymerase-Kettenreaktion
TBE-Puffer = Tris-Borat-EDTA-Puffer
qRT-PCR = Real time quantitative PCR
FACS = fluorescence activated cell sorting
PBS = phosphatgepufferter Kochsalzlösung
P/S = Penicillin/Streptomycin
Rpm = Rotations per Minute

10. Literaturverzeichnis

- Abbey, D. & Seshagiri, P. B. (2013) "Aza-induced cardiomyocyte differentiation of P19 EC-cells by epigenetic co-regulation and ERK signaling", *Gene*, Vol. 526, No. 2, S. 364–373.
- Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P.-F., Figeac, F., Coudert, A. E., Le Coz, O., Christov, C., Baudin, X., Auber, F., Yiou, R., Dubois-Randé, J.-L. & Rodriguez, A.-M. (2011) "Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 29, No. 5, S. 812–824.
- Anjos-Afonso, F. & Bonnet, D. "Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells", *Best Practice & Research Clinical Haematology*, S. 13–24.
- Antonitsis, P., Ioannidou-Papagiannaki, E., Kaidoglou, A. & Papakonstantinou, C. (2007) "In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine", *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, Vol. 2007, No. 6, S. 593–597
- Assmus, B., Alakmeh, S., Rosa, S. de, Bonig, H., Hermann, E., Levy, W. C., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2016) "Improved outcome with repeated intracoronary injection of bone marrow-derived cells within a registry: rationale for the randomized outcome trial REPEAT", *European heart journal*, Vol. 37, No. 21, S. 1659–1666.
- Assmus, B., Leistner, D. M., Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Sedding, D., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Barth, C., Mayer-Wehrstein, C., Burck, I., Sueselbeck, T., Dill, T., Hamm, C. W., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2014) "Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival", *European heart journal*, Vol. 35, No. 19, S. 1275–1283.
- Augello, A. (2010) "Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches", *European Cells and Materials*, Vol. 2010, No. 20, S. 121–133.
- Barbuti, A. (2010) "The 'hearty' fat: adipocytes as a source of functional cardiomyocytes", *Cardiovascular research*, Vol. 85, No. 1, S. 1–2.
- Bassiouni, W., Valencia, R., Mahmud, Z., Seubert, J. M. & Schulz, R. (2023) "Matrix metalloproteinase-2 proteolyzes mitofusin-2 and impairs mitochondrial function during myocardial ischemia–reperfusion injury", *Basic Research in Cardiology*, Vol. 118, No. 1.

- Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., Angelis, A. de, Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R. W., Lecapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A. P., D'Alessandro, D. A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R. E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A. & Anversa, P. (2007) "Human cardiac stem cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 104, No. 35, S. 14068–14073.
- Bi, W., Drake, C. J. & Schwarz, J. J. (1999) "The transcription factor MEF2C-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and VEGF", *Developmental biology*, Vol. 211, No. 2, S. 255–267.
- Böcker, W (Hg.) (2012) *Pathologie: Mit Zugang zum Elsevier-Portal*, 5. Aufl., München, Urban & Fischer in Elsevier.
- Boudoulas, K. D. & Hatzopoulos, A. K. (2009) "Cardiac repair and regeneration: the Rubik's cube of cell therapy for heart disease", *Disease Models & Mechanisms*, Vol. 2, 7-8, S. 344–358
- Brunet, A., Goodell, M. A. & Rando, T. A. (2023) "Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 24, No. 1, S. 45–62.
- Bunnell, B. A., Flaas, M., Gagliardi, C., Patel, B. & Ripoll, C. (2008) "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation", *Methods (San Diego, Calif.)*, Vol. 45, No. 2, S. 115–120
- Burridge, P. W., Keller, G., Gold, J. D. & Wu, J. C. (2012) "Production of De Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming", *Cell stem cell*, Vol. 10, No. 1, S. 16–28.
- Chen, Q.-H., Liu, A.-R., Qiu, H.-B. & Yang, Y. (2015) "Interaction between mesenchymal stem cells and endothelial cells restores endothelial permeability via paracrine hepatocyte growth factor in vitro", *Stem cell research & therapy*, Vol. 6, S. 44.
- Choi, S. C., Yoon, J., Shim, W. J., Ro, Y. M. & Lim, D.-S. (2004) "5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells", *Experimental & molecular medicine*, Vol. 36, No. 6, S. 515–523.
- Choi, Y., Disting, G., Stubbs, S., Arunothayaraj, S., Han, X., Collas, P., Morrison, W. & Dilley, R. (2010) "Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes", *Journal of cellular and molecular medicine*, Vol. 14, No. 4, S. 878–889.
- Christman, J. K. (2002) "5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy", *Oncogene*, Vol. 2002, No. 21, S. 5483–5495.

- Chugh, A. R., Beache, G. M., Loughran, J. H., Mewton, N., Elmore, J. B., Kajstura, J., Pappas, P., Taloos, A., Stoddard, M. F., Lima, J. A. C., Slaughter, M. S., Anversa, P. & Bolli, R. (2012) "Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance", *Circulation*, Vol. 126, 11 Suppl 1, S54-64.
- Cianflone, E., Torella, M., Biamonte, F., Angelis, A. de, Urbanek, K., Costanzo, F. S., Rota, M., Ellison-Hughes, G. M. & Torella, D. (2020) "Targeting Cardiac Stem Cell Senescence to Treat Cardiac Aging and Disease", *Cells*, Vol. 9, No. 6.
- Čihák, A. (1974) "Biological Effects of 5-Azacytidine in Eukaryotes", *Oncology*, Vol. 30, No. 5, S. 405–422.
- Clavellina, D., Balkan, W. & Hare, J. M. (2023) "Stem cell therapy for acute myocardial infarction: Mesenchymal Stem Cells and induced Pluripotent Stem Cells", *Expert opinion on biological therapy*, Vol. 23, No. 10, S. 951–967.
- Davani, S., Deschaseaux, F., Challmers, D., Tiberghien, P. & Kantelip, J. (2005) "Can stem cells mend a broken heart?", *Cardiovascular Research*, Vol. 65, No. 2, S. 305–316.
- Dhalla, N. S., Elmoselhi, A. B., Hata, T. & Makino, N. (2000) "Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury", *Cardiovascular research*, Vol. 47, No. 3, S. 446–456.
- Dijk, A., Niessen, H. W. M., Zandieh Doulabi, B., Visser, F. C. & Milligen, F. J. (2008) "Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin", *Cell and Tissue Research*, Vol. 334, No. 3, S. 457–467.
- Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2009) "Cell Therapy of Acute Myocardial Infarction: Open Questions", *Cardiology*, Vol. 113, No. 3, S. 155–160
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. (2006) "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", *Cytotherapy*, Vol. 8, No. 4, S. 315–317.
- Drenckhahn, D & Christ, B (Hg.) (2008) *Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*, 17. Aufl., München, Elsevier, Urban & Fischer.
- ESchG - Gesetz zum Schutz von Embryonen (2024) [Online]. Verfügbar unter <https://www.gesetze-im-internet.de/eschg/BJNR027460990.html> (Abgerufen am 9 Oktober 2024).
- Farag, A., Koung Ngeun, S., Kaneda, M., Aboubakr, M. & Tanaka, R. (2024) "Optimizing Cardiomyocyte Differentiation: Comparative Analysis of Bone Marrow and Adipose-

- Derived Mesenchymal Stem Cells in Rats Using 5-Azacytidine and Low-Dose FGF and IGF Treatment", *Biomedicines*, Vol. 12, No. 8, S. 1923.
- Ferrai, C. & Schulte, C. (2024) "Mechanotransduction in stem cells", *European journal of cell biology*, Vol. 103, No. 2, S. 151417.
- Fisher, S. A., Doree, C., Mathur, A. & Martin-Rendon, E. (2015) "Meta-analysis of cell therapy trials for patients with heart failure", *Circulation research*, Vol. 116, No. 8, S. 1361–1377.
- Frangogiannis, N. G. (2002) "The inflammatory response in myocardial infarction", *Cardiovascular research*, Vol. 2002, No. 53, S. 31–47.
- Frangogiannis, N. G. (2008) "The immune system and cardiac repair", *Pharmacological Research*, Vol. 58, No. 2, S. 88–111.
- Frantz, S., Hundertmark, M. J., Schulz-Menger, J., Bengel, F. M. & Bauersachs, J. (2022) "Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: pathophysiology, imaging, and novel therapies", *European heart journal*, Vol. 43, No. 27, S. 2549–2561.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. (1970) "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells", *Cell Proliferation*, Vol. 3, No. 4, S. 393–403.
- Fuchs, E. & Blau, H. M. (2020) "Tissue Stem Cells: Architects of Their Niches", *Cell stem cell*, Vol. 27, No. 4, S. 532–556.
- Gaustad, K. G., Boquest, A. C., Anderson, B. E., Gerdes, A. M. & Collas, P. (2004) "Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 314, No. 2, S. 420–427.
- Giacca, M. (2020) "Cardiac Regeneration After Myocardial Infarction: an Approachable Goal", *Current Cardiology Reports*, Vol. 22, No. 10, S. 122.
- Gimble, J. M. & Bunnell, B. A. (2011) *Adipose-Derived Stem Cells: Methods and Protocols*, New York, Springer Science and Business Media LLC.
- (1996) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, Washington, D.C., National Academies Press.
- Gupta, S., Sharma, A., S, A. & Verma, R. S. (2021) "Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regeneration: from Differentiation to Cell Delivery", *Stem cell reviews and reports*, Vol. 17, No. 5, S. 1666–1694.
- Haghani, K., Bakhtiyari, S. & Nouri, A. M. (2012) "In vitro study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells", *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 361, 1-2, S. 315–320.
- Halle, S. (1968) "5-Azacytidine as a Mutagen for Arbovirus", *Journal of Virology*, No. 10, S. 1228–1229.

- Ilmer, M. (2009) *Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des Wnt-Signalweges* [Online]. Verfügbar unter http://edoc.ub.uni-muenchen.de/10445/1/Ilmer_Matthias.pdf
- Jacobson, S. L. & Piper, H. M. (1986) "Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 18, No. 7, S. 661–678
- Jeevanantham, V., Butler, M., Saad, A., Abdel-Latif, A., Zuba-Surma, E. K. & Dawn, B. (2012) "Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis", *Circulation*, Vol. 126, No. 5, S. 551–568.
- Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P. & McGonagle, D. (2002) "Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells", *Arthritis and rheumatism*, Vol. 46, No. 12, S. 3349–3360.
- Jumabay, M., Zhang, R., Yao, Y., Goldhaber, J. I. & Bostrom, K. I. (2009) "Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes", *Cardiovascular Research*, Vol. 85, No. 1, S. 17–27
- Kajstura, J., Urbanek, K., Rota, M., Bearzi, C., Hosoda, T., Bolli, R., Anversa, P. & Leri, A. (2008) "Cardiac stem cells and myocardial disease", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 45, No. 4, S. 505–513.
- Karon, M. & Benedict, W. F. (1972) "Chromatid Breakage: Differential Effect of Inhibitors of DNA Synthesis during G2 Phase", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 1972, No. 178, S. 62.
- Katanov, C., Lerrer, S., Liubomirski, Y., Leider-Trejo, L., Meshel, T., Bar, J., Feniger-Barish, R., Kamer, I., Soria-Artzi, G., Kahani, H., Banerjee, D. & Ben-Baruch, A. (2015) "Regulation of the inflammatory profile of stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF-alpha and the NF-kappaB pathway", *Stem cell research & therapy*, Vol. 6, S. 87.
- Kessler, P. D. & Byrne, B. J. (1999) "Myoblast cell grafting into heart muscle: cellular biology and potential applications", *Annual review of physiology*, Vol. 61, S. 219–242.
- Kitsuka, T., Takahashi, F., Reinhardt, J., Watanabe, T., Ulziibayar, A., Yimit, A., Kelly, J. & Shinoka, T. (2022) "Advances in Cardiac Tissue Engineering", *Bioengineering*, Vol. 9, No. 11.
- Kolios, G. & Moodley, Y. (2013) "Introduction to stem cells and regenerative medicine", *Respiration; international review of thoracic diseases*, Vol. 85, No. 1, S. 3–10.

- Kologrivova, I., Shtatolkina, M., Suslova, T. & Ryabov, V. (2021) "Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction", *Frontiers in immunology*, Vol. 12, S. 664457.
- Kurrelmeyer, K. M., Michael, L. H., Baumgarten, G., Taffet, G. E., Peschon, J. J., Sivasubramanian, N., Entman, M. L. & Mann, D. L. (2000) "Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97, No. 10, S. 5456–5461.
- Leistner, D. M., Fischer-Rasokat, U., Honold, J., Seeger, F. H., Schächinger, V., Lehmann, R., Martin, H., Burck, I., Urbich, C., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. & Assmus, B. (2011) "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy", *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, Vol. 2011, No. 100, S. 925–934.
- Leistner, D. M., Schmitt, J., Palm, S., Klotsche, J., Estel, S., Fink, A., Israel, C. W., Assmus, B., Duray, G. Z., Dimmeler, S., Hohnloser, S. H. & Zeiher, A. M. (2011) "Intracoronary administration of bone marrow-derived mononuclear cells and arrhythmic events in patients with chronic heart failure", *European heart journal*, Vol. 32, No. 4, S. 485–491
- Lin, C.-C., Pan, C.-S., Wang, C.-Y., Liu, S.-W., Hsiao, L.-D. & Yang, C.-M. (2015) "Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts", *Journal of biomedical science*, Vol. 22, S. 53.
- Locke, M., Windsor, J. & Dunbar, P. R. (2009) "Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery", *ANZ Journal of Surgery*, Vol. 79, No. 4, S. 235–244.
- Louch, W. E., Sheehan, K. A. & Wolska, B. M. (2011) "Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Vol. 51, No. 3, S. 288–298
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 193, No. 1, S. 265–275.
- Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. (2024) *Taschenlehrbuch Histologie*, 7. Aufl., Stuttgart, Thieme.
- Maleki Dizaji, N., Garjani, A., Mousavi, S., Mohammadi, M. & Vaez, H. (2021) "Time-dependent influence of infliximab on hemodynamic responses and cardiac injuries of

- isoproterenol-induced myocardial infarction in rats", *European journal of pharmacology*, Vol. 903, S. 174122.
- 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", *Mechanisms of development*, Vol. 44, No. 1, S. 41–50.
- Mathiasen, A. B., Qayyum, A. A., Jørgensen, E., Helqvist, S., Kofoed, K. F., Haack-Sørensen, M., Ekblond, A. & Kastrup, J. (2020) "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with ischaemic heart failure: final 4-year follow-up of the MSC-HF trial", *European journal of heart failure*, Vol. 22, No. 5, S. 884–892.
- Mathur, A., Fernández-Avilés, F., Bartunek, J., Belmans, A., Crea, F., Dowlut, S., Galifianes, M., Good, M.-C., Hartikainen, J., Hauskeller, C., Janssens, S., Kala, P., Kastrup, J., Martin, J., Menasché, P., Sanz-Ruiz, R., Ylä-Herttuala, S. & Zeiher, A. (2020) "The effect of intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells on all-cause mortality in acute myocardial infarction: the BAMl trial", *European heart journal*, Vol. 41, No. 38, S. 3702–3710.
- McMullen, N. M., Zhang, F., Hotchkiss, A., Bretzner, F., Wilson, J. M., Ma, H., Wafa, K., Brownstone, R. M. & Pasumarthi, K. B. (2009) "Functional characterization of cardiac progenitor cells and their derivatives in the embryonic heart post-chamber formation", *Developmental Dynamics*, Vol. 238, No. 11, S. 2787–2799
- Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J.-T., Marolleau, J.-P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M. & Hagege, A. A. (2008) "The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation", *Circulation*, Vol. 117, No. 9, S. 1189–1200.
- Menasché, P., Hagege, A. A., Vilquin, J.-T., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., Bruneval, P., Benbunan, M., Marolleau, J.-P. & Duboc, D. (2003) "Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction", *Journal of the American College of Cardiology*, Vol. 41, No. 7, S. 1078–1083.
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. & Gimble, J. M. (2006) "Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 24, No. 2, S. 376–385.
- Möllmann, H., Nef, H., Voss, S., Troidl, C., Willmer, M., Szardien, S., Rolf, A., Klement, M., Voswinckel, R., Kostin, S., Ghofrani, H., Hamm, C. & Elsässer, A. (2011) "Stem

- cell-mediated natural tissue engineering", *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, Vol. 15, No. 1, S. 52–62
- Monden, Y., Kubota, T., Tsutsumi, T., Inoue, T., Kawano, S., Kawamura, N., Ide, T., Egashira, K., Tsutsui, H. & Sunagawa, K. (2007) "Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction", *Cardiovascular research*, Vol. 73, No. 4, S. 794–805.
- Mosna, F., Sensebé, L. & Krampera, M. (2010) "Human Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide", *Stem Cells and Development*, Vol. 19, No. 10, S. 1449–1470.
- Mülhardt, C. (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics*, 6. Aufl., Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Müller, P., Lemcke, H. & David, R. (2018) "Stem Cell Therapy in Heart Diseases - Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies", *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, Vol. 48, No. 6, S. 2607–2655.
- Musunuru, K., Sheikh, F., Gupta, R. M., Houser, S. R., Maher, K. O., Milan, D. J., Terzic, A. & Wu, J. C. (2018) "Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiovascular Disease Modeling and Precision Medicine: A Scientific Statement From the American Heart Association", *Circulation: Genomic and Precision Medicine*, Vol. 11, No. 1, e000043.
- Nakanishi, C., Yamagishi, M., Yamahara, K., Hagino, I., Mori, H., Sawa, Y., Yagihara, T., Kitamura, S. & Nagaya, N. (2008) "Activation of cardiac progenitor cells through paracrine effects of mesenchymal stem cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 374, No. 1, S. 11–16.
- Olson, E. N. (2024) "Myocardial Regeneration: Feasible or Fantasy?", *Circulation*, Vol. 150, No. 5, S. 347–349.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D. M., Leri, A. & Anversa, P. (2003) "Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium", *Pediatric transplantation*, 7 Suppl 3, S. 86–88.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. & Anversa, P. (2001) "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 98, No. 18, S. 10344–10349.
- Paul, D., Samuel, S. & Maulik, N. (2009) "Mesenchymal stem cell: present challenges and prospective cellular cardiomyoplasty approaches for myocardial regeneration", *Antioxidants & redox signaling*, Vol. 11, No. 8, S. 1841–1855

- Perán, M., Marchal, J. A., López, E., Jiménez-Navarro, M., Boulaiz, H., Rodríguez-Serrano, F., Carrillo, E., Sánchez-Espin, G., Teresa, E. de, Tosh, D. & Aranega, A. (2010) "Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes", *Cytotherapy*, Vol. 12, No. 3, S. 332–337.
- Pfaffl, M. W. (2001) "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR", *Nucleic acids research*, Vol. 29, No. 9, e45.
- Phinney, D. G. (2024) "Alexander Friedenstein, Mesenchymal Stem Cells, Shifting Paradigms and Euphemisms", *Bioengineering*, Vol. 11, No. 6.
- Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkela, R. & Ruskoaho, H. (2004) "GATA transcription factors in the developing and adult heart", *Cardiovascular Research*, Vol. 63, No. 2, S. 196–207.
- 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 (New York, N.Y.)*, Vol. 284, No. 5411, S. 143–147
- Planat-Benard, V. (2004) "Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells", *Circulation Research*, Vol. 94, No. 2, S. 223–229.
- Planat-Bénard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Pénicaud, L. & Casteilla, L. (2004) "Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells", *Circulation research*, Vol. 94, No. 2, S. 223–229.
- Polymeri, A., Giannobile, W. V. & Kaigler, D. (2016) "Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine", *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, Vol. 48, No. 11, S. 700–713.
- Pountos, I., Corcadden, D., Emery, P. & Giannoudis, P. V. (2007) "Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application", *Injury, Int. J. Care Injured*, Vol. 2007, 38S4, S. 23–33.
- Psaltis, P. J., Zannettino, A. C. W., Worthley, S. G. & Gronthos, S. (2008) "Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, Vol. 26, No. 9, S. 2201–2210.
- Qin, Y., Ge, G., Yang, P., Wang, L., Qiao, Y., Pan, G., Yang, H., Bai, J., Cui, W. & Geng, D. (2023) "An Update on Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine: Where Challenge Meets Opportunity", *Advanced Science*, Vol. 10, No. 20, e2207334.
- Rangappa, S., Fen, C., Lee, E., Bongso, A. & Sim, E. (2003) "Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes", *The Annals of thoracic surgery*, Vol. 75, No. 3, S. 775–779

- Reinecke, H., Poppa, V. & Murry, C. E. (2002) "Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting", *Journal of molecular and cellular cardiology*, Vol. 34, No. 2, S. 241–249.
- Ren, J. & Wold, L. E. (2001) "Measurement of Cardiac Mechanical Function in Isolated Ventricular Myocytes from Rats and Mice by Computerized Video-Based Imaging", *Biological procedures online*, Vol. 3, S. 43–53.
- Rikhtegar, R., Pezeshkian, M., Dolati, S., Safaie, N., Afrasiabi Rad, A., Mahdipour, M., Nouri, M., Jodati, A. R. & Yousefi, M. (2019) "Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts", *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, Vol. 109, S. 304–313.
- Rossen, R. D., Michael, L. H., Hawkins, H. K., Youker, K., Dreyer, W. J., Baughn, R. E. & Entman, M. L. (1994) "Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion", *Circulation research*, Vol. 75, No. 3, S. 546–555.
- Sack, M. N., Smith, R. M. & Opie, L. H. (2000) "Tumor necrosis factor in myocardial hypertrophy and ischaemia--an anti-apoptotic perspective", *Cardiovascular research*, Vol. 45, No. 3, S. 688–695.
- Sanz-Ruiz, R., Fernández-Santos, E., Domínguez-Muñoa, M., Parma, R., Villa, A., Fernández, L., Sánchez, P. L. & Fernández-Avilés, F. (2009) "Early translation of adipose-derived cell therapy for cardiovascular disease", *Cell transplantation*, Vol. 18, No. 3, S. 245–254.
- Schächinger, V., Assmus, B., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2009) "Intracoronary infusion of bone marrow-derived mononuclear cells abrogates adverse left ventricular remodelling post-acute myocardial infarction: insights from the reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction (REPAIR-AMI) trial", *European journal of heart failure*, Vol. 11, No. 10, S. 973–979
- Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Süselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2006a) "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction", *The New England journal of medicine*, Vol. 355, No. 12, S. 1210–1221.
- Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Süselbeck, T., Werner, N., Haase, J., Neuzner, J., Germing, A., Mark, B., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. (2006b) "Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-

- marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial", *European heart journal*, Vol. 27, No. 23, S. 2775–2783.
- Shah, V. K. & Shalia, K. K. (2011) "Stem Cell Therapy in Acute Myocardial Infarction: A Pot of Gold or Pandora's Box", *Stem cells international*, Vol. 2011.
- Siegel, G., Krause, P., Wöhrle, S., Nowak, P., Ayturan, M., Kluba, T., Brehm, B. R., Neumeister, B., Köhler, D., Rosenberger, P., Just, L., Northoff, H. & Schäfer, R. (2012) "Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells Express Cardiomyogenic Proteins But Do Not Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation Potential", *Stem cells and development*, Sept 1;21(13), S. 2457–2470.
- Siu, C.-W., Liao, S.-Y., Liu, Y., Lian, Q. & Tse, H.-F. (2010) "Stem cells for myocardial repair", *Thrombosis and haemostasis*, Vol. 104, No. 1, S. 6–12.
- Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C. & Moretta, L. (2007) "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2", *Blood*, Vol. 111, No. 3, S. 1327–1333.
- Sugiura, T., Shahannaz, D. C. & Ferrell, B. E. (2024) "Current Status of Cardiac Regenerative Therapy Using Induced Pluripotent Stem Cells", *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 25, No. 11, S. 5772.
- Sürder, D., Manka, R., Lo Cicero, V., Moccetti, T., Rufibach, K., Soncin, S., Turchetto, L., Radrizzani, M., Astori, G., Schwitter, J., Erne, P., Zuber, M., Maur, C. auf der, Jamshidi, P., Gaemperli, O., Windecker, S., Moschovitis, A., Wahl, A., Bühler, I., Wyss, C., Kozerke, S., Landmesser, U., Lüscher, T. F. & Corti, R. (2013) "Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function", *Circulation*, Vol. 127, No. 19, S. 1968–1979.
- Sürder, D., Schwitter, J., Moccetti, T., Astori, G., Rufibach, K., Plein, S., Lo Cicero, V., Soncin, S., Windecker, S., Moschovitis, A., Wahl, A., Erne, P., Jamshidi, P., Maur, C. auf der, Manka, R., Soldati, G., Bühler, I., Wyss, C., Landmesser, U., Lüscher, T. F. & Corti, R. (2010) "Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI)", *American heart journal*, Vol. 160, No. 1, S. 58–64.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors", *Cell*, Vol. 126, No. 4, S. 663–676.
- The top 10 causes of death* (2024) [Online]. Verfügbar unter <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Abgerufen am 9 Oktober 2024).

- Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X. & Han, W. (2015) "LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b", *Journal of translational medicine*, Vol. 13, S. 308.
- Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T. & Higuchi, A. (2023) "Introduction to stem cells", *Progress in molecular biology and translational science*, Vol. 199, S. 3–32.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 76, No. 9, S. 4350–4354.
- Troidl, C., Möllmann, H., Nef, H., Masseli, F., Voss, S., Szardien, S., Willmer, M., Rolf, A., Rixe, J., Troidl, K., Kostin, S., Hamm, C. & Elsässer, A. (2009a) "Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction", *Journal of cellular and molecular medicine*, Vol. 13, 9B, S. 3485–3496.
- van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L. & Narula, J. (2009) "Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts", *Nature Reviews Cardiology*, Vol. 7, No. 1, S. 30–37
- Vassalli, G. & Moccetti, T. (2011) "Cardiac repair with allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction", *Swiss medical weekly*, Vol. 141, S. w13209
- Wollert, K.C., Meyer G. P., Müller-Ehmsem, J., Tschöpe, C., Bonarjee, V., Larsen, A. I., May, A. E., Empen, K., Chorianopoulos, E., Tebbe, U., Waltenberger, J., Mahrholdt, H., Ritter, B., Pirr, J., Fischer, D., Korf-Klinebiel, M., Arseniev, L., Heuft, H.-G., Brinckmann, J. E., Messinger, D., Hertenstein, B., Ganser, A., Katus, H. A., Felix, S. B., Gawaz, M. P., Dickstein, K., Schultheiss, H.-P., Ladage, D., Greulich, S. & Bauersachs, J. (2017) "Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial", *European heart journal*, Vol. 38, No. 39, S. 2936-2943
- Wu, K. H., Mo, X. M., Han, Z. C. & Zhou, B. (2011) "Stem Cell Engraftment and Survival in the Ischemic Heart", *The Annals of Thoracic Surgery*, Vol. 92, No. 5, S. 1917–1925
- Xing, Y., Lv, A., Wang, L. & Yan, X. (2012) "The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells", *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 360, 1-2, S. 279–287.
- Zhu, Y., Liu, T., Song, K., Ning, R., Ma, X. & Cui, Z. (2009) "ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment", *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 324, 1-2, S. 117–129

Zingg, J. M. & Jones, P. A. (1997) "Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis", *Carcinogenesis*, Vol. 18, No. 5, S. 869–882.

11. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Ich danke Matthias Willmer für den Anstoß und die Überlassung des Projektes zur Erforschung des Einflusses der Inflammation auf die kardiale Differenzierung der Stammzellen.

Ich danke Sigrun Sass für Ihre liebevolle Einführung in die Welt der Zellkultur. Meinen ersten Tag im Labor, wo Du, liebe Sigrun, mir gezeigt hast, wie die neonatalen Rattenkardiomyozyten gewonnen werden, werde ich nie vergessen. Auch werde ich nie vergessen, als ich an einem dunklen Dezemberabend alleine im Labor war, um die Zellen zu versorgen und sehr konzentriert an der Bench arbeitete, als Du plötzlich hinter mir standest.

Ich danke Sandra Voss für ihre immer konstruktive Kritik.

Ich danke Oxana Hoffmann für die Einarbeitung in die immunhistochemischen Färbetechniken.

Ich danke Anett Kirchhoff für Ihre Unterstützung beim Westernblotten und beim Beschaffen und Mischen sämtlicher Chemikalien, Puffer und Lösungen.

Ich danke Monika Rieschel für die Einführung in die Welt der real time PCR und für die vielen aufbauenden Mütter-Gespräche, die neben der Forschung auch mal sein mussten.

Ich danke Christian Troidl, einem großartigen Menschen und Wissenschaftler, der dieses Projekt über so viele Jahre mit viel Geduld, seiner immer positiver Einstellung und Denkanstößen, wenn es nicht weiter ging, so liebevoll begleitet hat.

Ich danke meinem Ehemann Andreas, für Seine liebevolle und bedingungslose Unterstützung in jeder Phase dieser Doktorarbeit, für Sein Vertrauen darauf, dass es nach noch so vielen Jahren fertig gestellt werden kann, für Sein immer wieder „du schaffst es“ und für wiederholtes Korrekturlesen.

Ich danke meinen Kindern Amélie, Noemi, Ole und Ylvie die mich gelehrt haben geduldig zu sein.