



Charakterisierung des Differenzierungspotentiales humaner epikardialer Progenitorzellen aus atrialen Biopsien

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Timo Daniel Schmidt

aus Paderborn

Düsseldorf, Oktober 2017

aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Jürgen Schrader
2. Prof. Dr. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2017

Zusammenfassung

Der Herzinfarkt ist nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen. Verursacht wird er durch Verschluss eines Herzkranzgefäßes, der die Versorgung des nachgeschalteten Gewebes mit Blut unterbricht und so einen Gewebeuntergang herbeiführt. Durch Proliferation von extrazellulärer Matrix (ECM)-produzierenden Myofibroblasten wird eine nichtkontraktile Infarktnarbe ausgebildet, welche zwar das Herz vor einer Ruptur bewahrt, jedoch langfristig zu einer Herzinsuffizienz führen kann.

Da Kardiomyozyten nur ein sehr geringes Potential zur Proliferation besitzen, ist eine Regeneration des geschädigten Infarktareals durch körpereigene, d.h. endogene, Stammzellen ein möglicher Ansatzpunkt der Forschung und zukünftigen Therapie. Endogene Vorläuferzellen aus epikardialen Zellen (*epicardium-derived cells*, EPDC) tragen entscheidend zur Entstehung des Herzens während der Embryonalentwicklung bei, sie gehen jedoch nach der Geburt in einen Ruhezustand über. Durch eine ischämische Herzschädigung wie nach einem Infarkt reaktivieren die EPDC ihr embryonales Programm und versuchen, wenn auch nicht erfolgreich, zu einer Regeneration des Herzens beizutragen. Dazu gehört neben der Differenzierung in Endothelzellen, glatte Muskelzellen aber auch Kardiomyozyten, die Modulation der Immunantwort nach Infarkt durch die Sekretion von Zytokinen. Ziel dieser Arbeit war es, die EPDC aus humanen atrialen Biopsien zu isolieren und sie hinsichtlich verschiedener molekularer Marker zu charakterisieren, um ihr regeneratives Potential besser abschätzen zu können. Im Vergleich zu humanen EPDC wurden auch ventrikuläre murine EPDC isoliert und charakterisiert, um Gemeinsamkeiten bzw. Speziesdifferenzen herauszuarbeiten. Folgende wesentliche Ergebnisse wurden erzielt:

- Zunächst wurde eine Methode entwickelt und validiert, um EPDC aus humanen atrialen Biopsien zu isolieren und diese in Kultur zu passagieren. Dabei zeigte sich, dass die Zellen einen homogenen mesenchymalen Phänotyp besitzen, eine Verdopplungszeit von 47 ± 6 Stunden zeigen und sich über 10-12 Wochen in Kultur vermehren lassen.
- Zellmarkeruntersuchungen mittels Durchflusszytometrie, mRNA-Analyse und Immunfluoreszenzanalyse zeigten die Expression von epikardialen Markern wie WT1 und Tbx18 sowie die Expression des kardialen Markers GATA4, was ihren epikardialen Ursprung belegt.
- Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln zeigten, dass humane EPDC ein endozytotisches Potential besitzen, welches in seiner Stärke mit dem von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) vergleichbar ist. EPDC, die in das Infarktareal einwandern, könnten somit an der Beseitigung von z. B. apoptotischen/nekrotischen Zellen mitwirken.
- Analysen des Zellkulturüberstands von EPDC zeigten, dass sie verschiedene Zytokine, welche bei Entzündung (IL-6, IL-1 β , IL-11, MCP1), Angiogenese (VEGF) und Differenzierung (TGF- β) involviert sind, sezernieren.
- Eine Oberflächenproteomanalyse zeigte, dass von allen identifizierten Proteinen 149 sowohl von hEPDC als auch rEPDC exprimiert werden. Die Expression verschiedener Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (EGFR, PDGFR) und an Differenzierungsprozessen beteiligter Signalmoleküle (NRP1, Notch2, Endoglin) konnte nachgewiesen werden. Ebenfalls wurden ECM-modulierende Enzyme (MMP2, MMP14) identifiziert, was auf eine mögliche Beteiligung der hEPDC an Gewebeumbildungen hinweist.
- Die lentivirale Immortalisierung von humanen EPDC mit hTERT resultierte in einer schnell wachsenden Zelllinie, welche sich jedoch in ihrer Markerexpression von primären EPDC deutlich unterscheidet.

Insgesamt konnten humane EPDC erfolgreich aus atrialen Biopsien isoliert werden. Kultivierte EPDC sezernierten verschiedener Zytokine, welche an der Modulation der Immunantwort nach einem Infarkt beteiligt sein könnten bzw. die Regeneration des Herzens nach der Verletzung fördern können. Weiterhin konnten Oberflächenproteine identifiziert werden, welche auf eine Beteiligung der EPDC an wesentlichen Prozessen der Proliferation und Differenzierung nach Herzinfarkt hinweisen.

Summary

Cardiac infarction is still one of the leading causes of death in western societies. It is caused by the occlusion of a coronary artery, resulting in a lack of oxygen supply in downstream cardiac tissue and the death of cardiomyocytes. A non-contractile scar is formed by proliferation of particularly ECM-producing myofibroblasts. This prevents a rupture of the injured heart, but may eventually lead to heart failure in the long term.

Since cardiomyocytes themselves only show a very limited proliferation potential, regeneration of injured cardiac tissue by endogenous stem cells is a focus of current cardiac research. Endogenous stem cells of the epicardium (epicardium-derived cells, EPDC) play a crucial role during embryonic development of the heart, but become quiescent shortly after birth. However, EPDC can reactivate their embryonic program after cardiac injury and therefore may contribute to cardiac regeneration. This includes in addition to differentiation of EPDC to endothelial cells, smooth muscle cell and cardiomyocytes the modulation of the immune response through secretion of cytokines.

The aim of this thesis was to isolate EPDC from human atrial biopsies and to characterize at the gene and protein level their regenerative potential. In comparison to human EPDC, rat EPDC formed on the ventricular myocardium after infarction were characterized in parallel. The following main results were obtained:

- A method for isolation and cultivation of EPDC from human atrial biopsies obtained from surgical specimens was established. Isolated cells revealed a homogenous mesenchymal phenotype and showed a doubling time of 47 ± 6 hours and could be cultured for up to 10-12 weeks.
- Analysis of cell markers with flow cytometry, qRT-PCR and immunofluorescence showed the expression of epicardial markers such as WT1 and Tbx18 as well as cardiac markers such as GATA4, substantiating their epicardial origin.
- Experiments with fluorescence-labeled nanoparticles revealed an endocytotic potential comparable to human MSC. This suggests the involvement of EPDC in the removal of cell debris and apoptotic cells.
- Analysis of the cell culture supernatant revealed the secretion of various cytokines involved in inflammation (IL-6, IL-1 β , IL-11, MCP1), angiogenesis (VEGF) and differentiation processes (TGF- β).
- A surface proteome analysis revealed that from all proteins identified, 149 were expressed on both human and murine EPDC. They include receptors for growth factors (EGFR, PDGFR) as well as receptors for molecules involved in differentiation processes (NRP1, Notch2, Endoglin). In addition, enzymes known to modulate ECM (MMP2, MMP14), were identified in both human and rat EPDC.
- Lentiviral immortalization of human EPDC with hTERT resulted in a fast growing cell-line which differed from primary EPDC in the expression of several marker proteins.

Overall, human EPDC were successfully isolated and characterized from human atrial biopsies. They secreted numerous cytokines known to be involved in the modulation of the immune response and regeneration of the heart after injury. Furthermore, surface proteome analysis identified proteins involved in essential mechanisms of cell proliferation and differentiation.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A ₁ R	Adenosinrezeptor 1
A ₂ AR	Adenosinrezeptor 2A
A _{2B} R	Adenosinrezeptor 2B
A ₃ R	Adenosinrezeptor 3
Abb.	Abbildung
ACB	aortocorärer Bypass
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ACVB	aortocoronärer venöser Bypass
ADA	Adenosin-Desaminase
ADK	Adenosin-Kinase
ADORA	Adenosinrezeptor A
ADP	Adenosindiphosphat
AKE	Aortenklappenersatz
AKR	Aortenklappenrekonstruktion
ALP	alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
AZ	Adenylatzyklase
BCA	Bicinchoninsäure
BM-MSC	mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark
BMP-2	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
c-Kit	<i>tyrosine-protein kinase Kit</i>
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CASC	<i>cardiac atrial appendage stem cells</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CNT	konzentrativer Nukleosidtransporter
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTF1	Cardiotrophin1
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
cTnT	kardiales Troponin T
Cx	Connexin
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	<i>donkey serum</i>
NTPDasen	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
DTT	1,4-Dithiothreito
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	extrazellulärer Matrix

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale zu mesenchymale Transition
ENPP	Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen/Phosphodiesterase
ENT	äquibrativer Nukleosidtransporter
aEP	Proepikardiales Organ des atrialen Pols
cEP	kardiales Epikardium
EPDC	<i>epicardium-derived cells</i>
EPO	Erythropoetin
ESI	Nano-Elektrospray-Ionisation
et al.	<i>et alteri</i> (und andere)
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt-1	<i>FMS-like tyrosine kinase-1</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
h	Stunde
HCAM	<i>homing cell adhesion molecule</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF α	hypoxie-induzierter Faktor α
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
HTX	Herztransplantation
hTERT	humane Telomerase
Hygro	Hygromycin
I/R	Ischämie/Reperfusion
IFN	Interferon
IGF	insulinähnlichen Wachstumsfaktoren
IL-	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
iPSC	induzierte pluripotente Stammzellen
JAK	Januskinase
kb	Kilobasen
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
L	Liter
LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i> , linke Koronararterie
LB	Luria Bertani
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i>
m	milli
M	Molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP1	Monozyten-Chemoattraktor-Protein-1
MFI	<i>mean fluoreszenz intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität
MIC	minimale invasive Chirurgie
min	Minute

MK	Mitralklappe
MKE	Mitralklappenersatz
MKR	Mitralklappenrekonstruktion
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPL	Molecular Proteomics Laboratory
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MSC	mesenchymale Stammzellen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n. a.	nicht angegeben
n. d.	nicht detektierbar
n. v.	nicht vorhanden
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaCl	Natriumchlorid
NF-kB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
Notch2	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 2</i>
NRP1	Neuropilin-1
NTPDasen	Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen
P2X	Nukleotid-Rezeptor P2X
P2Y	Nukleotid-Rezeptor P2Y
PAGE	<i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PE	Proepikardium
PE-CF	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein)
aPEO	proepikardialen Organ des arteriellen Pols
vPEO	proepikardialen Organ des venösen Pols
PFA	Paraformaldehyd
PFC	Perfluorkarbon
PFCE	Perfluoro-15-Kronenether
PFO	offener Foramen ovale
pH	Negativer Logarithmus der Protonen-Konzentration
Pod1	Epikardin
Puro	Puromycin
RA	Retinsäure
RAT2	Rattenfibroblasten-Zelllinie
RALDH2	Retinaldehyd Dehydrogenase 2
RE	Restriktionsendonuklease
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RLE	<i>Rat lung epithelial cells</i>
qRT-PCR	quantitative real-time PCR
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
Sca-1	<i>stem cell antigen-1</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SHF	zweites Herzfeld, <i>second heart field</i>
SNR	<i>signal-to-noise ratio</i> , Signal-Rausch-Verhältnis
SMC	Zelle der glatten Muskulatur
SSC	<i>side scatter</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tβ4	Thymosin beta 4

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
hTERT	humane Telomerase
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TK	Trikuspidalklappe
TKR	Trikuspidalklappenrekonstruktion
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
ü. N.	über Nacht
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VHF	Vorhofflimmern
v/v	Volumenprozent
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
WT1	Wilms Tumor Protein
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>
z. B.	zum Beispiel
μ	Mikro

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Embryonalentwicklung des Herzens unter besonderer Berücksichtigung der proepikardialen Stammzelle	1
1.2 Reaktivierung von EPDC nach Herzinfarkt	5
1.2.1 Pathophysiologie des Herzinfarktes	6
1.2.2 Adulte epikardiale Stammzellen.....	10
1.3 Biologie der adulten EPDC	11
1.3.1 Autokrine und parakrine Zytokinsekretion.....	12
1.3.2 Differenzierungspotential von EPDC.....	14
1.4 Purinerges Signalling	17
1.4.1 Die Ektonukleotidkaskade: CD73 und Adenosin.....	18
1.4.2 ATP- und Adenosinrezeptoren sowie ihre Signalwege.....	21
1.4.3 Purinorezeptor-vermittelte Signaltransduktion.....	22
1.5 Zielsetzung	25
2 Material	26
2.1 Laborausstattung	26
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	27
2.3 Marker, Restriktionsenzyme und -puffer	28
2.4 Kits für Isolierung und Nachweis von RNA, DNA und Proteinen	28
2.5 Assays für die Analyse von Zytokinkonzentrationen.....	28
2.6 Antikörper	29
2.6.1 Primärantikörper.....	29
2.6.2 Sekundärantikörper	29
2.7 Humane Biopsien	30
2.8 Zelllinien, Bakterienstämme, Plasmide und Oligonucleotide	31

2.8.1	Zelllinien	31
2.8.2	Bakterienstämme	31
2.8.3	Plasmide	31
2.8.4	TaqMan Gene Expression Assays	31
2.9	Software	32
3	Methoden.....	33
3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	33
3.1.1	Myokardiale Ischämie mit Reperfusion am Herzen der Ratte	33
3.1.2	Isolierung und Kultivierung von EPDC aus infarzierten Rattenherzen (rEPDC)	34
3.1.3	Isolierung von glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta.....	35
3.2	Isolierung von humanen stromalen Zellen (hSC) aus atrialen Biopsien	35
3.3	Phänotypisierung und Quantifizierung von hSC	36
3.3.1	Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit von hSC <i>in vitro</i>	36
3.3.2	Berechnung der Anzahl an hSC pro µg Gewicht aus atrialen humanen Biopsien	37
3.3.3	Kryokonservierung	37
3.4	Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)	37
3.5	Immunfluoreszenzanalyse von hSC	38
3.5.1	Anfertigen von Kryoschnitten von humanen Biopsien	38
3.5.2	Kultivierung von hSC auf Deckgläschen	39
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	39
3.5.4	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung	39
3.6	Durchflusszytometrische Zellanalyse.....	40
3.6.1	Analyse von Oberflächenproteinen	40
3.6.2	Datenauswertung	41
3.7	Quantifizierung der mRNA-Expression von hSC und hMSC.....	41
3.7.1	Isolierung von RNA	42
3.7.2	Reverse Transkription	43
3.7.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	43
3.7.4	Analyse und Vergleich der mRNA-Konzentration	43

3.8	Bestimmung der Endozytose von hSC und hMSC.....	44
3.8.1	Herstellung von Nanopartikeln.....	44
3.8.2	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	44
3.8.3	Analyse mittels Durchflusszytometrie	45
3.8.4	Analyse mittels ¹⁹ F-Magnetresonanztomographie (MRI)	45
3.9	Analyse der zellulären Zytokinsekretion bei hSC und hMSC nach Stimulation mit A2A- oder A2B-Rezeptoragonisten	46
3.10	Nachweis der funktionellen Rezeptoren für IL-6 und IL-11 bei hSC	47
3.10.1	Stimulation der hSC mit IL-6 und IL-11	47
3.10.2	BCA-Assay.....	48
3.10.3	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	48
3.11	Oberflächenproteomanalyse von hSC und rEPDC.....	51
3.11.1	Biotinylierung von hSC.....	51
3.11.2	Bestimmung der Protein-Biotinylierung mittels Silberfärbung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie	52
3.11.3	Massenspektrometrie mit Nano-Elektrospray-Ionisation (ESI)	54
3.11.4	Proteinidentifikation und Datenanalyse	55
3.12	Immortalisierung von hSC	56
3.12.1	Plasmidamplifikation und -isolierung	56
3.12.2	Analyse der Plasmide	57
3.12.3	Herstellung von Lentiviren.....	58
3.12.4	Lentivirale Transduktion von hSC und Antibiotikaselektion.....	59
4	Ergebnisse	60
4.1	Gewinnung und Charakterisierung von hSC aus atrialen Biopsien.....	60
4.1.1	Isolierung und Kultivierung von hSC.....	61
4.1.2	Basale Charakterisierung stromaler Vorhofzellen.....	62
4.1.3	Weitergehende Charakterisierung von hSC aus gesamtatrialem Gewebe mit optimiertem Protokoll.....	69
4.1.4	Immortalisierung von hSC durch lentivirale Transfektion.....	76
4.1.5	Basale Charakterisierung von mit hTERT immortalisierten hSC der Biopsie 35	80

4.2	Analyse des kardioregenerativen Potentials von hSC	83
4.2.1	Endozytosepotential von hSC.....	83
4.2.2	Vergleich von Markergenen und –proteinen bei hSC und hMSC.....	86
4.2.3	Zytokinsekretion von hSC.....	89
4.2.4	Untersuchung der Zytokinregulation über Adenosin- rezeptorsignalwege	93
4.2.5	Analyse des Oberflächenproteoms von hSC	99
5	Diskussion	103
5.1	Die Regeneration des Herzens.....	103
5.1.1	Stammzelltherapie zur Regeneration des Herzens	103
5.1.2	Gegenwärtiger Stand der Forschung	104
5.2	Epikardiale Zellen des Atriums	105
5.2.1	Die verschiedenen Zellen des Herzens.....	107
5.2.2	Einfluss von atrialen EPDC auf Remodelingprozesse	109
5.2.3	Stromale Zellen des Atriums	111
5.3	Sekretorisches Potential der hSC.....	116
5.3.1	Die basale Zytokinsekretion.....	117
5.3.2	Die Adenosin vermittelte Sekretion von Zytokinen	120
5.4	Differenzierungspotential von hSC	122
5.4.1	Markeranalyse der hSC	122
5.4.2	Mögliche funktionelle Bedeutung ausgewählter Oberflächenproteine	126
5.5	Ausblick	129
6	Literaturverzeichnis.....	130
Anhang		160
I.	Plasmidkarten	160
II.	Anonymisierte Patientendaten.....	163
III.	Danksagung	164
IV.	Eidesstattliche Erklärung.....	165

1 Einleitung

1.1 Embryonalentwicklung des Herzens unter besonderer Berücksichtigung der proepikardialen Stammzellen

Das adulte Herz von Wirbeltieren besteht aus dem Endokardium auf der Innenseite, dem Myokardium und dem Epikardium, welches das Herz auf der Außenseite als epitheliale Einzelzellschicht bedeckt und über subepikardiales Bindegewebe mit dem Myokardium verbunden ist. Dabei bildet das Epikardium eine glatte Oberfläche aus, welche zu der optimalen Bewegungsfreiheit des Herzens im Herzbeutel beiträgt.

Die Entwicklung des Herzens beginnt mit der Entstehung des primitiven Herzschlauches [1]. Kurz nach der Ausbildung wird dieser von einer Zellschicht überzogen, die das Epikardium ausbildet [2-4]. Weiterhin migrieren Zellen der neuralen Platte zum Herzen und scheinen dort eine wichtige unterstützende Rolle bei der Herzentwicklung, insbesondere der Koronargefäße, zu spielen (s. Abb. 1.1) [5, 6].

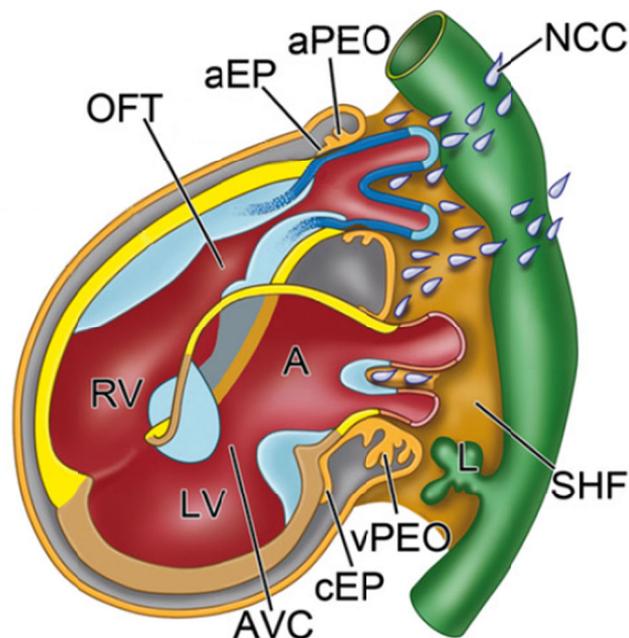


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des sich entwickelnden Herzens sowie der Entstehung des Epikardiums aus dem proepikardialen Organ.

Das Herz entwickelt sich aus Zellen des Mesoderms. Kardiale Vorläuferzellen bilden das erste und zweite Herzfeld (SHF) aus und formen den linken (LV) und rechten Ventrikel (RV) sowie das Atrium (A). Dabei haben sowohl einwandernde Zellen der neuralen Platte (NCC) als auch das Leberprimordium (L) einen Einfluss. Das Epikardium entwickelt sich aus dem proepikardialen Organ des arteriellen (aPEO) und venösen Pols (vPEO). Modifiziert nach [7].

Die Zellen des Epikardiums entstehen aus einer extrakardialen, mesodermalen Zellpopulation, welche einen Vorsprung, das Proepikardium (PE), gegenüberliegend des Sino-Atriums ausbilden [2-4, 8-10]. Das Epikardium wird dabei sowohl von dem proepikardialen Organ des arteriellen Pols (aPEO) als auch vom proepikardialen Organ des venösen Pols (vPEO) aus erzeugt (s. Abb. 1.1)[7]. Die Rolle des Epikardiums in der Entwicklung seiner Differenzierung aus dem proepikardialen Organ (PEO) und der Differenzierung des kardialen Epikardiums (cEP) zu *epicardium derived cells* (EPDC) ist in verschiedenen Reviews ausführlich beschrieben worden [7, 11].

Über den embryonalen Ursprung des Proepikardiums ist vergleichsweise wenig bekannt. Es besteht aus wenigstens zwei unterschiedlichen Zellpopulationen, dem mesothelialen Epithelium und dem myokardialen Kern, welcher viel extrazelluläre Matrix aufweist [10]. Das PEO ist ein evolutionäres Überbleibsel des pronephritischen Systems [12]. Aus diesem Grund beinhaltet es eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen wie die Zellen des Mesoderms. Hierdurch erklärt sich die Expression von dem nephritischen System zugeordneten Genprodukten wie dem Wilms Tumor 1 Suppressor-Gen (WT1), Podoplanin und Epikardin (Pod1) im venösen als auch im arteriellen Pol, sowie in den sich ausbreitenden cEP und PEO am atrialen Pol (aEP) [12-14].

Hierbei unterscheidet sich das aEP sowohl strukturell als auch immunohistochemisch vom cEP [15]. In der basalen Region des PE, gegenüber dem *sinus venosus*, liegt eine Schicht von kuboidalen Zellen, welche mit den mesenchymalen Zellen über zelluläre Ausläufer verbunden sind [10]. Obgleich das PE in der Nähe des Sinusmyokardiums entsteht, ist es möglich, dass es sich aus dem Randbereich des Herzfeldes heraus entwickelt [16, 17].

Mittels *Cell tracking* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Zellen des Proepikardiums aus *Mesp1*-exprimierenden Zellen hervorgehen, welche ebenfalls in myokardialen und endokardialen Zellen exprimiert werden [18]. Weiterhin wurde in der Maus nachgewiesen, dass in proepikardialen Zellen nicht nur die Stammzellmarker *Isl1* und *Nkx2.5*, sondern auch myokardiale und mesotheliale Marker exprimiert werden [19, 20].

Vom PEO aus migrieren proepikardiale Zellen zum Herz. Dies geschieht vor allem über multivesikuläre Vesikel oder Villi [21]. Dabei entwickelt das PE kurze Auswüchse, welche sich in proepikardiale Zysten umwandeln. Diese können sich durch Herzwachstum oder Bewegung vom perikardialen Mesothelium lösen und als multizelluläre Vesikel oder Villi in zufälligen Kontakt mit der Oberfläche des Myokardiums treten [3, 22].

Bei Berührung mit dem Myokardium öffnen sich die multivesikulären Vesikel oder Villi und es kommt zu einer Ausbreitung der Epikardzellen als Zellschicht auf der Oberfläche des Myokardiums, wobei die vorherige apikale Seite der Epikardzellen nun in Richtung des Perikards ausgerichtet ist [10]. Durch Fusion der so entstehenden Epithelzellecken wird das Myokard vollständig bedeckt. Im Gegensatz zum Epikardium des Myokardiums entsteht das Epikardium des Atriums durch Migration der Epithelzellen vom Sinus.

Während sich die Zellen des Proepikardiums über dem Myokardiums ausbreiten, macht eine Subpopulation der proepikardialen und epikardialen Zellen eine epitheliale zu mesenchymale Transition (EMT) durch, wobei diese epikardialen Zellen (EPDC) ihren epithelialen Kontakt verlieren und in den proepikardialen Raum migrieren [3, 23-25]. Dazu konnte gezeigt werden, dass sowohl *fibroblast growth factor* (FGF) als auch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) die EMT von epikardialen Zellen *in vitro* stimulieren [26].

Bisher ist nicht bekannt, ob alle epikardialen Zellen in der Lage sind, eine EMT zu durchlaufen und sich zu EPDC entwickeln können. Eine epikardiale Heterogenität mit einer Untergruppe von Zellen, welche die initiale EMT durchlaufen und das Myokardium mit interstitiellen Fibroblasten versorgen, wird diskutiert [23, 27, 28]). Die epikardiale EMT konnte sowohl an der AV-Schnittstelle, dem ventrikulären Epikardium sowie dem Epikardium der Schnittstelle von Ventrikel und Ausflusstrakt, jedoch nicht bei dem Epikardium des Atriums beobachtet werden [29]. Die nach epikardialer EMT in den proepikardialen Raum migrierten EPDC differenzieren dort in eine Vielzahl unterschiedlicher myokardialer Zelltypen.

Die Gründe für die unterschiedlichen Differenzierungsrichtungen sind bislang unbekannt; vermutet werden jedoch Abhängigkeiten von der Umgebung sowie von Wachstumsfaktoren. Dazu konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Zellen aus proepikardialen Explantaten eine kardiale Differenzierung *in vitro* durchlaufen können. Dabei wurde die spontane Bildung von Myozyten in Anwesenheit von Serum beobachtet [20]. Im Gegensatz dazu konnte unter serumfreien Bedingungen eine Differenzierung zu kardialen Myozyten nur nach Zugabe von *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) oder Noggin nachgewiesen werden [30]. Neben der Differenzierung von EPDC zu myokardialen Zellen stellt das Epikardium Zellen der koronaren Blutgefäße und des Bindegewebes zur Verfügung [31-35].

Sobald EPDC in das Myokardium migrieren, beginnt das kompakte Myokardium sich zu entwickeln. Experimente an Herzen von adulten Zebrafischen konnten zeigen, dass die Proliferation des Myokardiums sowohl von endokardialen als auch von epikardialen Signalen wie Raldh2 abhängig ist [36]. Weiterhin wird das Epikardium von Erythropoetin (EPO) beeinflusst, welches durch die Induktion von Leberendothelzellen mit Retinsäure (RA) entsteht. Dies führt zu einer erhöhten Expression von insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) im Epikardium, wodurch die Bildung von kompaktem Myokardium angeregt wird [37]. Sowohl im Mausmodell als auch bei Vögeln konnte gezeigt werden, dass eine normale Entwicklung des kompakten Myokardiums von der Interaktion zwischen Kardiomyozyten, EPDC und extrazellulärer Matrix (ECM) abhängig ist [13, 38, 39]. Parakrine Signale aus dem sich entwickelnden Epikardium spielen dabei eine entscheidende Rolle für das Wachstum des Myokardiums während der Herzentwicklung [40, 41].

Eine Störung des epikardialen Wachstums, der EMT oder der Migration der EPDC führt zu schweren Schädigungen wie einer Hyperplasie des kompakten Myokardiums [38]. Dies konnte experimentell bei verschiedenen Mutanten in Wachstumsfaktoren und -rezeptoren oder Signalmolekülen, wie *platelet derived growth factor receptor α* (PDGFR α), Podoplanin oder WT1 nachgewiesen werden [13, 39, 42] [43].

Mit dem Beginn der atrialen Perfusion des koronaren Mikrogefäßsystems umschließen migrierte EPDC die Hauptgefäße und differenzieren in Zellen der glatten Muskulatur (SMC), welche essenziell für die folgende Differenzierung in einen arteriellen Phänotyp sind. Hierbei spielen Signale von PDGFB/PDGFR β sowie Notch eine entscheidende Rolle [33, 42, 44-48]. Verschiedene Gene der FGF-Familie werden im Einflusstrakt des Myokardiums und dem Proepikardium exprimiert [20, 30]. Dabei werden *FGF8* im Einflusstrakt des Myokardiums, *FGF2* und *FGF10* im Proepikardium exprimiert. Die Blockierung der FGF-Genexpression *in vivo* verhindert die Ausbildung von Auswüchsen aus dem Proepikardium, wobei jedoch die allgemeine Expression epikardialer Gene erhalten bleibt. Hieraus lässt sich folgern, dass FGF eine autokrine Rolle besitzt, welche das Überleben und das epitheliale Wachstum beeinflussen, jedoch nicht in die Spezifizierung der proepikardialen Zellen eingreift.

Untersuchungen am Hühnerembryo konnten zeigen, dass die durch den FGF-Rezeptor vermittelten Signale einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation von Myozyten in dem sich entwickelnden Herz besitzen [49, 50]. Bestätigt wurde dies durch *knockout*-Experimente mit dem FGF-Rezeptor in der Maus [41].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die epikardiale Sekretion von FGF durch RA, einem Mitogen für myokardiale Proliferation, induziert wird [51, 52].

In Versuchen mit Küken konnte die Expression des Transkriptionsfaktors *TBX5* im Proepikardium nachgewiesen werden. Bei Retrovirus-vermitteltem *knockdown* von *TBX5* konnten keine proepikardialen Auswüchse oder ihre Fusion mit dem entstehenden Epikardium oder dem Koronarsystem beobachtet werden [53]. Weiterhin konnte *TBX18* als einer der frühesten Marker für die proepikardiale Entwicklung identifiziert werden [30].

1.2 Reaktivierung von EPDC nach Herzinfarkt

Das Herz pumpt durch seine rhythmische Kontraktion Blut durch den gesamten Körper und versorgt dadurch Organe und Gewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen. Dabei versorgt es sich selbst über die beiden Koronararterien, welche oberhalb der Aortenklappe entspringen und sich kranzförmig um das Herz ziehen, um sich dann immer weiter zu verästeln. Durch diese starke Kapillarisation kann der hohe Sauerstoffbedarf der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) durch geringe Diffusionswege gedeckt werden [54].

Kommt es jedoch zu einer Verengung oder einem Verschluss eines größeren Gefäßes, wird das nachgeschaltete Gewebe nicht oder nur noch unzureichend versorgt (Ischämie) (s. Abb. 1.2), wodurch das betroffene Gewebe infolge des Sauerstoffmangels abstirbt [55].

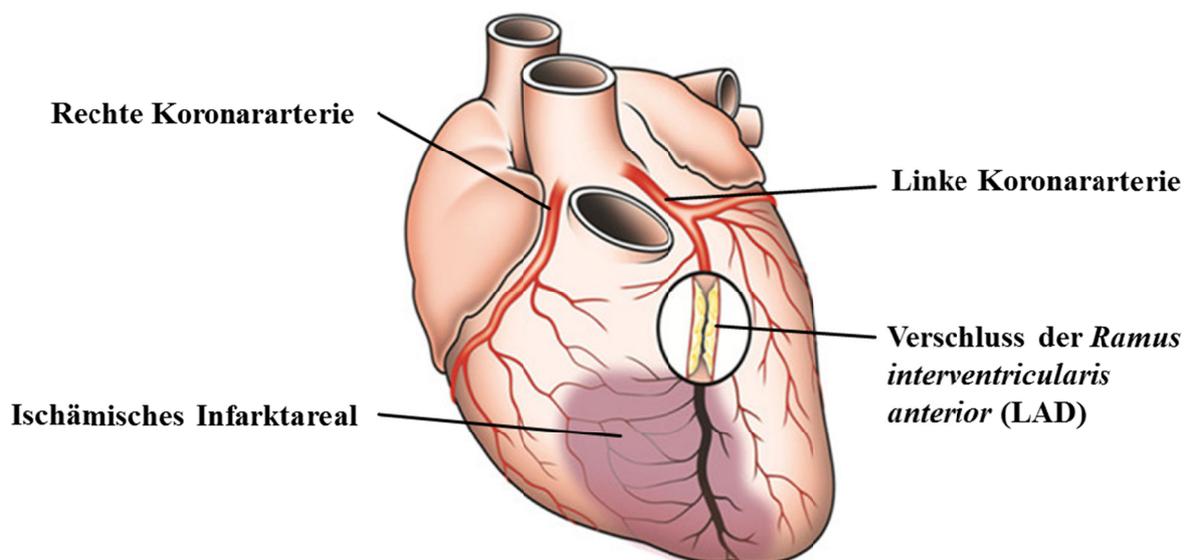


Abb. 1.2: Skizze des Herzens einschließlich eines Gefäßverschlusses eines Zweiges der linken Koronararterie (*Ramus interventricularis anterior* (RIVA, engl.: *left anterior descending*, LAD) aufgrund einer arteriosklerotischen Läsion.

Das Herz besitzt eine starke Kapillarisation, um den hohen Sauerstoffbedarf der Kardiomyozyten decken zu können. Bei einem Verschluss oder einer Verengung eines größeren Gefäßes kommt es zu einem Absterben des nachgeschalteten Gewebes (dunkel dargestellt). Modifiziert nach [56].

Ischämische Herzerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen weltweit, obwohl es bei der Behandlung eines akuten Herzinfarktes in den letzten Jahren große Fortschritte gegeben hat [57-60]. Die Ursache hierfür ist, dass Patienten zwar durch eine frühzeitige Öffnung des verschlossenen Gefäßes (Reperfusion) die akute Phase des Infarktes deutlich öfter überleben, trotzdem durch die bereits entstandene Schädigung des Gewebes, insbesondere der Kardiomyozyten, eine dauerhafte Leistungseinschränkung des Herzens hinnehmen müssen, was langfristig zu einer Herzinsuffizienz führen kann [61-64]. Hierbei ist die Leistungsreduktion vor allem vom myokardialen Heilungsverlauf nach dem Infarkt abhängig [65, 66]. Der Verlauf der Heilung umfasst dabei mehrere, zeitlich ineinandergreifende Prozesse, von denen die wichtigsten im Folgenden erläutert werden.

1.2.1 Pathophysiologie des Herzinfarktes

Für die Versorgung des Körpers mit Blut ist die gerichtete rhythmische Kontraktion des Herzens unerlässlich. Diese wird durch die Kontraktion der einzelnen Kardiomyozyten verursacht, welche die Energie für diesen Prozess aus oxidativer Phosphorylierung beziehen [67, 68]. Kommt bei einer Okklusion eines Blutgefäßes die Sauerstoffversorgung zum Erliegen, bricht auch die mitochondriale Bildung von ATP zusammen. Kurzzeitig kann die Zelle über eine Aktivierung der anaeroben Glykolyse diesen Verlust teilweise kompensieren, langfristig resultiert daraus jedoch eine Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration [69-74].

Durch abnehmende Energieversorgung sowie aufgrund des durch Akkumulation von Laktat absinkenden pH-Wertes kommt es zu einer Veränderung im intrazellulären Ionenhaushalt und schlussendlich zum Zelltod [74]. Dabei werden, um den sinkenden pH-Wert zu kompensieren, Protonen über den Na^+/H^+ -Austauscher aus der Zelle heraustransportiert, wodurch die intrazelluläre Na^+ -Konzentration stark ansteigt [75, 76]. Dadurch wird wiederum ein $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschmechanismus aktiviert, aufgrund dessen Na^+ aus der Zelle heraus- und Ca^{2+} in die Zelle hineingeschleust wird [76-78]. Durch das einströmende Ca^{2+} kommt es in der Zelle zu einer Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteasen, welche durch den Abbau von wichtigen Proteinen des Zytoskeletts, des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien den Zelltod einleiten [79-82].

Durch frühzeitiges Wiederherstellen der Blutversorgung (Reperfusion) kann dieser Prozess zwar teilweise aufgehalten und das Infarktareal minimiert werden, es kann jedoch zu einer weiteren Schädigung des Herzens, den sogenannten Reperfusionsschäden kommen [83, 84].

Die Gründe hierfür sind vielfältig. Zum einen führt der Einstrom von Sauerstoff zu einer Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche durch die Oxidation von Lipiden, Proteinen und DNA die Zelle schädigen [85]. Zum anderen führt die schnelle Normalisierung des extrazellulären pH-Wertes zu einem großen H^+ -Konzentrationsgradienten an der Zellmembran, was einen schnellen Efflux von intrazellulären Protonen zur Folge hat. Dies wiederum verstärkt den beschriebenen Effekt des Na^+ - und Ca^{2+} -Einstroms und die resultierende Aktivierung von intrazellulären Proteasen [78].

Durch diese beiden Prozesse kommt es zur Öffnung einer großen, nichtselektiven Pore in der Mitochondrienmembran (*mitochondrial permeability transition pore*), durch welche Protonen frei diffundieren können. Dies resultiert im Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wodurch die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen kommt und der zelluläre ATP-Mangel verstärkt wird [86]. Zusammen bewirken diese Vorgänge einen Zelltod durch Nekrose oder Apoptose, wobei in den ersten 24 Stunden nach Infarkt der Zelltod von Kardiomyozyten vor allem durch Nekrose, in den folgenden Tagen zunehmend durch Apoptose ausgelöst wird [87-90].

Dabei unterscheidet sich der Zelltod durch Apoptose und Nekrose unter anderem darin, dass bei Nekrose der Zellinhalt in das umliegende Gewebe ausgeschüttet und dabei intrazelluläre Gefahrensignale (*damage associated molecular patterns*, DAMPs) freigesetzt werden. Diese Signale lösen wiederum eine Entzündungsreaktion aus, welche aufgrund der Abwesenheit von pathogenen Erregern als „sterile Entzündung“ bezeichnet wird [91]. Apoptotische Zellen können jedoch ebenfalls zu einer Rekrutierung von Immunzellen beitragen, indem sie proinflammatorische Signalmoleküle, wie z. B. ATP, freisetzen [92].

Im weiteren Verlauf der Wundheilung nach einem Herzinfarkt kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die durch unterschiedliche Faktoren hervorgerufen wird. Neben den durch nekrotische Zellen ausgeschütteten DAMPs und Fragmenten der extrazellulären Matrix, die sowohl das Komplementsystem als auch *Toll-like*-Rezeptoren aktivieren, induzieren ROS die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen über die Aktivierung von NF- κ B oder vermitteln die Bildung des sogenannten Inflammasoms [93-96].

Hierbei handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, welcher über die Aktivierung von Caspase-1 sowohl Prozessierung als auch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 β (IL-1 β) bewirkt und die Entzündungsreaktion nach Ischämie mit Reperfusion (I/R) verstärkt [97]. Eingewanderte Immunzellen, wie z. B. neutrophile Granulozyten, phagozytieren sowohl tote Zellen als auch Zellreste und setzen zusätzlich Matrix-degradierende Enzyme (Matrix-Metalloproteasen, MMPs) frei, welche zur Beseitigung von zerstörten Matrix- und Zellbestandteilen beitragen [98, 99]. Allerdings können durch dabei freiwerdende toxische Moleküle wie ROS und proteolytische Enzyme die umliegenden Zellen geschädigt werden [100].

Nach der Beseitigung von nekrotischen Zellen und Zelltrümmern durch Immunzellen kommt es zu einer Ausbildung eines stabilen und stark vaskularisierten Ersatzgewebes, welches insbesondere aus proliferierenden Endothelzellen und ECM-produzierenden Myofibroblasten gebildet wird [99]. Weiterhin sezernieren akkumulierte Immunzellen antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und *transforming growth factor- β* (TGF- β), wodurch der Übergang von der Entzündungs- zur Proliferations- und Heilungsphase vermittelt wird [101, 102].

Zusätzlich werden Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, welche die Fibroblastenproliferation und Angiogenese fördern [99]. So stimuliert TGF- β in Kombination mit bestimmten Matrixproteinen unter dem Einfluss von mechanischem Stress die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [102, 103]. Im Gegensatz zu Fibroblasten exprimieren Myofibroblasten *α -smooth muscle actin* (α -SMA) und sind zur Kontraktion fähig [104]. Weiterhin können Myofibroblasten in das Infarktareal einwandern und dort durch Wachstumsfaktoren und Zytokine zur Proliferation und Produktion von Matrixproteinen wie Prokollagenen angeregt werden [103].

Diese Prokollagene werden durch Prokollagen-Peptidasen zu Kollagen umgewandelt und tragen dadurch zur Ausbildung einer stabilen Narbe bei [103, 105]. Dabei wird zunächst durch die Sekretion der Myofibroblasten ein lockeres Netzwerk aus Kollagen Typ III ausgebildet, welches dem Herzmuskel eine gewisse Elastizität verleiht, jedoch mechanisch nicht besonders stabil ist [106, 107]. Im späteren Verlauf wird dies dann durch dicht gepacktes Kollagen I ersetzt, das die mechanische Stabilität der Infarktnarbe steigert [103, 105].

Zusätzlich zu der Synthese von Matrixproteinen wird die Blutgefäßneubildung (Angiogenese) angeregt [99, 108]. Dabei spielen die u. a. von Monozyten und Makrophagen sezernierten Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF eine entscheidende Rolle [109, 110].

Darüber hinaus kann die Angiogenese auch durch MMPs gefördert werden, indem Matrix-gebundene proangiogenetische Faktoren bei der Degradation von extrazellulärer Matrix freigesetzt werden [111]. Die bei der Angiogenese entstehenden Mikrogefäße bilden sich an am Außenrand des Infarktareals liegenden Blutgefäßen, durchziehen das geschädigte Areal und versorgen dadurch die an der Wundheilung beteiligten Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen [112].

In der letzten Phase der Wundheilung verringert sich die Kapillardichte und Zellzahl in der gebildeten Infarktnarbe aufgrund von gezielter Apoptose der meisten Myofibroblasten und der beteiligten Immunzellen [108, 113]. Zusätzlich führt eine erhöhte Aktivität von Lysyloxidase, einem Enzym, welches die Quervernetzung von fibrillärem Kollagen katalysiert, zur Ausbildung eines widerstandsfähigen und reißfesten Narbengewebes im Infarktgebiet [114-116].

Auch wenn das geschädigte Areal dadurch stabilisiert und das Herz vor einer Ruptur bewahrt wird, so führt die resultierende Steifigkeit des Ventrikels zu einer verringerten Kontraktilität und damit zu einer eingeschränkten Pumpfunktion, was eine Herzinsuffizienz zur Folge haben kann [114, 115, 117]. Im Gegensatz zu Zebrafischen und Molchen kann das Myokardium im Säugetierherz nicht vollständig regeneriert werden, da aufgrund der geringen Proliferation von Kardiomyozyten die aus fibrotischen Zellen bestehende Narbe nicht ausreichend schnell durch neue Kardiomyozyten ersetzt wird [118-121].

Aus diesem Grund stehen die Verwendung von endogenen und exogenen Stammzellen und ihre Differenzierung zu Kardiomyozyten im Fokus der aktuellen kardiovaskulären Forschung. Versuche mit embryonalen Stammzellen, Stammzellen aus dem Knochenmark (BM-MSC), mesenchymalen Stammzellen (MSC) und induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) zeigten jedoch nur moderate Verbesserungen [122-125]. Im Gegensatz dazu scheint das Epikardium eine viel versprechende Quelle für endogene kardiale Progenitorzellen zu sein, da die hier angesiedelten Zellen während der Embryogenese maßgeblich an der funktionellen Entwicklung des Herzens beteiligt sind [19, 122, 126-133]. Die gezielte Aktivierung dieser Stammzellen könnte daher einen bedeutenden Beitrag für die Regeneration des abgestorbenen Myokardiums nach Infarkt darstellen [134].

1.2.2 Adulte epikardiale Stammzellen

EPDC spielen - wie oben bereits ausgeführt wurde - eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung des Herzens. Diese Zellen befinden sich nach der Geburt in einem Ruhezustand als einschichtiges Plattenepithel, dem Epikardium [7]. Während wenig über die Rolle des Epikardium in der Homöostase des adulten Myokardiums bekannt ist, wurde beschrieben, dass bei einer ischämischen Schädigung des Herzens (s. Abb. 1.3) das embryonale Programm reaktiviert wird [135-137].

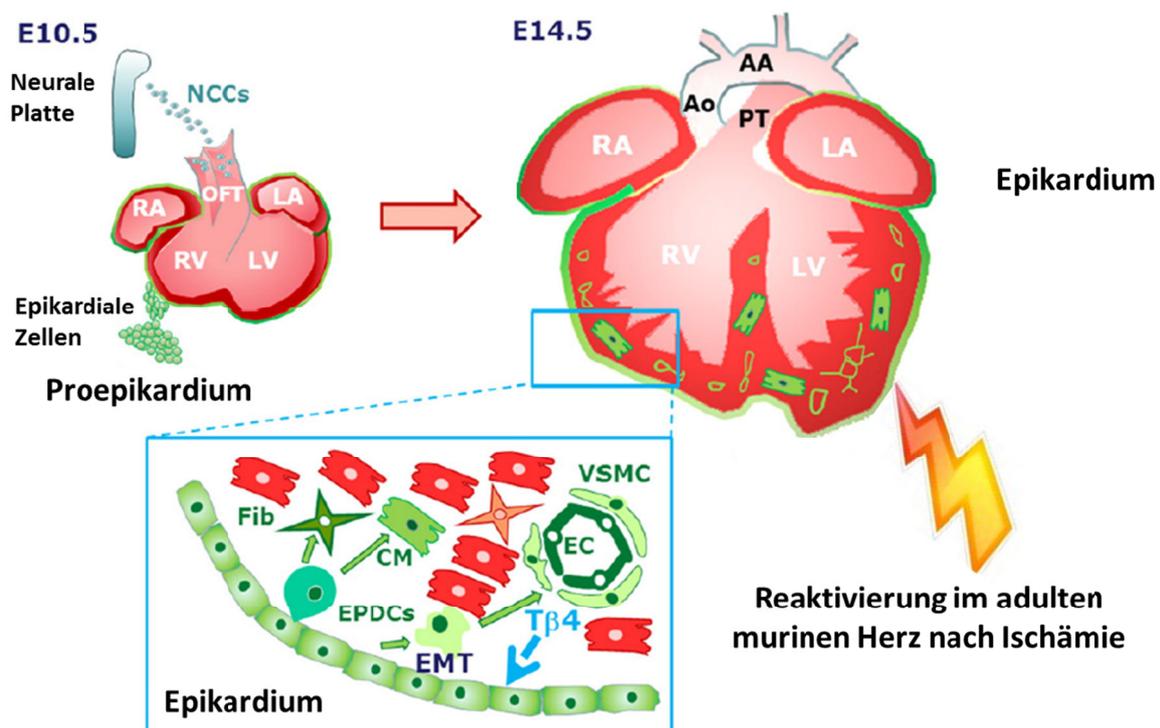


Abb. 1.3: Darstellung der Beteiligung von (pro)epikardialen Zellen an der Entwicklung des murinen Herzens

Zellen des Proepikardiums bilden während der Embryonalentwicklung eine Einzelzellschicht über dem Myokardium aus. Die durch EMT entstehenden EPDC migrieren in das Myokardium und differenzieren zu Fibroblasten, Endothelzellen, SMC sowie Kardiomyozyten. Im adulten Herzen kann dieses regenerative Potential durch MI reaktiviert werden. Modifiziert nach [138].

Zuerst beginnen die EPDC zu proliferieren, wodurch über dem Infarktbereich eine mehrschichtige Zellschicht entsteht [133, 139]. Dabei kann bei einer lokalen Schädigung sogar weit entferntes atriales Epikardium aktiviert werden [140]. In diesem Prozess exprimieren die EPDC kardiale embryonale Gene wie *WT1* oder *TBX18* [139].

Ein Teil der EPDC durchläuft bei der Aktivierung eine EMT, wodurch sich die Zellen analog zur Embryonalentwicklung aus dem Zellverband lösen und zu einer Migration in das Myokardium befähigt werden [139, 141].

Nach der Migration können die EPDC sowohl über Differenzierung, über Zell-Zell-Kontakte mit anderen kardialen Zellen als auch durch Sekretion von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu einer Regeneration des Herzens beitragen [133, 142, 143].

Dabei können entsprechend ihres embryonalen Potentials sowohl Endothelzellen, Fibroblasten und SMC als auch Kardiomyozyten gebildet werden, wobei die Differenzierung in Kardiomyozyten umstritten ist [7, 137, 139, 142, 144, 145].

1.3 Biologie der adulten EPDC

Reaktivierte adulte EPDC haben eine längliche, Fibroblasten-ähnliche Morphologie. Sie besitzen einen mesenchymalen Charakter, der sich auf Proteinebene in der Expression der mesenchymalen Marker CD73, CD90 und CD105 widerspiegelt [142, 146]. Weiterhin konnte eine Heterogenität der EPDC durch die partielle Expression von unterschiedlichen Stamm- bzw. Progenitorzellmarkern wie *stem cell antigen-1* (Sca-1), c-Kit (CD117) und CD44 ermittelt werden, weshalb EPDC oftmals je nach Art der Analyse in Subpopulationen aufgeteilt werden [135, 147, 148].

Ein entscheidender Marker für die Identifizierung von reaktivierten EPDC ist die Expression von WT1, ein Transkriptionsfaktor, der bereits während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielt und sowohl im Epikardium als auch bei in das Subepikardium migrierten Zellen nachgewiesen werden kann [149, 150]. Während das Fehlen von WT1 im Verlauf der Embryonalentwicklung zu einer fehlerhaften Ausbildung des Epikardiums führt, kommt es nach Migration von EPDC in das Herz zu einer Runterregulation von WT1 [14, 151].

Weitere wichtige Marker aus der Embryonalentwicklung sind Tbx5 und Tbx18, welche für die Migration sowie für die Ausbildung des Proepikardiums verantwortlich sind [30, 53, 152-154].

Ihre kardiale Zugehörigkeit zeigen EPDC durch die Expression kardialer Marker wie GATA4 und Nkx2.5, wodurch sich die Möglichkeit der Differenzierung in Kardiomyozyten ergibt [142, 144, 155]. Dabei sind GATA4 ebenso wie GATA5 und GATA6 bereits im Proepikardium zu finden und besitzen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung des Proepikardiums [156]. Ein später kardialer Marker, das kardiale Troponin T (cTnT), findet sich ebenfalls in EPDC und zeigt eine fortgeschrittene kardiale Differenzierung an [144].

Bei den EPDC handelt es sich folglich um eine heterogene Zellpopulation, wobei die daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen derzeit weitgehend unklar sind.

1.3.1 Autokrine und parakrine Zytokinsekretion

Sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch bei der regenerativen Wirkung nach einer ischämischen Schädigung des Herzens ist die Sekretion von verschiedensten Zytokinen durch EPDC von entscheidender Bedeutung [40, 41, 133, 157].

Unterschiedliche Studien zeigen, dass injizierte adulte EPDC sich nicht *in vivo* zu Kardiomyozyten differenzieren [133, 148, 158, 159]. Daraus wird allgemein geschlossen, dass der überwiegende Anteil der durch EPDC verursachten positiven reparativen Auswirkungen von durch EPDC sekretierte, parakrin wirkende Zytokine verursacht wird [133, 136, 148, 158, 159].

Ein wichtiger Faktor der Embryonalentwicklung ist RA, welches durch Genexpression von Retinaldehyd Dehydrogenase 2 (RALDH2) entsteht. Ohne RA kommt es zu einer fehlerhaften Entwicklung des Herzens, sowohl des Epikardiums als auch des Myokardiums [160, 161].

Als ein im Signalweg nachgelagertes Mitogen konnte der im Epikardium exprimierte *basic fibroblast growth factor* (FGF-2, bFGF) identifiziert werden [52]. FGF-2 ist ein parakriner Faktor, der die Umgestaltung des Herzgewebes über Aktivierung des MAPK-Signalweges fördert und einen Einfluss auf Proliferation, Überleben und Differenzierung unterschiedlicher Zellen hat [162, 163]. Weiterhin bewirkt FGF-2 die Entwicklung von mesodermalen Zellen zu einem kardialen Zelltyp während der Embryogenese [164-166]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass FGF-2 nach einer Schädigung des Herzens wie bei Ischämie/Reperfusion und bei dem folgenden *remodeling* des Herzgewebes erhöht ist [167]. Zusätzlich konnte im Tiermodell eine kardioprotektive Wirkung von FGF-2 nachgewiesen werden [168-170].

Ein entscheidender Faktor für die Regeneration des bei I/R geschädigten Areal ist die Revaskularisierung des abgestorbenen Gewebes. Ohne ausreichende Revaskularisierung kommt es zu einer mangelhaften Versorgung der an der Regeneration beteiligten Zellen mit Sauerstoff, wodurch das Absterben weiterer Kardiomyozyten, sowie eine Atrophie und Ausbildung einer interstitiellen Fibrose folgt [171-174].

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Gefäßen sowohl durch FGF-2 als auch durch VEGF (*vascular endothelial growth factor*) maßgeblich induziert wird [175, 176].

VEGF fördert Überleben, Migration und Proliferation von Endothelzellen durch die Aktivierung des Akt-Signalweges, wobei VEGF hauptsächlich mit den beiden Rezeptoren VEGFR-1 (*FMS-like tyrosine kinase-1*, Flt-1) und VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor*, KDR) interagiert [177]. Dabei wird VEGF auch von Kardiomyozyten exprimiert, wodurch bei einer Kardiomyozyten-spezifischen Deletion von VEGF eine verringerte Mikrovaskularisation folgt [178].

Da Kardiomyozyten auch Flt-1 und KDR exprimieren, hat dies bei Hypoxie, Hyperglykämie oder Hypoferrämie zur Folge, dass verstärkt exprimierte VEGF direkt auf die Kardiomyozyten wirken [179, 180].

Bei EPDC konnte die Expression des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) nachgewiesen werden [133, 181]. IL-6 wird oftmals bei Patienten mit Herzversagen nach Herzinfarkt als prognostischer Marker für Mortalität und Morbidität untersucht [182, 183]. Die Signalweiterleitung erfolgt über den IL-6-Rezeptor, was intrazellulär die Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) bewirkt. Dabei konnte den durch IL-6 ausgelösten Signalen eine kardioprotektive Wirkung sowie die Induktion von Neovaskularisation nachgewiesen werden [184-187]. Dadurch wurde bei Mäusen bei Überexpression von Kardiomyozyten-spezifischem STAT3 aufgrund einer erhöhten Kapillardichte in Kombination mit einer verstärkten Expression von VEGF und VE-Cadherin die Bedeutung von STAT3 für die Angiogenese gezeigt [186, 188]. Darüber hinaus wurde bei der Injektion des Komplexes aus IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor (sIL-6R) eine Inhibierung der Apoptose von Kardiomyozyten und eine daraus resultierende Reduzierung der Infarktgröße nach I/R beobachtet [189]. Jedoch sind für IL-6 auch negative Wirkungen beschrieben. So kann eine langfristig hohe Sekretion von IL-6 zu einer chronischen Entzündungsreaktion führen, die eine verstärkte Fibrose auslöst und eine Hypertrophie des Herzens hervorrufen kann [190-192].

Ein weiterer prognostischer Marker ist der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Erhöhte Mengen von TNF- α können bei Patienten mit Herzversagen in der Zirkulation detektiert werden [193, 194]. Bei Kardiomyozyten induziert TNF- α Apoptose, reduziert die Kontraktilität und führt zu einer Verringerung von sarkomeren Proteinen [195, 196].

Ein ebenfalls wichtiges Zytokin ist TGF- β , welches eine entscheidende Rolle bei der EMT der EPDC spielt [197, 198]. Zusätzlich fördert TGF- β die Differenzierung der EPDC zu Zellen der glatten Muskulatur [144, 199].

Einen weiteren positiven Einfluss auf Migration, Proliferation und Differenzierung von kardialen Stammzellen hat der Signalweg von *hepatocyte growth factor* (HGF)/(IGF-1) [200-202].

1.3.2 Differenzierungspotential von EPDC

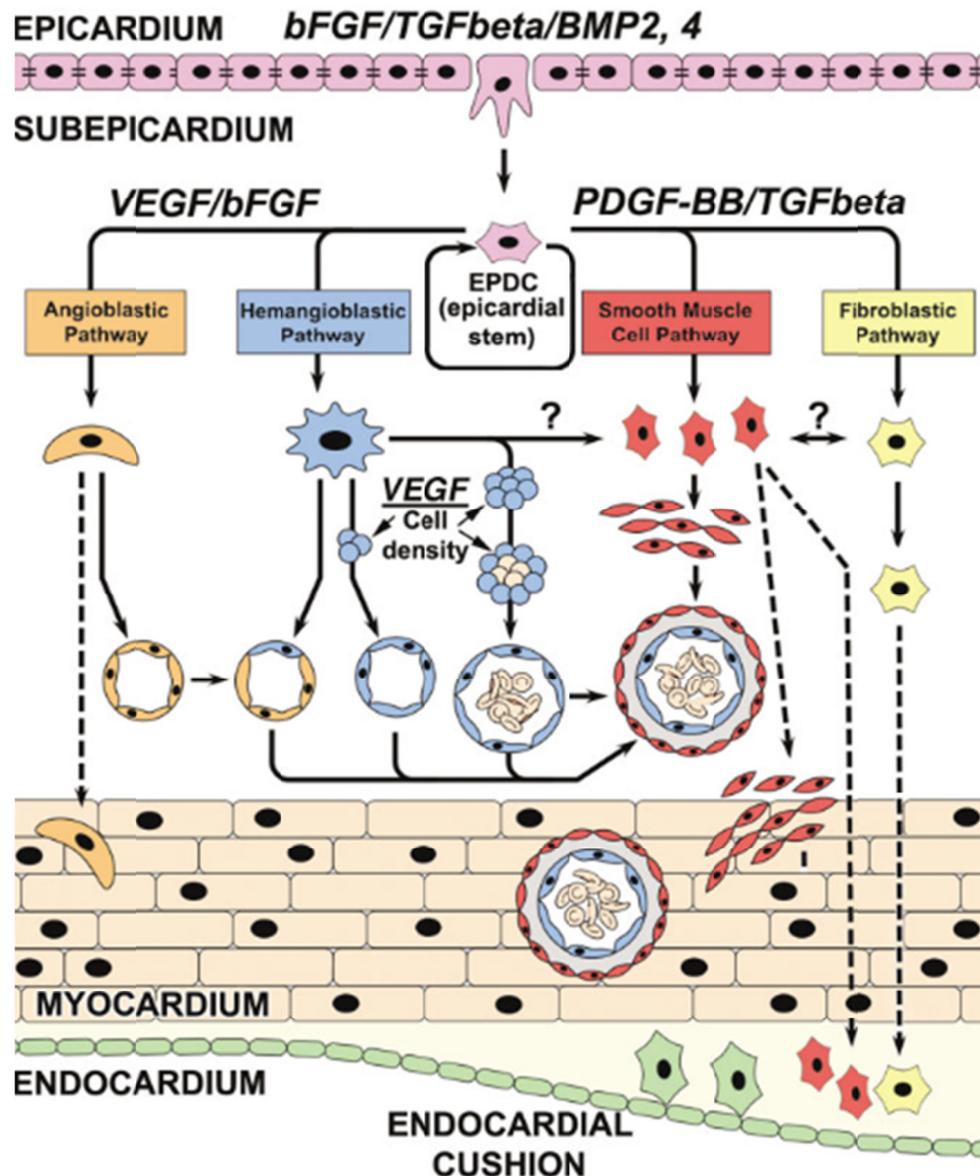


Abb. 1.4: Differenzierungswege von EPDC

Schematische Darstellung der vermuteten Differenzierung von EPDC sowie der Einflüsse von Wachstumsfaktoren. EPDC migrieren nach EMT in das Myokardium, wo sie zu unterschiedlichen Zelltypen differenzieren können [29].

Das Differenzierungspotential von EPDC sowie der durch die Differenzierung geleistete Beitrag an der Regeneration des Herzens nach Schädigung sind in Abbildung 1.4 im Überblick dargestellt. Grundsätzlich wäre es wünschenswert, wenn nach Schädigung des Herzens alle an der Struktur des Herzens beteiligten Zellen wieder gebildet werden.

Den Hauptbestandteil machen dabei Kardiomyozyten aus, die aufgrund ihrer Kontraktionsfähigkeit für die Pumpleistung hauptverantwortlich sind. Kardiale Fibroblasten geben dem Herzen strukturelle Stabilität und sind zusammen mit Kardiomyozyten der häufigste Zelltyp des Herzens [203, 204]. Glatte Muskelzellen (SMC) und Endothelzellen bilden die kardialen Gefäße und sind damit für die Sauerstoffversorgung des Gewebes von entscheidender Wichtigkeit.

Für EPDC konnte die spontane Differenzierung zu SMC unter Regulation des Notch-Signalweges und TGF- β *in vivo* im Mausmodell mit Tbx18 als Reporter gezeigt werden [199]. Bei MSC konnte eine Differenzierung zu SMC nach Stimulation mit TGF- β oder BMP-2 *in vitro* nachgewiesen werden [144]. Analog dazu wurde bei einer Stimulation mit BMP-2 *in vivo* eine Subpopulation im Proepikardium zur Bildung von Kardiomyozyten angeregt, jedoch scheinen die Zellen dieses Potential in Zellkultur zu verlieren [20, 30].

Ebenfalls konnte in einem transgenen Mausmodell eine Subpopulation von PDGFR α -positiven Zellen gefunden werden, welche sensitiv für die Differenzierung in SMC *in vivo* zu sein scheinen [205]. Die Differenzierung zu SMC wird dabei durch verschiedene Faktoren wie den *serum response factor* (SRF) sowie PDGFR β und seine Liganden gesteuert [42, 47, 206]. Weiterhin wurden *connective tissue growth factor* (CTGF) und VEGF als potentielle Mediatoren der Differenzierung von MSC zu Fibroblasten oder Endothelzellen identifiziert [207, 208]. Aufgrund des ähnlichen Transdifferenzierungspotentials von EPDC und MSC liegt die Vermutung nahe, dass auch EPDC durch Stimulation mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren gezielt differenziert werden können.

Eine Differenzierung von EPDC zu Fibroblasten und Myofibroblasten konnte in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden [19, 52, 209]. Weiterhin wurde gezeigt, dass mittels Retrovirus fluoreszenzmarkierte EPDC nach EMT in das Myokardium migrieren und dort einen myofibroblastartigen Phänotyp annehmen konnten [141]. Dies ist nicht verwunderlich, da bereits in der Embryonalentwicklung das Epikardium die Hauptquelle für Fibroblasten darstellt [27, 28, 209].

Die Differenzierung von adulten EPDC zu Kardiomyozyten ist umstritten. So wurde in verschiedenen Studien ohne Zugabe von speziellen Wachstumsfaktoren oder Modifikationen keine signifikante Differenzierung zu Kardiomyozyten *in vivo* oder *in vitro* detektiert.

In Mausstudien mit WT1 und Tbx18 als epikardialen Reportern wurde die Differenzierung eines Teils der EPDC in einen Zelltyp mit myokardialem Phänotyp bereits beschrieben [19, 209]. Jedoch wird die Aussagekraft der Studien bezweifelt, da auch Progenitorzellen von Kardiomyozyten aus dem zweiten Herzfeld positiv für WT1 sind [7, 28, 210]. Jedoch fand sich eine Differenzierung von EPDC zu Kardiomyozyten, sofern die Zellen zuvor mit Thymosin beta 4 (T β 4) behandelt wurden [137]. Zusätzlich induziert T β 4 die Bildung von SMC, Endothelzellen und Fibroblasten [211, 212]. Allerdings ist T β 4 nicht essenziell für die korrekte Entwicklung des Myokardium, weshalb seine Rolle bei der Differenzierung angezweifelt wurde [213].

Die Differenzierung von reaktivierten EPDC zu Endothelzellen nach MI konnte in verschiedenen Mausmodellen nicht nachgewiesen werden, wobei jedoch die Sekretion von angiogenetischen Faktoren wie VEGF und MCP1 gefunden wurde [133, 199]. Weiterhin wurde eine verbesserte Angiogenese und Arteriogenese detektiert, wenn EPDC nach MI mit T β 4 stimuliert wurden [211]. Eine andere Studie mit Mäusen konnte hingegen eine geringe Rate der Differenzierung von EPDC zu Endothelzellen zeigen, wobei hier ebenso wie bei Kardiomyozyten WT1 als Reporter verwendet wurde [139].

Es wird vermutet, dass die Differenzierung von EPDC zu Endothelzellen und SMC stark abhängig von Wachstumsfaktoren wie VEGF (Endothelzellen) und PDGFs (SMC) ist, wodurch bei der Embryonalentwicklung durch Konzentrationsgradienten der Faktoren die Ausbildung von funktionalen Gefäßsystemen mit Endothelzellen auf der Innenseite und der umschließenden SMC gesteuert wird [214, 215].

1.4 Purinerges Signalling

Die Modulation der Entzündungsreaktion spielt eine entscheidende Rolle bei der Wundheilung nach einem Herzinfarkt. Hierbei hat die Gruppe der extrazellulären Nukleotide und Nucleoside einen großen Einfluss, wobei vor allem dem Adenosin bei der Hemmung von inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle zukommt [216, 217].

Nukleotide und Nucleoside (s. Abb. 1.5) sind Grundbausteine von Nucleinsäuren und zentraler Bestandteil im Energiestoffwechsel aller Zellen. Sie erfüllen in der Zelle eine zentrale Funktion in der Signaltransduktion [218]. In chemischer Hinsicht ist das Nucleosid Adenosin ein Bestandteil von Adenosintriphosphat (ATP), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) und dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) (s. Abb. 1.5).

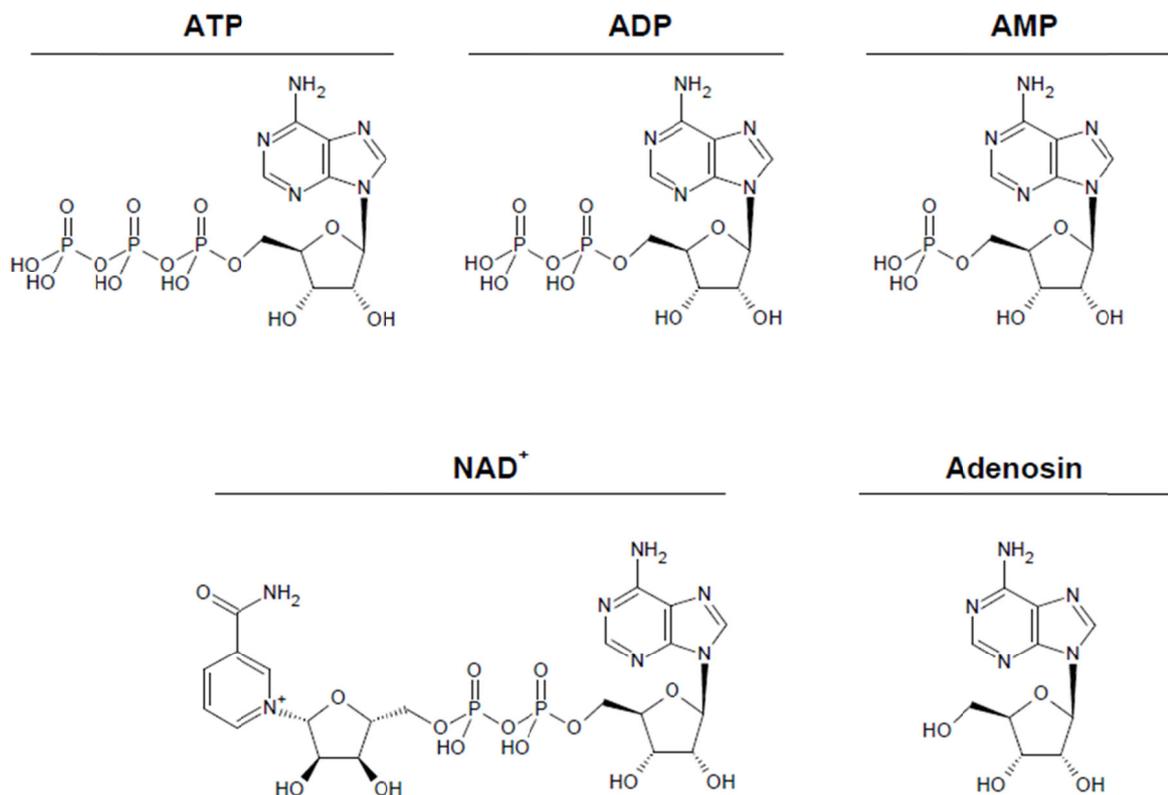


Abb. 1.5: Strukturformeln von Adenosin sowie einiger wichtiger Adenin-Nucleotide

ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, NAD^+ = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid [219].

Während ATP aufgrund seiner energiereichen Phosphorsäureanhydridbindungen einen wichtigen Energieträger und -lieferant des Stoffwechsels darstellt, ist NAD^+ als Koenzym an einer Reihe von zellulären Redoxreaktionen, wie z. B. der Glykolyse oder der Fettsäureoxidation, beteiligt [218].

Zusätzlich zu ihren intrazellulären Funktionen können Nukleotide und Nucleoside auch extrazellulär gebildet werden und dort bei unterschiedlichen physiologischen Prozessen als Signalmoleküle fungieren [220-222].

1.4.1 Die Ektonukleotidkaskade: CD73 und Adenosin

Der purinerge Stoffwechsel- und Signalweg umfasst eine Vielzahl an Kanälen, Transportern, Enzymen und Rezeptoren (s. Abb. 1.6).

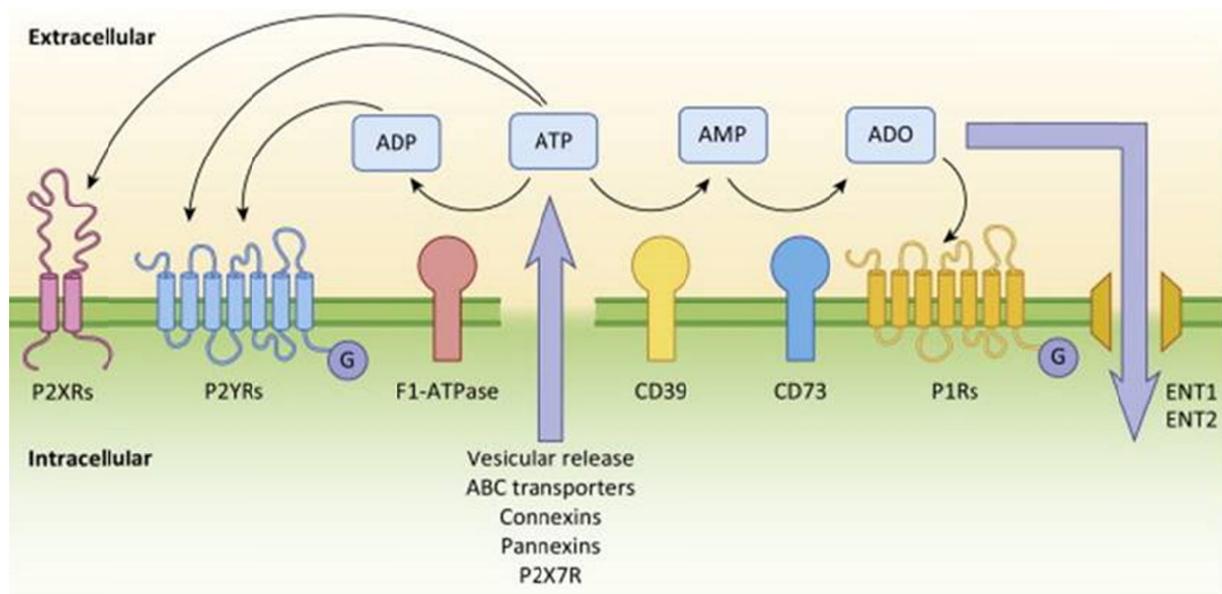


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des an purinergen Signalwegen beteiligten Rezeptoren sowie des Metabolismus von ATP auf der Zellmembran

ATP kann als Reaktion auf Ereignisse wie Stress, Zelltod oder Inflammation durch unterschiedliche Mechanismen aus der Zelle ausgeschleust werden. Im extrazellulären Raum wird ATP von Ektonucleasen wie CD39 hydrolysiert. Extrazelluläre Nucleotide können auf P2-Rezeptoren wirken, werden aber auch von Ektoenzymen wie CD73 weiter dephosphoryliert. Das entstehende Adenosin wirkt auf P1-Rezeptoren und kann über äquibrative Nucleosidtransporter (ENT) von Zellen aufgenommen werden [223].

Die Nucleotide ATP und NAD^+ können sowohl aktiv über nicht-lytische Mechanismen (Connexine, Pannexine) als auch passiv durch lytische Prozesse (Apoptose, Nekrose) freigesetzt werden. Dabei sind die extrazellulären Konzentrationen der beiden Nucleotide ATP und NAD^+ unter normalen physiologischen Bedingungen gering.

Mit ca. 0,1-0,3 μM ist die extrazelluläre Konzentration von NAD^+ mehr als 1000-fach geringer als die intrazelluläre Konzentration mit 0,3 mM [224-226].

Mit 1-10 nM extrazellulär und 1-10 mM intrazellulär ist für ATP der Konzentrationsgradient noch größer als der von NAD^+ [227]. Der basale Efflux von ATP aus der Zelle heraus beträgt dabei ca. 20-200 $\text{fmol} \cdot \text{min}^{-1}$ pro 10^6 Zellen *in vitro* [228].

Unter pathologischen Bedingungen wie einer Ischämie oder Entzündungsreaktion erfolgt eine gesteigerte Freisetzung an Nukleotiden in den Extrazellularraum, wobei neben der Freisetzung durch nekrotische oder apoptotische Zellen auch aktivierte Zellen kontrolliert Nukleotide freisetzen können [91, 229, 230]. Dabei erfolgt ein Transport der Nukleotide über Connexin- oder Pannexin-Halbkanäle, welche jeweils aus sechs Connexinen oder sechs Pannexinen bestehen und in der Mitte eine zentrale Pore ausbilden [231-234]. Zusätzlich werden Transportmechanismen über Anionenkanäle oder Vesikel diskutiert [235, 236].

Die Rezeptoren der purinergen Signalkaskade lassen sich in Adenosinrezeptoren (P1-Rezeptoren) und ATP-Rezeptoren (P2-Rezeptoren) einteilen. Dabei werden P2-Rezeptoren noch einmal in P2X-Rezeptoren (Liganden-aktivierte Ionenkanäle) und P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, GPCR) gegliedert [237].

Freigesetztes ATP wirkt primär auf P2-Rezeptoren und nach extrazellulärem Abbau auf P1-Rezeptoren. Eine Aktivierung von P2-Rezeptoren führt vorzugsweise zu einer Stimulation von inflammatorischen Signalkaskaden, wohingegen die Aktivierung von P1-Rezeptoren meist eine antiinflammatorische Wirkung vermittelt.

Da die extrazellulären Nukleotide einem ständigen Abbau durch membranständige Ektoenzyme unterliegen, die sowohl ATP als auch NAD^+ kaskadenförmig zu Adenosin umsetzen, ist das Ausmaß der P2-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion durch die Nukleotide unter anderem vom Vorkommen und von der Aktivität dieser Ektoenzyme abhängig [238].

Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDasen) hydrolisieren mit unterschiedlicher Präferenz sowohl Nukleotidtriphosphate (z. B. ATP) als auch Nukleotiddiphosphate (z. B. ADP) [239, 240]. Im Gegensatz zu den anderen membranständigen NTPDasen hydrolisiert die NTPDase1, auch als CD39 bezeichnet, extrazelluläres ATP direkt zu AMP [239, 241]. Dabei wird CD39 aufgrund seiner Lokalisation in der Nähe von P2Y-Rezeptoren eine Rolle bei der Regulation der Aktivierung dieser Rezeptoren zugeschrieben [242].

Das entstehende extrazelluläre AMP wird wiederum durch die Katalyse des Ektoenzym Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) zu Adenosin dephosphoryliert [243]. Bei diesem Schlüsselenzym für die Bildung von extrazellulärem Adenosin handelt es sich um ein über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) als Dimer verankertes Glykoprotein, wobei jedes Monomer aus zwei verschiedenen Domänen besteht [244].

Während die C-terminale Domäne die Bindestelle für das Nukleotid-Substrat beinhaltet, kann die N-terminale Domäne zwei Zinkionen binden, die für die katalytische Aktivität des Enzyms wichtig sind [245, 246]. Während AMP mit einem K_m -Wert von 1-50 μM das bevorzugte Substrat der CD73 ist, konnte auch die Hydrolyse von NAD^+ zu Adenosin gezeigt werden [247-249].

Neben CD73 können auch eine Reihe von alkalischen Phosphatasen (ALP) extrazelluläres AMP zu Adenosin umsetzen, wobei die Hydrolyse mit einem K_m -Wert von 441 μM für ALP1 deutlich ineffizienter ist als bei CD73 und ebenfalls andere Phosphatverbindungen wie ATP, ADP und cAMP hydrolysiert werden [238, 250]. ALP kommt neben dem Herz auch in anderen Organen wie Lunge und Leber vor. Bei CD73-defizienten Mäusen wurde hier jedoch deutlich weniger extrazelluläres Adenosin bzw. weniger AMPase-Aktivität gemessen, was die CD73 als Schlüsselenzym in der Entstehung von extrazellulärem Adenosin beweist [251, 252].

Da extrazelluläres Adenosin durch Bindung an P1-Rezeptoren entzündungshemmende Effekte einleiten kann, ist CD73 somit ein wichtiger Regulator in einer Vielzahl von inflammatorischen Prozessen [253]. Hierzu konnte im Mausmodell bei CD73-Defizienz eine verstärkte Infiltration von Immunzellen sowie eine verstärkte Schädigung des Gewebes bei arterieller Gefäßverletzung [254], I/R im Darm [255] oder Lungenschädigung [251, 256] festgestellt werden. Da CD73^{-/-}-Mäuse erst bei zusätzlicher Belastung wie Ischämie einen auffälligen Phänotyp besitzen, scheint die durch CD73 vermittelte Bildung von Adenosin insbesondere unter pathologischen Bedingungen zum Tragen zu kommen [241, 252].

Adenosin kann wiederum extrazellulär enzymatisch zerlegt oder über Transporter in die Zelle aufgenommen und erneut zu Nukleotiden aufgebaut werden.

Die Aufnahme von extrazellulärem Adenosin in die Zelle erfolgt über Nukleosidtransporter, wobei abhängig vom Transportmechanismus zwischen konzentrativen (CNTs, Kationen-abhängig) und äquibrativen (ENTs, Kationen-unabhängig) Nukleosidtransportern unterschieden werden kann [257, 258].

Gut charakterisierte äquibrative Transporter sind die *equilibrative nucleoside transporter* (ENT) 1 und 2, die sowohl verschiedene Purin- und Pyrimidinnukleoside als auch Nukleobasen (z. B. Hypoxanthin) transportieren können [258, 259]. Ihre Beteiligung an der Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration konnte im Mausmodell gezeigt werden, in dem bei ENT1- und ENT2-defizienten Mäusen eine deutlich erhöhte Adenosinkonzentrationen im Vergleich zum Wildtyp vorlag [260, 261].

Der Abbau von extrazellulärem Adenosin zu Inosin erfolgt über Adenosin-Desaminase (ADA), welche auf unterschiedlichen Zellen im Zytosol und als Ektoenzym auf der Oberfläche gefunden wurde [238, 262].

1.4.2 ATP- und Adenosinrezeptoren sowie ihre Signalwege

P2-Rezeptoren werden von nahezu allen Zelltypen exprimiert; es gibt insgesamt sieben P2X-Rezeptoren und acht P2Y-Rezeptoren [227, 263, 264].

P2X-Rezeptoren werden ausschließlich durch ATP aktiviert, wodurch vor allem proinflammatorische Signale ausgelöst werden. Dies geschieht durch eine Konformationsänderung der Rezeptoren bei der Bindung des Nukleotids. Dabei wird eine intrinsische Pore geöffnet, durch welche ein Ausstrom von Ca^{2+} und Na^+ sowie ein Einstrom von K^+ -Ionen ermöglicht wird [265, 266]. Die resultierende Depolarisation der Plasmamembran und der Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen zu einer Induktion unterschiedlicher Signalwege [264].

Im Gegensatz zu P2X-Rezeptoren können P2Y-Rezeptoren neben ATP auch durch andere Purin- oder Pyrimidinnukleotide aktiviert werden. Dabei führt die Substratbindung - wie auch bei anderen GPCRs - zu einer Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, ein Prozess, bei dem das Protein in seine α -Untereinheit und den $\beta\gamma$ -Komplex dissoziiert [264].

Die Aktivierung von Signalkaskaden wird nun durch die Interaktion beider Komponenten mit anderen Proteinen ausgelöst, wobei der Effekt aufgrund der unterschiedlichen α -Untereinheit der P2Y-Rezeptoren je nach Rezeptor unterschiedlich ist [264]. Eine Stimulation der P2Y-Rezeptoren an Immunzellen wirkt im Wesentlichen proinflammatorisch [267].

P1-Rezeptoren werden als Adenosinrezeptoren bezeichnet, da sie durch extrazelluläres Adenosin aktiviert werden. Hierbei werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, die bei physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen [268].

Wie auch P2Y-Rezeptoren gehören die P1-Rezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Dabei werden die Adenosinrezeptoren in vier Subtypen unterschieden: A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ [269, 270]. Die Aktivierung der Signaltransduktion bei Ligandenbindung verläuft dabei über G_i-, G_s- oder G_q-Proteine [271].

Die Adenylatzyklase bildet den Effektor aller Adenosinrezeptoren und wird je nach Rezeptorsubtyp entweder inhibiert oder aktiviert. Dabei sind A₁- und A₃-Rezeptoren an G_{i/o}-Proteine gekoppelt, die bei einer Rezeptoraktivierung eine Hemmung der Adenylatzyklase bewirken und zu einer verringerten intrazellulären cAMP-Konzentration führen [268, 272, 273]. Im Gegensatz dazu sind die A_{2A}- und A_{2B}-Rezeptoren an G_s-Proteinen gekoppelt, wodurch über eine Aktivierung der Adenylatzyklase eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt [274]. Weiterhin konnte eine Kopplung des A_{2B}-Rezeptors an G_q-Proteine gezeigt werden, was zu einer Aktivierung von Phospholipase C führt [275].

1.4.3 Purinorezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Die Aktivierung der P1-Rezeptoren führt je nach Rezeptorsubtyp zu unterschiedlichen Reaktionen im Gewebe. So führt die Aktivierung des A₁-Rezeptors im kardiovaskulären System zu einer Verringerung der Herzfrequenz [276]. In Bezug auf proinflammatorische Effekte induziert die Aktivierung des A₁-Rezeptors bei humanen Granulozyten die Chemotaxis, die Adhäsion an Endothelzellen, die Bildung von Sauerstoffradikalen und die Fcγ-vermittelte Phagozytose [277-280].

Dem A₁-Rezeptor oft in seiner Wirkung entgegengesetzt ist der A_{2A}-Rezeptor. Die Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors hat supprimierende Effekte auf die Phagozytose, auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie auf die Adhäsion an das Endothel zur Folge [88, 278-280].

Der A_{2A}-Rezeptor vermittelt vor allem entzündungshemmende Effekte, da eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels zu einer Inhibierung der proinflammatorischen Signalwege von NFκB sowie JAK/STAT führt [281].

Aufgrund seiner Expression auf den meisten Immunzellen ist der A_{2A}-Rezeptor wesentlich an der Modulation von Entzündungsreaktionen beteiligt [281]. So wird durch den A_{2A}-Rezeptor die Expression von proinflammatorischen Th1-Zytokinen wie IL-12, IFN- γ und TNF- α in Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen gehemmt [282-287]. Andererseits wurde auch eine antiinflammatorische Reaktionen über die Aktivierung des A_{2A}-Rezeptors durch das antiinflammatorischen Zytokin IL-10 beschrieben [288, 289].

In einer Vielzahl von Krankheitsmodellen wurden A_{2A}-Rezeptoragonisten erprobt. Dabei konnte eine entzündungshemmende und gewebeprotective Wirkung der Agonisten nachgewiesen werden. Beispielsweise kann die Behandlung mit A_{2A}-Rezeptoragonisten im Herzinfarktmodell eine Verringerung der Infarktgröße bewirken, wobei der Effekt durch eine geringere Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen und eine verringerte Degranulation von Mastzellen erklärt werden kann [290-294].

Die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors erfolgt erst bei mikromolaren Adenosinkonzentrationen (EC50 = 24 μ M), wohingegen die anderen drei Adenosinrezeptoren bereits im nanomolaren Bereich werden können (EC50 = 300-700 nM) [269]. Dies bedeutet, dass der A_{2B}-Rezeptor vermutlich erst unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielt [295]. Dabei vermitteln die Signalwege sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte [290, 296].

Bei antiinflammatorischen Effekten sind dabei sowohl die Hemmung der TNF- α -Sekretion bei Granulozyten und Makrophagen als auch die Steigerung der Sekretion von entzündungshemmendem IL-10 bei Makrophagen bekannt [297-299]. Dazu wird angenommen, dass dieser antiinflammatorische Effekt durch den G_s-vermittelten Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorgerufen wird [290].

Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-8 kann durch Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors auf einer Vielzahl von Zellen erfolgen und verläuft anscheinend sowohl über G_s- als auch über G_q-Signalwege [290, 300, 301]. Die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors verringert die Proliferation von Fibroblasten und Myofibroblasten, daher führt im Infarktmodell eine Stimulation durch entsprechende Agonisten zu einer Verringerung der kardialen Fibrose [302]. Ebenfalls blockiert die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors die Apoptose bei Kardiomyozyten im Randbereich des Infarktes, wodurch eine reduzierte Infarktgröße resultiert [303].

Der A₃-Rezeptor weist im Vergleich zu den anderen P1-Rezeptoren eine Besonderheit auf. Während die anderen P1-Rezeptoren eine relativ hohe Sequenzhomologie zwischen verschiedenen Säugetierfamilien besitzen (86-93 %), sind diese bei dem A₃-Rezeptor mit nur 74 % Sequenzhomologie deutlich geringer [269]. Entsprechend ist auch die Affinität zu Liganden bei den A₃-Rezeptoren in unterschiedlichen Spezies verschieden [276].

Eine Aktivierung des A₃-Rezeptors führt zu pro- als auch antiinflammatorischen Wirkungen [290]. Beispielsweise wird über A₃-Aktivierung der Entzündungsmediator Histamin durch Mastzellen ausgeschüttet bzw. die LPS-stimulierte Bildung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α auf humanen und murinen Makrophagen-Zelllinien gehemmt [304-306].

1.5 Zielsetzung

Epikardiale Progenitorzellen (EPDC) sind wesentlich an der Entstehung des Koronarsystems und Bildung von Herzmuskelzellen während der Embryonalentwicklung des Herzens beteiligt. Nach einem Myokardinfarkt kommt es zu einer Proliferation der einschichtigen epikardialen Zellschicht und zu einem Einwandern der EPDC in das geschädigte Myokard, was als Reaktivierung des embryonalen Programms gedeutet wird. Während die Biologie der EPDC nach Infarkt im Tierversuch bereits gut untersucht ist, gibt es bislang nur wenige Informationen über epikardiale Zellen am Herzen des Menschen.

Ziel dieser Arbeit war es, die aus klinischem Biopsiematerial gewonnenen humanen EPDC des Vorhofs reproduzierbar zu isolieren und sie hinsichtlich Morphologie, Zellwachstum, Gen- und Proteinexpression zu charakterisieren. Dabei sollten insbesondere folgende Themenkomplexe untersucht werden

1. Etablierung einer robusten Isolationstechnik von EPDC aus humanen Vorhöfen
2. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung (Endocytose) von EPDC in Kultur
3. Lokalisation von EPDC im Vorhof-Myokard
4. Herstellung einer immortalisierten humanen EPDC Zelllinie
5. Bestimmung des basalen Zytokin-Sekretoms von EPDC
6. Adenosin-Rezeptoren und deren Einfluss auf das Zytokin-Sekretom
7. Bestimmung des Oberflächenproteoms von humanen EPDC mit massenspektrometrischen Methoden und Vergleich mit dem Oberflächenproteom von Ratten-EPDC

Insgesamt sollten die Versuche Aufschluss geben hinsichtlich des vermuteten Potentials von EPDC, sich in Herzmuskelzellen und Zellen des Gefäßsystems zu differenzieren.

2 Material

2.1 Laborausstattung

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Analysewaagen	<i>Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214</i> <i>Kern (Balingen, Deutschland), AEJ</i>
Autoklav	<i>F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland), 5169</i>
Bio-Plex Multiplex-System	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Bio-Plex 200</i>
Bio-Plex Waschstation	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), ProII Waschstation</i>
Chemolumineszenz Imager	<i>Intas (Göttingen, Deutschland), Intas ECL Chemilum Imager</i>
Durchflusszytometer	<i>BD Biosciences (San Jose, USA), FACSCanto™ II</i>
EKG-Messgerät	<i>Physio Control (Redmond, USA), LIFEPAK 9</i>
Gelanalysestystem	<i>Vilber (Eberhardzell, Deutschland), FUSION-FX7 SPECTRA</i>
Gelelektrophoresesysteme	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Bio-Rad Powerpack HC mit Bio-Rad Mini Protean 3 cell</i> <i>Biometra (Göttingen, Deutschland), Standard PowerPack P25 mit Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), mini SubCell GT</i>
Heizblöcke	<i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Thermomixer compact</i> <i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Thermomixer comfort</i>
Homogenisator	<i>AVESTIN Europe (Mannheim, Germany), Avestin Emulsiflex C5</i>
Inkubator	<i>Thermo Fisher (Rockford, USA), Heracell 150 i</i>
Intubator	<i>Harvard Apparatus (Holliston, USA), Small animal ventilator</i>
Kaltlichtlampe	<i>Pulch + Lorenz (March, Deutschland), Schott KL 1500 LCD</i>
Konfokales Mikroskop	<i>Zeiss (Oberkochen, Deutschland), LSM 710</i>
Kryotom	<i>Leica (Wetzlar, Deutschland), CM 1850</i>
Laser	<i>Lasos (Jena, Deutschland), RCM 7812 Z2</i>
Nukleotidmesser	<i>Thermo Fisher (Rockford, USA), Nanodrop 2000</i>
Magnetrührer	<i>MP Biomedicals (Santa Ana, USA), FastPrep-24</i>
Mikrofluidizer	<i>IKA-Werke, (Staufen, Deutschland), Ultra Turrax TP 18/10</i>
Mikroskope	<i>Olympus (Hamburg, Deutschland), BX 61</i> <i>Olympus, CKX31</i>
Mikroplatten Reader	<i>Tecan (Männedorf, Schweiz), Infinite® M200 Pro</i>
Mikrotiterschüttler	<i>IKA (Staufen, Deutschland), MTS 2/4</i>
MNR-Spektrometer	<i>Bruker (Billerica, USA), AVANCEIII 9.4 Tesla Wide Bore (89 mm)</i>
Digitalkamera	<i>Olympus, F-View, UC30</i>
Polarisationsfilter	<i>Olympus, U-Ant, U-Pot</i>
MR-Microimagingssystem	<i>Bruker (Rheinstetten, Deutschland), Mini 0.5</i>
MR-Resonatorspule	<i>Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 30-mm-birdcage</i>
MR-Spektrometer	<i>Bruker (Rheinstetten, Deutschland), 400 MHz Bruker AUANCE III Widebore</i>
pH-Meter	<i>Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic</i>
Pipetten	<i>Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Research</i>
Plattenschüttler	<i>IKA Werke (Staufen, Deutschland), MTS 2/4</i>
Real-time PCR Gerät	<i>Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland), StepOnePlus™</i>
Rollenmischer	<i>CAT (Staufen, Deutschland), RM5</i>

Scanner	<i>Canon (Krefeld, Deutschland), Canon LiDE 700F</i>
Sekretionsanalytiker	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Bioplex Pro II Wash Station, Bioplex 200</i>
Sterilbänke	<i>Labogene (Lyngø, Dänemark), Scanlaf Mars Pro, Cytosafe Class 2 Telstar (Terrassa, Spanien), Bio II A</i>
Transblotsystem	<i>Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Transblot turbo transfer system</i>
UV-Vis Spektrophotometer	<i>Thermo Fisher (Rockford, USA), NanoDrop 2000</i>
Vakuum-Absaugsystem	<i>HLC (Pforzheim, Deutschland), AC 04</i>
Vortexer	<i>VWR International (Darmstadt, Deutschland) neoLab (Heidelberg, Deutschland), Vortex-Genie 2</i>
Zellsortierer	<i>Beckman Coulter (Brea, USA), MoFlo XDP</i>
Zentrifugen	<i>Beckman Coulter (Brea, USA), Allegra X-30R Eppendorf (Hamburg, Deutschland), 5415R Thermo Fisher (Rockford, USA), Heraeus Megafuge 16R Thermo Fisher (Rockford, USA), Heraeus Biofuge Primo P</i>

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Mit Ausnahme der im Folgenden aufgelisteten Materialien wurden alle verwendeten Chemikalien von den Firmen Applied Biosystems (Carlsbad, Deutschland), Biochrome AG (Berlin, Deutschland), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland), Bio-Rad (München, Deutschland), Carl Roth GMBH (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Thermo Fisher (Rockford, USA) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Allgemeine Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgelistet, spezifische Materialien sind in der jeweiligen Methode in Kapitel 3 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
6-well-Platten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
12-well-Platten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
24-well-Platten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
96-well-Platten	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack	Roche (Mannheim, Deutschland)
EASYstrainer 70 µM	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Erlenmeyerkolben 500 ml	Duran (Mainz, Deutschland)
Glasgefäße 25/50/100 ml	Duran (Mainz, Deutschland)
Isofluran	Actavis GmbH (Langenfeld, Deutschland)
Klebefolie (PCR)	Bio-Rad (München, Deutschland), microseal „B“
Parafilm	Bemis (Neenah, WI, USA)
Pipettenspitzen	StarLab (Hamburg, Deutschland)
Nail Colour RdeL Young	Rossmann (Burgwedel, Deutschland)
Skalpelle	Feather Safety Razor Co. (Osaka, Japan), No. 10
Spritze	Becton Dickinson (Heidelberg, Germany), Micro Fine 0,5 ml
Stripetten 2/5/10/25 ml	Corning (Kaiserslautern, Deutschland)
Zellkulturflaschen 275/75/25 cm ²	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturschalen 10 cm	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

Zellschaber	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)
Zentrifugationsröhrchen 15ml/50 ml	Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

2.3 Marker, Restriktionsenzyme und -puffer

Tabelle 3: Verwendete Standards, Restriktionsenzyme und -puffer

Bezeichnung	Hersteller
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder	Thermo Fisher (Rockford, USA)
EcoNI/XagI	Thermo Fisher (Rockford, USA)
EcoRI	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
EcoRI-Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
EcoRV	Thermo Fisher (Rockford, USA)
HindIII	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Puffer R 10x	Thermo Fisher (Rockford, USA)

2.4 Kits für Isolierung und Nachweis von RNA, DNA und Proteinen

Tabelle 4: Verwendete Kits für Isolierung und Nachweis von RNA, DNA und Proteinen

Bezeichnung	Hersteller
NucleoBond Xtra midi EF	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Quiagen RNeasy Micro Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Venlo, Niederlande)
Human IL-11 DuoSet ELISA	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Roti®-Black P	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit	Thermo Fisher (Rockford, USA)
Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay	Bio-Rad (München, Deutschland)

2.5 Assays für die Analyse von Zytokinkonzentrationen

Tabelle 5: Verwendete Assays für die Analyse von Zytokinkonzentrationen

Bezeichnung	Hersteller
Pro TGF-β1 Set	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pro Human Cytokine VEGF Set	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pro Human Cytokine MCP-1 (MCAF) Set	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pro Human Cytokine IL-1β Set	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pro Human Cytokine IL-6 Set	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pro Human Cytokine TNF-α Set	Bio-Rad (München, Deutschland)

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Fluorochrom	Ursprung	Klon	Hersteller
CD13	n. v.	Maus	COB10	Biorbyt
CD31	n. v.	Maus	JC70A	Dako
CD44	n. v.	Maus	8E2	Cell Signaling
CD73	n. v.	Maus	AA60-E3-3	Millipore
CD90	n. v.	Maus	5E10	Biorbyt
CD105	n. v.	Maus	8A1	Abcam
CD117 (c-Kit)	n. v.	Kaninchen	n. a.	Biorbyt
GATA4	n. v.	Kaninchen	n. a.	Biorbyt
pSTAT3 (Y705)	n. v.	Kaninchen	D3A7	Cell Signaling
STAT3	n. v.	Maus	124H6	Cell Signaling
SMAActin	n. v.	Kaninchen	n. a.	Abcam
Tbx5	n. v.	Kaninchen	n. a.	Novus Biologicals
Tbx18	FITC	Kaninchen	n. a.	Biorbyt
TroponinT	n. v.	Maus	13-11	Thermo Fischer
VE Cadherin	FITC	Kaninchen	n. a.	Bioss
Vimentin	Alexa Fluor® 488	Kaninchen	S-20	Santa Cruz
WT1	n. v.	Kaninchen	C-19	Santa Cruz

2.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 7: Verwendete Primärantikörper für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Spezifität	Fluorochrom/Tag	Ursprung	Hersteller
Streptavidin	FITC	Maus	Biolegend
Anti-Rabbit IgG	FITC	Ziege	Life Technologies
Anti-Maus	FITC	Esel	Life Technologies
Anti-Rabbit IgG	Cy3	Ziege	Jackson Immuno Research
Anti-Maus IgG	Cy3	Esel	Jackson Immuno Research
TrueBlot®Anti-Rabbit IgG	HRP	Maus	Rockland
TrueBlot®Anti-Maus IgG	HRP	Ratte	Rockland

2.7 Humane Biopsien

Die im Folgenden aufgelisteten Daten wurden anonymisiert vom Institut für kardiovaskuläre Chirurgie zu den erhaltenen Biopsien übermittelt. Eine ausführlichere Liste befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Tabelle 8: Daten der erhaltenen Biopsien

Biopsienummer	OP-Datum	Geschlecht	Alter	Operation	Vorhof
1	18.12.2013	m	57	ACB	re
2	28.01.2014	m	60	AKE	re
3	25.02.2014	w	76	AKE+ 4-fach Bypass	re
4	12.03.2014	m	78	AKE	re
5	14.03.2014	m	78	AKE + ACB	re
6	04.04.2014	m	81	AKE, TKR, PFO-Verschluss VHF	li
7	15.04.2014	m	62	MK+TK Annuloplastik	li
8/9	22.04.2014	m	64	HTX	li/re
10	01.07.2014	w	67	MKR + Bypass	li
11	07.07.2014	m	39	AKE	re
12	15.07.2014	m	62	HTX	li
13	18.07.2014	m	71	Bypass	re
14	24.08.2014	m	55	HTX	re
15	06.01.2015	m	70	AKE+ACB	re
16	08.01.2015	m	75	AKE	re
17	15.01.2015	w	57	AKE	re
18	27.01.2015	m	75	AKE	re
19	03.02.2015	m	84	AKE	re
20	12.02.2015	m	77	AKE	re
21	18.02.2015	w	69	ACB	re
22	23.02.2015	w	74	AKE	re
23	26.03.2015	m	71	AKE	li
24	13.05.2015	m	63	HTX	
25	17.05.2015	w	47	HTX	
26	10.06.2015	w	71	AKE, subvalvuläre Myektomie	re
27	24.06.2015	m	73	MIC-MKR+TKR	re
28	10.07.2015	m	51	AKE, Vorhofablation	re
29	13.08.2015	m	76	AKE	
30	20.08.2015	m	65		
31/32	20.08.2015	m	56	HTX	li/re
33	16.09.2015	w	70	AKE, MKR	
34	01.10.2015	m	45	AKE, MKE	
35	23.10.2015	m	68	ACVB	re
36	24.10.2015	m	61	HTX	
37	02.11.2015	m	68		
38	10.12.2015	w	75	MIC-MKR+TKR	re
39/40	31.12.2015	m	55	HTX	li/re
41	14.01.2016	m	74	AKR mit Ektasie der Aorta ascendens	
42	15.01.2016	m	66	AKE	re
43	01.02.2016	m	71	AKE, MKE, Exklusion li Vorhofohr	li

2.8 Zelllinien, Bakterienstämme, Plasmide und Oligonucleotide

2.8.1 Zelllinien

Tabelle 9: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller
HEK293FT (<i>human embryonic kidney</i>)	Invitrogen
CHO (<i>chinese hamster ovary</i>)	DSMZ
Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	AG PD Dr. Zorg
<i>Rat lung epithelial cells</i> (RLE)	AG Prof. Unfried
RAT2 (Rattenfibroblasten-Zelllinie)	Sigma-Aldrich

2.8.2 Bakterienstämme

Tabelle 10: Verwendete Bakterienstämme

Bezeichnung	Hersteller
DH5 α	ABM
XL-Blue kompetente Zellen	AG Prof. Goedecke

2.8.3 Plasmide

Tabelle 11: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4	s. Anhang	ABM
pBABE-hygro-hTERT	s. Anhang	Addgene (Plasmid #1773), AG Prof. Royer-Pokora
psPAX2	s. Anhang	Addgene (Plasmid #12259), AG Prof. Royer-Pokora
pMD2.G	s. Anhang	Addgene (Plasmid #12260), AG Prof. Royer-Pokora

2.8.4 TaqMan Gene Expression Assays

Die quantitative *real-time* PCR (q-PCR) wurde im 96-well-Format mit TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Die dabei verwendeten Assays bestehen aus Primerpaaren sowie einer fluoreszenzmarkierten Sonde, welche am 5'-Ende mit dem Reporterfarbstoff FAM und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencher markiert sind.

Tabelle 12: Verwendete TaqMan Gene Expression Assays

Zielgen	Assay-ID	Referenz
Beta Actin	Hs01060665_g1	Thermo Fischer
CC-Chemokinligand 2 (CCL2/MCP1)	Hs00234140_m1	Thermo Fischer
GATA binding protein 4 (Gata4)	Hs00171403_m1	Thermo Fischer
Interleukin 1 beta (IL-1 β)	Hs00174097_m1	Thermo Fischer
Interleukin 6 (IL-6)	Hs00985639_m1	Thermo Fischer
Interleukin 6 Rezeptor (IL-6R/CD126)	Hs01075660_m1	Thermo Fischer
Interleukin 11 (IL-11)	Hs01055413_g1	Thermo Fischer
Interleukin 11 Rezeptor (IL-11R)	Hs00234415_m1	Thermo Fischer
Interleukin 12 Untereinheit B (IL-12B)	Hs01011518_m1	Thermo Fischer
Interleukin 23 Untereinheit A (IL-23A)	Hs00900828_g1	Thermo Fischer
Kardiales Troponin T Typ 2 (cTnt)	Hs00993911_m1	Thermo Fischer
Kardiotropin 1 (CT-1)	Hs00173498_m1	Thermo Fischer
Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (Pecam-1, CD31)	Hs00169777_m1	Thermo Fischer
Smooth muscle alpha-actin (Sm-actin, α -SMA)	Hs00909449_m1	Thermo Fischer
T-box gen 5 (Tbx5)	Hs00361155_m1	Thermo Fischer
T-box gen 18 (Tbx18)	Hs01385457_m1	Thermo Fischer
Transforming growth factor beta (TGF- β)	Hs00998133_m1	Thermo Fischer
Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	Hs01113624_g1	Thermo Fischer
Tyrosine kinase kit (c-Kit)	Hs00174029_m1	Thermo Fischer
<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	Hs00900055_m1	Thermo Fischer
Wilm's Tumor Suppressor Gen (WT1)	Hs01103751_m1	Thermo Fischer

2.9 Software

Die für diese Arbeit verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 13 aufgelistet. Spezielle weitere Computerprogramme sind im direkten Zusammenhang mit den jeweiligen Methoden in Kapitel 3 aufgeführt.

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Verwendung
Durchflusszytometrieanalyse	BD FACSDiva Software
FusionCapt Advance FX7	Agarosegelanalyse
Gimp 2.8	Bildbearbeitung
GraphPad Prism 5	Statistische Analysen und Abbildungen
ImageJ	Bildbearbeitung
Nanodrop 2000/2000c	RNA/DNA-Konzentrationsanalyse
Microsoft 2003	Textverarbeitung und Tabellen
StepOnePlus™ V.2.3	PCR-Analyse

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die für die Isolierung von EPDC aus Rattenherzen nach Myokardinfarkt verwendeten Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und erhielten Standardfutter sowie Wasser *ad libitum*. Bei den Tieren handelte es sich um männliche Wistar-Ratten, welche von der Firma Janvier bezogen wurden.

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn für wenigstens 8 Tage in der Tierversuchsanlage akklimatisiert und hatten bei Versuchsbeginn ein Gewicht von 220-280 g sowie ein Alter von 12-16 Wochen. Eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung liegt unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2014.A174 vor.

3.1.1 Myokardiale Ischämie mit Reperfusion am Herzen der Ratte

Die Proliferation von EPDC auf der Herzoberfläche wird durch eine Okklusion der linken Koronararterie mit anschließender Reperfusion hervorgerufen.

Zur Auslösung des Herzinfarktes wurden männliche Wistar-Ratten mittels Isofluran betäubt und mit Sauerstoff/1,5 % Isofluran über einen Tubus beatmet. Zur Überwachung der Herzfunktion sowie zur Kontrolle der Ischämie wurde ein 2-Punkt-EKG angelegt. Die Ratte wurde auf eine Wärmeplatte gelegt, die Extremitäten wurden mit Klebeband (Leukoplast, BSN medical GmbH, Hamburg, Deutschland) fixiert und die linke Thoraxseite wurde rasiert und desinfiziert. Es folgte ein Schnitt durch die Haut in medial-lateraler Richtung auf Brusthöhe. Der Brustmuskel wurde stumpf zur Seite präpariert und fixiert, ein Schnitt durch den Intercostalraum getätigt und das so erzeugte Loch stumpf auf eine ausreichende Größe präpariert.

Mit einem Haken mit Faden (7-0) wurde ein Stich ca. 2 mm unterhalb des linken Atriums unter dem *Ramus interventricularis anterior (RIVA) / left anterior descending (LAD)* vorgenommen, der Faden durch ein Hartplastikröhrchen geführt und der Blutfluss durch Druck des Röhrchens auf die RIVA/LAD gestoppt. Eine erfolgreiche Okklusion zeigte sich im EKG durch eine Hebung der ST-Strecke sowie am Herzen selbst durch eine Aufhellung des Infarktgebietes.

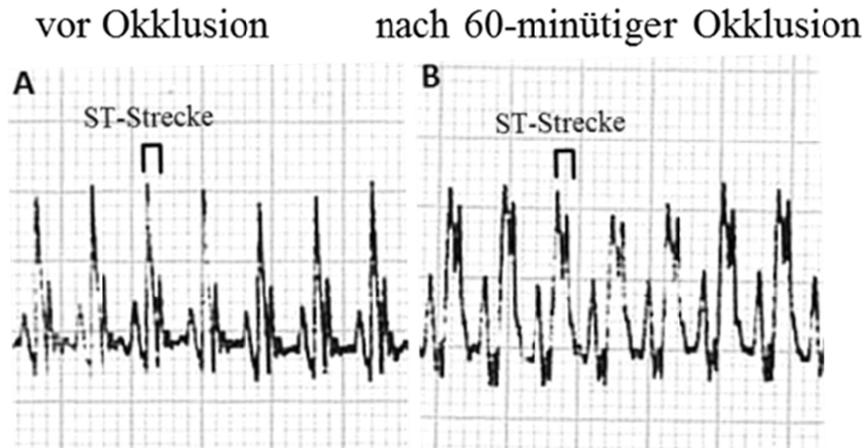


Abb.3.2: Hebung der ST-Strecke im EKG bei myokardialer Ischämie

Gezeigt ist ein repräsentatives EKG einer Ratte zu Beginn der Operation (A) und nach erfolgreicher 60-minütiger Okklusion der RIVA/LAD vor der Reperfusion (B).

Die Wundränder wurden mit sterilem PBS angefeuchtet und die Ratte mit einem Tuch abgedeckt. Nach 60 min wurde die Okklusion gelöst, die Reperfusion eingeleitet und der Faden vorsichtig gezogen. Der Intercostalraum wurde mit zwei Stichen eines Hakens mit Faden (4-0) geschlossen und die Haut separat mit Faden (4-0) vernäht.

Die Wunde wurde mit Betaisodona desinfiziert, dem Tier wurden 0,05 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin appliziert und das Tier wurde mit Sauerstoff ohne Isofluran bis zum Erwachen intubiert. Buprenorphin (0,05 mg/kg Körpergewicht) sowie Carprofen (4 mg/kg Körpergewicht) wurden als postoperative Nachbehandlung gem. Tierversuchsgenehmigung eingesetzt.

3.1.2 Isolierung und Kultivierung von EPDC aus infarzierten Rattenherzen (rEPDC)

Nach myokardialer Ischämie und Reperfusion (s. Kapitel 3.1.1) kommt es zu einer Proliferation der EPDC, welche durch ein enzymatisches Verfahren von der Herzoberfläche abgelöst wurden. Im Einzelnen wurde dabei wie folgt vorgegangen:

Fünf Tage nach dem Infarkt wurden die Ratten mit Isofluran betäubt und ihnen wurde 500 µl Heparin (100 U/ml) intraperitoneal appliziert. Nach 15 min wurde das Tier über Inhalation von Isofluran getötet, der Thorax geöffnet und das Herz herauspräpariert. Das Herz wurde mit 2 ml PBS durch retrograde Perfusion über die Aorta gespült und in 10 ml PBS mit 1100 U/ml Kollagenase für 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kollagenase mit 3 ml FCS neutralisiert. Die Zellsuspension wurde durch einen 70 µm Filter gegeben und bei 350 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in rEPDC-Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert.

Alle 48 bis 72 h wurde das Medium erneuert und die Zellen wurden bei 80 – 90 % Konfluenz neu ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C abgelöst und die Reaktion mit 5 ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 350 g zentrifugiert, das Pellet in Medium resuspendiert und ein Viertel der Zellen neu ausgesät.

rEPDC-Medium

DMEM, high glucose

30 % FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamax

3.1.3 Isolierung von glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta

Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (SMC) wurden aus der Rattenaorta isoliert. Hierfür wurde ein 2 mm großes Stück der Aorta ascendens einer infarzierten Ratte nach Entnahme des Herzens (s. Kapitel 3.1.2) abgetrennt und mit 1 ml PBS mit 100 µl Heparin (100 U/ml) gespült. Anschließend wurde die Aorta mit 1 ml DMEM mit 30 % FCS und 100 µl Heparin (100 U/ml) gespült, mit DMEM mit 2 mg/ml Kollagenase (1.100 U/ml) gefüllt und bei 37 °C für 45 min inkubiert. Danach wurde die Aorta mit 1 ml DMEM mit 30 % FCS ausgespült, mechanisch zerkleinert und die Gewebefragmente wurden mit der Innenseite nach unten in SMC-Medium auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturplatten bei 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert, wobei es zum Auswachsen von SMC kam. Nach fünf Tagen wurden die Gewebefragmente entfernt und das Medium wurde gewechselt.

SMC-Medium

DMEM, high glucose

30 % FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamax

3.2 Isolierung von humanen stromalen Zellen (hSC) aus atrialen Biopsien

Humane Vorhofbiopsien wurden bei Bypassoperationen, Herzklappenoperationen oder Herztransplantationen von Chirurgen der kardiovaskulären Chirurgie (Universitätsklinikum Düsseldorf) entnommen und in eiskaltes PBS überführt. Die hierfür notwendige Erlaubnis der Ethikkommission lag vor (Aktenzeichen 4125, 4412R und 4646).

Die Biopsie wurde anhand der Morphologie und Farbe optisch in Fettgewebe, Epikard und Myokard unterteilt. Das Fettgewebe wurde mechanisch mit einem Skalpell entfernt und das verbliebene Gewebe gewogen. Epikard und Myokard wurden entweder getrennt oder zusammen mit einer Schere mechanisch in 1 mm große Stücke zerkleinert und in steril filtriertem Ham's:F12-Medium mit 1.100 U/ml Kollagenase für 180 min bei 37 °C inkubiert.

Die Lösung wurde durch einen 70 µm Filter in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min mit 350 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Medium für humane SC (hSC-Medium) resuspendiert und in einer Zellkulturflasche für 180 min bei 37 °C und 5 % CO₂ als Vorkultur inkubiert. Dies diente dazu, eine Kontamination mit Fibroblasten zu vermeiden. Der Überstand wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und anwachsende Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und analysiert.

Alle 48 bis 72 h wurde das Medium erneuert und die Zellen bei 80 – 90 % Konfluenz neu ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C abgelöst und die Reaktion mit 5 ml Medium abgestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 350 g zentrifugiert, das Pellet in Medium resuspendiert und ein Viertel der Zellen neu ausgesät.

hSC-Medium

DMEM, high glucose

20 % FCS

100 U/ml Penicillin (Gibco)

100 µg/ml Streptomycin (Gibco)

2 mM Glutamax (Gibco)

10 ng/ml bFGF

3.3 Phänotypisierung und Quantifizierung von hSC

3.3.1 Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit von hSC *in vitro*

Die Wachstumsgeschwindigkeit bzw. die Verdopplungszeit von Zellen in Kultur ist eine wichtige Kenngröße sowohl für die Planung von Experimenten als auch für die Bestimmung der zeitlichen Kultivierbarkeit *in vitro*.

Für die Berechnung der Wachstumsgeschwindigkeit von hSC *in vitro* wurden jeweils $1 \cdot 10^4$ hSC, welche bereits zwei Wochen in Kultur gewachsen waren, in 6-well Platten ausgesät. Nach jeweils vier, sechs und acht Tagen wurden die Zellen von jeweils zwei technischen Replikaten mit PBS+5 mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Durch Anlegen einer exponentiellen Trendlinie (Microsoft Excel) konnte die Verdopplungszeit berechnet werden.

3.3.2 Berechnung der Anzahl an hSC pro µg Gewicht aus atrialen humanen Biopsien

Die Ausbeute von hSC aus humanen atrialen Biopsien stellt ein Maß für die Effizienz des verwendeten Protokolls dar. Dieses wurde zu Beginn optimiert, um eine möglichst hohe Ausbeute zu gewährleisten. Für die Berechnung der isolierten hSC wurden gemäß der beschriebenen Methode (s. Kapitel 3.2) die hSC aus humanen atrialen Biopsien kultiviert.

Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit PBS/5 mM EDTA abgelöst und mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die dabei berechnete Menge an kultivierten hSC wurde mithilfe der ermittelten Verdopplungszeit (s. Kapitel 3.3) zurückgerechnet auf die Anzahl an kultivierten hSC unmittelbar nach Isolierung. Da bei der Isolierung der hSC auch das Gewicht der Biopsie bestimmt wurde, konnte die Anzahl an hSC relativ zum Gewicht der Biopsie berechnet werden.

3.3.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung erlaubt die Asservierung von Zellen für die Analyse unabhängig vom Datum ihrer Isolierung. Jedoch können nicht alle Zellen generell kryokonserviert werden oder verändern durch die Kryokonservierung ihren Phänotyp. Daher wurde untersucht, ob hSC kryokonservierbar sind und dabei ihren Phänotyp beibehalten.

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden sie in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Der Zellsuspension wurden 10 % DMSO zugefügt und die Zellen wurden unmittelbar bei -80 °C eingefroren und gelagert.

Für die Reaktivierung wurden die hSC im Wasserbad aufgetaut und zügig in 2 ml hSC-Medium gegeben. Die Zellen wurden für 5 min bei 350 g zentrifugiert, das Pellet in hSC-Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert.

Eine Analyse des Phänotyps erfolgte mittels Durchflusszytometrie (s. Kapitel 3.5) und mRNA-Analyse (s. Kapitel 3.7), wobei die kryokonservierten hSC mit den Analysen von hSC der jeweils gleichen Biopsie verglichen wurden.

3.4 Isolierung und Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) wurden von der AG Immuntherapeutika des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika (ITZ) der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Die hMSC wurden im ITZ mit einem etablierten Verfahren aus Knochenmarkaspiraten isoliert und kultiviert [307]. Die hMSC wurden nach dem Erhalt in DMEM mit 30 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Alle 48 bis 72 h wurde das Medium erneuert und die Zellen bei 80 – 90 % Konfluenz neu ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA für 5 min bei 37 °C abgelöst und die Reaktion mit 5 ml hMSC-Medium abgestoppt. Die Zellen wurden für 5 min bei 350 g zentrifugiert, das Pellet in hMSC-Medium resuspendiert und ein Viertel der Zellen neu ausgesät.

hMSC-Medium

DMEM, high glucose

30 % FCS

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

2 mM Glutamax

3.5 Immunfluoreszenzanalyse von hSC

Die Messung der Expression von intrazellulären und kernlokalisierten Proteinen sowie die Analyse der Lokalisation von hSC im Gewebe erfolgten mittels Immunfluoreszenzanalyse. Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung durch Antikörperfärbung beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an Peptidsequenzen des Zielgewebes. Mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet ist, kann die Expression des gewünschten Proteins lichtmikroskopisch auf zellulärer Ebene erfasst werden.

3.5.1 Anfertigen von Kryoschnitten von humanen Biopsien

Um die Lokalisation von hEPDC mittels Immunfluoreszenzanalyse zu erfassen, wurden Kryoschnitte von humanen Biopsien hergestellt. Dazu wurden humane Biopsien weitgehend von PBS befreit und in flüssiges KP-CryoCompound (Klinipath, Duiven, Niederlande) überführt. Die eingebettete Biopsie wurde bei -35 °C bis -40 °C in Isobutanol ausgehärtet und bei -80 °C gelagert.

Vor der Herstellung der Schnittpräparate wurde die eingebettete Biopsie bei -20 °C aufbewahrt. Im Kryotom wurde die Biopsie bei -20 °C eingespannt und es wurden 8 µm dicke Kryoschnitte hergestellt. Die Schnittpräparate wurden auf Objektträger aufgezogen und kurz angetrocknet. Die Präparate wurden trocken bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.5.2 Kultivierung von hSC auf Deckgläschen

Für die Untersuchung von intrazellulären und kernlokalisierten Proteinen sowie Membranproteinen von hSC *in vitro* wurden hSC auf Deckgläschen kultiviert. In 6-well Platten wurden dafür Deckgläschen platziert und mit 2 ml hSC-Medium bedeckt. Anschließend wurden $5 \cdot 10^4$ hSC pro well zugegeben und die Zellen für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Auf Deckgläschen kultivierte hSC wurden zweimal mit PBS gewaschen und für 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit Zamboni-Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellpräparate wurden in PBS bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zamboni-Fixierlösung

125 ml 16 % Paraformaldehyd

150 ml Pikrinsäure (gesättigt)

725 ml 0.1 M NaH₂PO₄/Na₂HPO₄

Einstellung auf pH 7.3 mit 10 M NaOH

3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Kryoschnitte und die auf Objektträgern fixierten Zellen wurden mit PBS/0,1 % Triton X100 für 5 min gewaschen und anschließend in PBS/0,5 % Triton X100 für 5 min inkubiert. Danach wurden die Proben zweimal mit PBS/0,1 % Triton X100 für je 5 min gewaschen und mit PBS/0,1 % Triton und 5 % *normal goat serum* (NGS) oder *donkey serum* (DS) für 60 min bei RT geblockt. Anschließend wurde über Nacht mit dem Primärantikörper in PBS/0,1 % Triton und 1 % NGS/DS bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Präparate dreimal für 5 min bei RT mit PBS/0,1 % Triton gewaschen und für 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper in PBS/0,1 % Triton und 1 % NGS/DS lichtgeschützt inkubiert. Die Präparate wurden zweimal mit PBS/0,1 % Triton und nachfolgend einmal mit PBS jeweils 5 min bei RT gewaschen und mit ProLong® Gold Antifade mit DAPI eingedeckt. Die Kryoschnitte wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und die Zellpräparate auf einen Objektträger gelegt. Die Proben wurden mit Klarlack versiegelt, getrocknet und lichtmikroskopisch analysiert.

3.5.4 Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung

Für die Auszählung der gefärbten hSC auf Deckgläschen wurden jeweils fünf zufällige Ausschnitte mit 400-facher Vergrößerung im DAPI-Kanal ausgewählt. Der Zellkern wurde fokussiert und das Bild aufgenommen.

Ohne weitere Änderungen wurde auf den entsprechenden Kanal zur Antikörperdetektion (FITC (488 nm, grün) oder Cy3 (550 nm, rot)) umgestellt und ein Bild fotografisch erfasst. Die Signalintensität wurde auf ein Kontrollbild ohne Antikörper normiert und am Computer separat auf positive und negative Zellen hin ausgewertet.

Für die Berechnung der WT1 positiven Zellen pro cm^2 humanem atrialem Gewebe wurden mehrere Ausschnitte mit 200-facher Vergrößerung fotografisch erfasst und anhand der betrachteten Fläche und der detektierten Zellen die Anzahl der WT1 positiven Zellen pro cm^2 humanem atrialem Gewebe berechnet.

3.6 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend anhand des von den Zellen und der Markierung ausgesendeten Streu- und Fluoreszenzlichts optisch analysiert. Dabei werden Zellen in Einzelzellsuspension durch einen monochromatischen Laserstrahl geleitet und das entstehende Streu- und Fluoreszenzlicht mithilfe eines Detektors erfasst. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) ist dabei abhängig von der Größe der Zelle, wohin gegen das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) durch die Granularität der Zelle bestimmt wird. Das Fluoreszenzlicht hingegen ist proportional abhängig von an die Zelle gebundener Fluorochrom-gekoppelten Antikörper. Durch diese drei Parameter können Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie als auch ihrer Antigenexpression untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl Untersuchungen der Oberflächen- und Kernproteinexpression von hSC als auch die Aufnahme von Fluorochrom-gekoppelten Nanopartikeln untersucht.

3.6.1 Analyse von Oberflächenproteinen

Für die Untersuchungen der Oberflächenproteinexpression wurden Zellen in Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mittels PBS/5 mM EDTA abgelöst. Die Anzahl der Zellen wurde über eine Neubauer-Zählkammer ermittelt und jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden für 5 min bei 350 g zentrifugiert und das Pellet in 3 ml MACS-Puffer (PBS/0,5 % BSA/2 mM EDTA) resuspendiert.

Die Zellen wurden erneut für 5 min bei 350 g zentrifugiert, in 1 ml Blockpuffer (MACS-Puffer/5 % BSA) resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Pellet mit dem Primärantikörper in 200 μl MACS-Puffer für 60 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen, in 200 μl MACS-Puffer mit Sekundärantikörper resuspendiert und für 60 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und in 500 μl MACS-Puffer mit 1 μl DAPI resuspendiert.

3.6.2 Datenauswertung

Nach der Messung der zu untersuchenden hSC und hMSC mithilfe des FACSCanto™ II Durchflusszytometers (BD Bioscience) wurden die Daten mit der FACSDiva™ Software (BD Bioscience) ausgewertet. Für die Bestimmung von positiven und negativen hSC und hMSC wurden Negativkontrollen ohne Primärantikörper vermessen. Anhand der Kontrollzellen wurden Analysefenster (*gates*) bestimmt, welche auf die Analyse der Zellen mit Primärantikörpern übertragen wurden. Je nach Fluoreszenzintensität ergab sich anteilig die Zellpopulation an positiven und negativen Zellen. Weiterhin wurden tote Zellen aufgrund ihrer Anfärbung mit DAPI von der Analyse ausgeschlossen. Die in dieser Arbeit präsentierten Histogramme wurden mit der FACSDiva™ Software erhalten und mittels Gimp 2.8 Software überlagert.

3.7 Quantifizierung der mRNA-Expression von hSC und hMSC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transkription von verschiedenen Markergenen, welche beispielsweise für Differenzierung oder Immunantwort wichtig sind, quantitativ untersucht. Außerdem wurden quantitative Änderungen der Transkription durch den Einfluss unterschiedlicher Faktoren in der Zellkultur analysiert.

Die Menge der Transkription kann mithilfe der quantitativen *real-time* PCR (qRT-PCR) bestimmt werden. Dabei können mehrere spezifische mRNA-Transkripte in einer einzelnen Probe analysiert werden. Hierfür muss die aus Zellen isolierte mRNA (s. Kapitel 3.6.1) zunächst mittels RNA-abhängiger DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden (s. Kapitel 3.6.2). Anschließend kann die cDNA quantifiziert werden (s. Kapitel 3.6.3), wobei durch die zyklisch verlaufende Amplifikation der qRT-PCR mit fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden die entstehenden PCR-Produkte quantifiziert werden können. Dabei hybridisieren die DNA-Sonden zwischen den beiden PCR-Primern des *TaqMan Assays* (s. Kapitel 2.8.4).

Die Sonden besitzen einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende und einen Quencher am 3'-Ende. Bei Einstrahlung mit einem Laser kommt es zwar zu einer Anregung des Reporterfarbstoffs am 5'-Ende, die Energie wird jedoch aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher am 3'-Ende strahlungsfrei übertragen. Dieser Effekt wird als Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) bezeichnet und bewirkt, dass die intakte DNA-Sonde keine Fluoreszenz emittiert. Bei der PCR-Reaktion wird jedoch bei der Synthese der DNA-Stränge - ausgehend vom 3'-Ende des Primers durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität der DNA-Polymerase - die Sonde abgebaut. Dadurch sind Reporterfarbstoff und Quencher nicht mehr in lokaler Nähe und es kommt nicht mehr zu einem FRET, sodass Fluoreszenz detektiert werden kann.

Die Intensität ist dabei proportional zur DNA-Synthese, weshalb die Amplifikation der cDNA direkt verfolgt werden kann. Da bei jedem Zyklus der PCR-Reaktion die synthetisierte DNA-Menge unter optimalen Bedingungen verdoppelt wird und die zu Beginn vorhandene Intensität der Fluoreszenz im Hintergrund verschwindet, kann der exponentielle Anstieg des Fluoreszenzsignals über einen festgelegten Grenzwert als Maß für die Menge an vorhandener cDNA dienen. Dieser Messwert wird in Zyklenzahlen gemessen und als Ct-Wert (*cycle threshold*) angegeben. Dies bedeutet, dass bei einer höheren cDNA-Menge zu Beginn der PCR-Reaktion der Ct-Wert entsprechend geringer ist.

3.7.1 Isolierung von RNA

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert, mit PBS gewaschen und mittels PBS+5mM EDTA abgelöst. Anschließend wurde für 5 bei 350 g zentrifugiert und das Pellet bei -80 °C für die mRNA-Isolierung eingefroren.

Für die Isolierung der mRNA wurde das RNeasy Micro Kit (s. Kapitel 2.4) verwendet. Dazu wurde das Zellpellet in 600 µl RLT-Puffer mit 6 µl β-Mercaptoethanol auf Eis lysiert. Sodann wurde 600 µl eiskaltes Ethanol (70 %) zugegeben und auf die im Kit enthaltene Säule aufgetragen. Es wurde für 15 sec bei 15000 g zentrifugiert, die Säule mit 350 µl Waschpuffer beladen und erneut zentrifugiert. Danach wurden 10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer auf die Säule aufgetragen und für 15 min bei RT inkubiert. Die Säule wurde zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer gewaschen und nach dem zweiten Waschen erneut für 2 min bei 15.000 g trocken zentrifugiert. Anschließend wurde auf die Säule 50 µl RNase freies Wasser aufgetragen, für 2 min bei RT inkubiert und die Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Die mRNA wurde durch Zentrifugation für 2 min bei 15.000 g eluiert und mittels NanoDrop 2000 quantifiziert. Dabei wird zur Beurteilung der Reinheit von RNA und DNA die Absorption bei 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen. Während Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm von DNA und RNA absorbiert wird, liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen bei 280 nm. Ebenfalls können bei 280 nm Rückstände von Alkoholen nachgewiesen werden.

Der Quotient aus Abs_{260}/Abs_{280} gibt entsprechend Aufschlüsse über eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen oder Alkoholen und sollte für reine RNA bei 2,0 liegen. Die Absorption bei 230 nm kann Verunreinigungen mit Polysacchariden aufzeigen und sollte für reine RNA ebenfalls etwa 2,0 betragen.

3.7.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit (Quiagen) verwendet. Dabei wurden 500 ng isolierte mRNA zusammen mit 2 µl 7xWipeout Buffer vermischt und mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Zusätzlich zu den Proben wurde eine Kontrolle ohne mRNA angesetzt. Die Proben wurden für 2 min bei 42 °C inkubiert und mit 4 µl 5x Quantiscript RT Puffer, 1 µl RT Primer Mix und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase kombiniert.

Als Negativkontrollen wurde eine Probe ohne Reverse Transkriptase sowie eine Probe ohne RNA angesetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 42 °C und weitere 3 min bei 95 °C inkubiert.

3.7.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Danach wurden jeweils 5 µl 2x Fast qPCR Mastermix Plus (Eurogentec, Köln, Deutschland) mit spezifischen 0,5 µl TaqMan Gene Expression Assays (s. Kapitel 2.8.4), 3,5 µl ddH₂O und 1 µl RT-PCR-Produkt auf eine 96-well Platte gegeben und die quantitative Polymerase-Kettenreaktion mittels StepOnePlus™ V.2.3 durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einem ersten Schritt 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 40 Zyklen inkubiert, wobei jeder Zyklus aus 15 sec bei 95 °C und anschließenden 60 °C für 1 min bestand.

3.7.4 Analyse und Vergleich der mRNA-Konzentration

Die Expressionsstärken eines Zielgens in verschiedenen Proben kann nicht direkt miteinander verglichen werden. Stattdessen muss auf einen Vergleich der relativen Expression zurückgegriffen werden. Dabei wurde die ΔC_t -Methode verwendet, welche die Expression einzelner Gene in Bezug zu einer endogenen Kontrolle setzt [308]. Dafür wurden zunächst die C_t -Werte der einzelnen Zielgene sowie des verwendeten Referenzgenes β -Actin bestimmt, wobei der Mittelwert aus jeweils drei technischen Replikaten ermittelt wurde. Anschließend wurde mit der Formel

$$\Delta C_t = C_{t\text{Referenzgen}} - C_{t\text{Zielgen}}$$

die Differenz zwischen den C_t -Werten des Referenz- und Zielgens gebildet. In der Formel wird dabei von einer optimalen qRT-PCR ausgegangen, bei welcher sich je Zyklus die Menge der DNA verdoppelt. Aufgrund dieses exponentiellen Anstiegs bedeutet ein um eine Einheit größerer C_t -Wert eine Verdopplung der DNA-Menge. Entsprechend gilt für die relative Expression des Zielgens:

$$\text{relative Expression [AU]} = 2^{(\Delta C_t)}$$

3.8 Bestimmung der Endozytose von hSC und hMSC

Eine Bestimmung der Endozytose von hergestellten Nanopartikeln durch hSC und hMSC erfolgte sowohl lichtmikroskopisch als auch mittels Durchflusszytometrie und ¹⁹F-Magnetresonanztomographie.

3.8.1 Herstellung von Nanopartikeln

Um zu prüfen, ob hSC und hMSC die Fähigkeit zur Endozytose zeigen, wurden eine 10 %ige Emulsion aus Perfluoro-15-Kronenether enthaltenden Nanopartikel hergestellt, welche für die Fluoreszenzanalyse zusätzlich mit 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein) (PE-CF) gekoppelt waren.

Für die Herstellung von Nanopartikeln wurden 1,7 g Lipoid S75 (Lipoid AG, Ludwigshafen, Deutschland) mit 62,5 g Phosphatpuffer, 7,1 g Perfluoro-15-Kronenether (PFCE) (ABCR, Karlsruhe, Deutschland) und für die Herstellung von fluoreszenzaktiven Nanopartikeln zusätzlich 1 ml PE-CF-Lösung mittels Mikrofluidizer Ultra Turrax TP 18/10 vermischt und insgesamt zehnmal mithilfe Avestin Emulsiflex C5 bei 1.500 bar homogenisiert.

Phosphatpuffer

3 mM	NaH ₂ PO ₄
7 mM	Na ₂ HPO ₄
2,5 % m/V	Glycerol
1 l	ddH ₂ O

Einstellung auf pH 7.4
Entgasung für 60 min unter Vakuum

PE-CF-Lösung

10 mg	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamine-N-(carboxyfluorescein)
1 ml	Chloroform

3.8.2 Fluoreszenzmikroskopische Analyse

Die Endozytose von Fluorochrom-gekoppelten Nanopartikeln durch hSC wurde mikroskopisch erfasst. Dazu wurden kultivierte hSC mit PBS/5 mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und jeweils $5 \cdot 10^4$ Zellen in einer 6-well Platte mit Deckgläschen mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und 2 ml neues Medium zugegeben. Es wurden 10 µl einer Lösung aus FITC-gekoppelten Perfluorkarbon-Partikel (PE-CF-PFC) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, für 10 min bei RT mit Zamboni-Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit ProLong® Gold Antifade mit DAPI auf einem Objektträger eingedeckt. Die Proben wurden mit Klarlack versiegelt, getrocknet und lichtmikroskopisch analysiert.

3.8.3 Analyse mittels Durchflusszytometrie

Für die Untersuchung der Endozytose von Nanopartikeln mittels Durchflusszytometrie wurden kultivierte hSC und hMSC mit PBS/5 mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6-well Platte mit 5 % CO² bei 37 °C kultiviert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgenommen, die hSC und hMSC mit PBS gewaschen und mit PBS/5 mM EDTA abgelöst. Die hSC und hMSC wurden bei 350 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 2 ml DMEM resuspendiert. Nanopartikel wurden wie unter Kapitel 3.8.1 beschrieben hergestellt.

Es wurden 10 µl einer Lösung aus PE-CF-gekoppelten Perfluorcarbon-Partikeln (PE-CF-PFC) zugegeben, bei 37 °C inkubiert und jeweils 200 µl der Zellsuspension nach 5, 10, 20, 40, 80 min abgenommen. Die abgenommene Zellsuspension wurde in 200 µl eiskaltes PBS überführt, für 5 min bei 350 g zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer mit 1 µl DAPI resuspendiert. Die Analyse erfolgte am FACSCanto™ II Durchflusszytometer (BD Bioscience) wie unter Kapitel 3.6.2 beschrieben.

3.8.4 Analyse mittels ¹⁹F-Magnetresonanztomographie (MRI)

Ebenso wie bei der ¹H-Magnetresonanztomographie nutzt die ¹⁹F-Magnetresonanztomographie das magnetische Dipolmoment. Dabei hat die Vermessung des ¹⁹F-Isotopes den Vorteil, dass Fluorverbindungen natürlicherweise kaum im Gewebe vorkommen und daher der Hintergrund bei einer Messung gering ist.

Zur Analyse der Endozytose wurden kultivierte hSC und hMSC mit PBS+5mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6-well Platte mit 5 % CO² bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und gleichzeitig jeweils 50 µl ¹⁹F-Perfluorcarbon-Nanopartikel (PFC) zugegeben. Die dabei verwendeten Nanopartikel wurden wie unter Kapitel 3.8.1 beschrieben hergestellt. Anschließend wurden die Zellen für 60 min bei 37 °C inkubiert, viermal mit PBS gewaschen und mit wenigen Tropfen Trypsin+5 mM EDTA abgelöst.

Die Zellen wurden in 1 ml PBS überführt und bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 500 µl 0,5 % Paraformaldehyd (PFA) resuspendiert und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, bei 350 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert.

Die Messung erfolgte mittels MRI gemäß eines etablierten Verfahrens [146] an einem Bruker AVANCEIII 9.4 Tesla Wide Bore (89 mm) NMR Spektrometer. Dabei wurde in einem ersten Schritt ein Protonenbild erzeugt, um das zu untersuchende Areal der Zellsuspension zu bestimmen. In einem zweiten Schritt wurde das ¹⁹F-Bild aufgenommen.

3.9 Analyse der zellulären Zytokinsekretion bei hSC und hMSC nach Stimulation mit A_{2A}- oder A_{2B}-Rezeptoragonisten

Die Stimulation der Rezeptoren erfolgte mit dem A_{2A}-Rezeptoragonist CGS-21680 (Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich), dem A_{2B}-Rezeptoragonist BAY 60-6583 (Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich) oder dem nichtselektiven Adenosinrezeptoragonist NECA (Tocris, Bristol, Vereinigtes Königreich).

Für die Stimulation wurden hSC und hMSC aus Zellkulturflaschen mit Trypsin abgelöst und bei 250 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. In die Kavitäten einer 6-well Platte wurden je 3*10⁵ Zellen ausgesät. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die in DMSO gelösten Agonisten wurden 1:100 mit Medium verdünnt und diese Vorverdünnung (VV) für die Stimulation eingesetzt. Zusätzlich wurde DMSO 1:100 mit Medium verdünnt (DMSO-Medium).

Für die Stimulation der hSC und hMSC mit Adenosinrezeptoragonisten wurde 1,5 ml neues Medium zugegeben. Die Stimulation wurde mit 0,77 µM bzw. 36 µM BAY 60-6583-VV, 2,07 µM bzw. 10 µM CGS-21680-VV oder 14 µM bzw. 100 µM NECA-VV durchgeführt. Als Kontrollen wurden Zellen mit der entsprechenden Menge an DMSO inkubiert. Nach 24 h wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, bei 500 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand als Aliquots für die Analyse der sezernierten Zytokine IL-1β, IL-6, IL-11, MCP1, VEGF, TGF-β und TNFα mittels Multiplex bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mittels PBS+5mM EDTA abgelöst. Anschließend wurde für 5 min bei 350 g zentrifugiert und das Pellet bei -80 °C für die RNA-Isolierung (s. Kapitel 3.7.1.) eingefroren.

Die Überstände von hSC und hMSC wurden gemäß des Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay Instruction Manual (Bio-Rad, München, Deutschland) aufgearbeitet. Die Zytokinkonzentration wurde unter Verwendung der spezifischen Assays (s. Kapitel 2.5) über den Bioplex 200 analysiert und über den Vergleich mit einer Standardreihe berechnet.

3.10 Nachweis der funktionellen Rezeptoren für IL-6 und IL-11 bei hSC

Um zu prüfen, ob bei hSC funktionelle Rezeptoren für die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen durch Zytokine vorliegen, wurden hSC mit IL-6 oder IL-11 stimuliert und die Aktivierung des JAK/STAT3-Signalweges anhand der Phosphorylierung von STAT3 bestimmt. Die Detektion von phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3) und STAT3 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Dazu wurden die Proteine zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Durch Inkubation mit Antikörpern wurden die Proteine markiert und über ein Nachweisverfahren durch Enzymreaktionen detektiert.

3.10.1 Stimulation der hSC mit IL-6 und IL-11

Humane SC wurden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und 3 Tage bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit DMEM ohne Zusätze gewaschen und für 4 h mit DMEM ohne Zusätze inkubiert. Das Medium wurde gewechselt und IL-6 (10 oder 100 ng/mL), IL-11 (10 oder 100 µL) oder 20 ng/mL HyperIL6 (0,2 % Zellkulturüberstand von CHO-K1 Hybridomzellen, [309] zugegeben. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C unter langsamem Schütteln inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen und 1 ml eiskaltes PBS auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4 °C für 5 min bei 500 g pelletiert, der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Lyse der Zellen wurden diese in 100 µl Lysepuffer resuspendiert und für 2 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Das Lysat wurde bei 15.000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Lysepuffer

50 mM Tris HCl pH7,5

150 mM KCl

2 mM EDTA

1 % Nonidet P-40

1 % TritonX100

1 Tablette Complete (für 50 ml)

1 mM NaF

1 mM Na₃VO₄

3.10.2 BCA-Assay

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration aus den Lysaten der stimulierten hSC wurde der Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher) verwendet. Dabei wurden 57 µl H₂O mit 3 µl des Lysats in einem Reaktionsgefäß vermischt und jeweils 20 µl dieser Verdünnung (1:20) in zwei wells einer 96-well Platte pipettiert. Zusätzlich wurde ein Proteinstandard in Doppelbestimmung verwendet. In jedes well wurden 200 µl einer Mischung (50:1) aus Pierce BCA Protein Assay Reagent A (BCA-Lösung) und Reagent B (Kupfersulfat-Lösung) gegeben und die Platte für 30 min bei 37 °C im Dunkeln bei vorsichtigem Schütteln inkubiert. Hierbei erfolgte eine temperaturabhängige Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen sowohl durch Peptidbindungen als auch durch Tyrosin-, Cystein- und Tryptophanreste der Proteine. Die entstandenen Cu⁺-Ionen waren dabei proportional zur enthaltenen Proteinkonzentration und bildeten zusammen mit jeweils zwei BCA-Molekülen einen farbigen Chelatkomplex mit einem Absorptionsmaximum von 562 nm. Dieser Komplex wurde mittels Mikroplatten Reader (Infinite® M200 Pro, Tecan) detektiert. Über eine Eichgrade des Proteinstandards mit definierter Proteinkonzentration von Serumalbumin aus dem Rind (*bovine serum albumin*, BSA) wurden die Proteinkonzentrationen in den Lysaten ermittelt und jeweils 100 µg Protein mit 5-fachem Lämmli-puffer auf 50 µl Volumen aufgefüllt. Die Mischung wurde für 15 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht und danach bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

5-fach Lämmli-puffer 40 ml

5 ml 0.5M Tris-HCL pH6.8

4 ml Glycerol

8 ml 10 % SDS

2 ml 0,05 % Bromphenolblau

2 ml β-Mercaptoethanol

19 ml ddH₂O

3.10.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Trennung von Proteinen aus Proteingemischen wie Zelllysaten hinsichtlich ihrer Größe für den anschließenden Nachweis mittels spezifischer Antikörper wurde mit einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) erreicht. Dabei wurde durch die Anlagerung des negativ geladenen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine ihre natürliche Eigenladung überdeckt und eine negative Gesamtladung des Protein-SDS-Komplexes erreicht. Weiterhin wurden die Proteine mittels β-Mercapthoethanol bei 95 °C durch Reduzierung der Disulfidbrücken und Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen denaturiert.

In einem elektrischen Feld wurden die negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe zur Anode gezogen. Zur Trennung wurden die Proteine auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, welches aus zwei unterschiedlichen Gelschichten, Sammelgel und Trenngel, bestand. Die netzartigen Polyacrylamidstrukturen des Gels behindern die denaturierten Proteine, daher bewegen sich kleine Proteine schneller durch das Gel als große Proteine.

Für die SDS-Gelelektrophorese (Bio-Rad Laboratories) wurde zwischen zwei Glasplatten (12,5 cm x 6,5 cm) mit einem Abstandshalter (1 mm) auf einem Agarosefuß (1 % Agarose in TBS) ein Trenngel gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach 15 min wurde das Isobutanol abgegossen und das ausgehärtete Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Pro Probe (s. Kapitel 3.10.1) wurden 20 µl des Proteinlysats in jeweils eine Tasche des Gels eingefüllt. Zur Kontrolle wurden 5 µl des Molekulargewichtsmarkern (Thermo Fischer) in eine freie Tasche gegeben und das Gel bei 90 V für 2 h in SDS-Laufpuffer behandelt.

Trenngel (10 ml)

4 ml H₂O
3,3 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)
2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
100 ml 10 % SDS
100 µl 10 % APS
4 µl TEMED

Sammelgel (2 ml)

1,4 ml H₂O
0,33 ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)
0,25 ml 0,5 M Tris pH 6,8
20 µl 10 % SDS
20 µl 10 % APS
2 µl TEMED

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
0,1 % SDS
192 mM Glycin

Für die Detektion von STAT3 und pSTAT3 in Lysaten von hSC wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine im semi-dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen.

Dazu wurde die Membran für 2 min in Methanol aktiviert, kurz in Transferpuffer geschwenkt und anschließend auf vier Blätter mit Transferpuffer befeuchtetem Whatman-Papier gelegt. Ein SDS-Gel mit aufgetrennten Proteinen des Zellysats wurde auf die Membran platziert und mit weiteren vier Blättern mit Transferpuffer befeuchtetem Whatman-Papier abgedeckt.

Der Transfer in orthogonaler Richtung zum Gel erfolgte für 1 h bei 20 V. Im Anschluss wurde die Membran für 2 h bei RT in TBST mit 5 % Magermilchpulver inkubiert. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit TBST gewaschen und danach mit dem Primärantikörper pSTAT3(Y705) (Cell Signalling) 1:5.000 in TBST/5 % BSA über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper TrueBlot®Anti-Rabbit IgG HRP (Rockland) 1:1.000 in TBST/5 % Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde sie zweimal mit TBST und hierauf einmal mit TBS gewaschen. Die Membran wurde mit 800 µl Immobilon Western HRP Substrat 50/50 (Merck Millipore) inkubiert, kurz geschwenkt und unmittelbar danach die durch enzymatische Oxidation des Luminols entstandene Chemilumineszenz mittels Intas ECL Chemilum Imager (Intas) detektiert.

Nach der Messung des pSTAT-Signals wurde die Membran zweimal mit TBST gewaschen und für 30 min bei 65 °C in Strippingbuffer inkubiert. Hinterher wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen. Daraufhin erfolgte die Detektion des STAT3-Signales. Hierfür wurde die Membran für 2 h bei RT in TBST mit 5 % Magermilchpulver inkubiert und dann dreimal für 5 min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper STAT3 124H6 (Cell Signalling) 1:5.000 in TBST/5 % BSA erfolgte über Nacht bei 4° C. Nachfolgend wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper TrueBlot®Anti-Rabbit IgG HRP (Rockland) 1:1.000 in TBST/5 % Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde zweimal mit TBST und danach einmal mit TBS gewaschen. Inkubiert wurde die Membran mit 800 µl Immobilon Western HRP Substrat 50/50 (Merck Millipore), kurz geschwenkt und unmittelbar danach die durch enzymatische Oxidation des Luminols entstandene Chemilumineszenz mittels Intas ECL Chemilum Imager (Intas) detektiert.

TBST

10 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % Tween20
Einstellung auf pH8

Transferpuffer

62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
2 % SDS
0,1 % β-Mercaptoethanol

Strippingbuffer 50 ml

62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8)
2 % SDS
0,1 % β-Mercaptoethanol

3.11 Oberflächenproteomanalyse von hSC und rEPDC

Um einen Überblick über die Oberflächenproteine von SC zu erhalten, wurden diese biotinyliert, mittels Neutravidin-Agarose isoliert und mit Nano-Elektrospray-Ionisation (ESI) gekoppelte Massenspektrometrie analysiert.

3.11.1 Biotinylierung von hSC

Die Isolierung von Oberflächenproteinen erfolgte mithilfe des Pierce Cell Surface Protein Isolation Kits (Thermo Fischer). Hierbei werden die Oberflächenproteine biotinyliert und die biotinylierten Proteine nach der Lyse der Zellen an Neutravidin-Agarose gebunden, wobei die biotinylierten Proteine selektiv von intrazellulären Proteinen und anderen Zellbestandteilen getrennt wurden.

hSC wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Zellen wurden von Medium befreit und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Kontrollflaschen wurden mit eiskaltem PBS für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen für die Biotinylierung wurden für 30 min bei 4 °C mit 15 ml Biotinylierungslösung inkubiert. Die Biotinylierung wurde mit 500 µl Quenchinglösung gestoppt, der Überstand verworfen und die Zellen mit 15 ml eiskaltem PBS bedeckt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 15 ml eiskaltem TBS resuspendiert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurde erneut bei 1.000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen bei -20 °C eingefroren.

Die Lyse erfolgte durch Resuspension der Zellen in 600 µl Lysepuffer mit anschließender Inkubation für 30 min auf Eis. Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 13.200 g für 30 min vom Lysat getrennt. Aufgeschlämmte Neutravidin-Agarose (1 ml) wurde dreimal mit Waschpuffer A in einem Reaktionsgefäß mit Ablauf gewaschen. Das Zelllysate wurde zur gewaschenen Neutravidin-Agarose gegeben und die Suspension über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Neutravidin-Agarose viermal mit Waschpuffer A mit cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) und im Anschluss dreimal mit Waschpuffer B mit cOmplete Proteaseinhibitor (Roche) gewaschen.

Die Agarose wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 2 ml TBS gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation bei 1.000 g für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und die Agarose für 2 h bei RT mit 400 µl Lämmli-puffer mit 50 mM DTT inkubiert. Die Säule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert. Das Eluat enthielt die isolierten und aufgereinigten Proteine. Zur Kontrolle der Biotinylierung wurden 20 µl des Eluates auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und eine Silberfärbung durchgeführt (s. Kapitel 3.21.2).

Biotinylierungslösung

48 ml PBS

12 mg Sulfo-SS-NHS Biotin

Quenchinglösung

1M Glycin

Waschpuffer A

PBS

1 % Nonoxinol 40

0,1 % SDS

Waschpuffer B

PBS

1 % Nonoxinol 40

0,5 M NaCl

3.11.2 Bestimmung der Protein-Biotinylierung mittels Silberfärbung, Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie

Eine Bestimmung der erfolgreichen Aufreinigung von biotinylierten Oberflächenproteinen erfolgte mittels Silberfärbung mit dem Roti[®]-Black P Kit (Roth). Dabei wurde durch Anlagerung von SDS an die isolierten Proteine eine negative Gesamtladung der Proteine erhalten, welche genutzt wurde, um Silberionen (Ag^+) an die Proteine anzulagern. Durch Reduktion der angelagerten Silberionen wurde das als schwarzer Niederschlag ausfallende Silber optisch detektiert.

Dazu wurde ein SDS-Gel hergestellt, indem zwischen zwei Glasplatten (12,5 cm x 6,5 cm) mit 1 mm Abstandhalter ein 12 % Trenngel gegossen und mit Isobutanol überschichtet wurde. Nach 15 min wurde das Isobutanol abgegossen und das ausgehärtete Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Je 20 μl Proteinproben vor und nach der Aufreinigung mittels Neutravidin-Agarose wurden mit 5 μl 5-fachem Lämmli-puffer 15 min bei 95 °C inkubiert und in je eine Tasche des SDS-Gels aufgetragen. In eine weitere Tasche wurden 7,5 μl Molekulargewichtsmarker (1 kD) eingebracht und das Gel für 15 min einer Spannung von 80 V und für 1 h von 180 V ausgesetzt und über Nacht bei RT in Fixierlösung inkubiert. Das Gel wurde dreimal für 10 min Minuten mit Waschlösung behandelt und danach für 1 min in Sensibilisierungslösung inkubiert. Es wurde dreimal für 20 sec mit Wasser gewaschen und für 40 min mit Imprägnierlösung behandelt. Anschließend wurde dreimal für 20 sec mit 100 ml Wasser gewaschen und mit Entwicklungslösung solange geschwenkt, bis deutliche Proteinbanden zu sehen waren.

Es wurde zweimal für 20 sec mit Wasser gewaschen und zweimal für 30 sec mit Stopplösung P inkubiert, gefolgt von 10 min Inkubation mit Stopplösung P. Gele wurden in Waschlösung bei 4 °C gelagert. Eine optische Detektion erfolgte mittels Canon LiDE 700F (Canon) analysiert.

Sammelgel

1 ml Tris 1,5 M, pH 6,8
1 ml Acrylamid
4 ml ddH₂O
80 µl 10 % APS
20 µl TEMED

Trenngel 12 %

1,5 ml Tris 1,5 M, pH 8,8
5,1 ml Acrylamid
5,34 ml ddH₂O
60 µl 20 % SDS
80 µl APS
20 µl TEMED

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
0,1 % SDS
192 mM Glycin

Fixierlösung

20 ml Methanol
12 ml Essigsäure
50 µl Formaldehyd aus Reaktionsgefäß D
68 ml ddH₂O

Waschlösung 1 l

200 ml Methanol
800 ml ddH₂O

Sensibilisierungslösung

100 ml ddH₂O
gesamter Inhalt des Reaktionsgefäßes A (Natriumthiosulfat) in 1 ml ddH₂O

Imprägnierlösung

100 ml ddH₂O
gesamter Inhalt des Reaktionsgefäßes B (Silbernitrat) in 1 ml ddH₂O
75 µl aus Reaktionsgefäß D (Formaldehyd)

Entwicklungslösung

20 ml Natriumcarbonat-Lösung (Reaktionsgefäß E gelöst in 250 ml ddH₂O)

60 ml ddH₂O

gesamter Inhalt des Reaktionsgefäßes C (20 µl aus Reaktionsgefäß A /480 µl ddH₂O)

70 µl aus Reaktionsgefäß D (Formaldehyd)

Auffüllung mit ddH₂O auf 100 ml

Stopplösung P

60 ml Methanol

36 ml Eisessig

204 ml ddH₂O

Für die Bestimmung der Biotinylierung mittels Immunfluoreszenz wurden kultivierte Zellen mit PBS+5 mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen in einer 6-well Platte mit Deckgläschen mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden biotinyliert die Reaktion mit 200 µl Quenchinglösung abgestoppt, der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen (vgl. Kapitel 3.21.1). Die Zellen wurden für 30 min mit WGA Alexa Fluor® 633 (Invitrogen, 10 µg/ml) und Streptavidin-FITC (1:1000) bei RT inkubiert. Hiernach wurden die Zellen dreimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen, für 10 min bei RT mit Zamboni-Fixierlösung inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit ProLong® Gold Antifade mit DAPI auf einem Objektträger eingedeckt. Die Proben wurden mit Klarlack versiegelt, getrocknet und mittels Lichtrastermikroskop (LSM 710, Zeiss) analysiert.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung wurden kultivierte Zellen mit PBS/5 mM EDTA abgelöst, mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet resuspendiert und jeweils $1 \cdot 10^4$ Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 30 min bei 4 °C mit 1 ml PBS/50 µl Biotinylierungslösung inkubiert. Die Biotinylierung wurde mit 200 µl Quenchinglösung abgestoppt, der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und für 1 h mit 1 ml PBS/1 µl Streptavidin-FITC inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bei 350 g für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 500 µl PBS resuspendiert und mittels BD FACSCanto™ II analysiert.

3.11.3 Massenspektrometrie mit Nano-Elektrospray-Ionisation (ESI)

Die im Folgenden beschriebene massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteine wurde von Dr. Gereon Poschmann (Molecular Proteomics Laboratory (MPL), Düsseldorf) gemäß eines etablierten Protokolls [310] durchgeführt.

Dabei wurde zunächst die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) ermittelt und die Proteine über eine 2D-Gelelektrophorese getrennt. Proteinbanden wurden über eine Silberfärbung identifiziert, die Proteine wieder entfärbt und aus dem Gel extrahiert. Die Proteine wurden mit Trypsin gespalten und mittels Flüssigkeitschromatographie (Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatography System, Thermo Fisher) aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine auf einer ersten Säule (Acclaim PepMap100, Thermo Fisher) bei einer Flussgeschwindigkeit von 6 μ l/min für 10 min mit 0,1 % TFA als mobiler Phase zuerst aufkonzentriert. Im Anschluss daran wurden sie auf einer analytischen Säule (Acclaim PepMapRSLC, Thermo Fisher) bei einer Flussgeschwindigkeit von 300 nl/min bei 60 °C für 2 h mit einem Gradienten von 4 – 40 % Lösung B (0,1 % (v/v) Methansäure, 84 % (v/v) Acetonitril in Wasser) und Lösung A (0,1 % (v/v) Methansäure in Wasser) getrennt.

Bei der Trennung war der Flüssigkeitschromatograph an ein Massenspektrometer über eine Nano-Elektrospray-Ionisationsquelle (HCTplus, Bruker Daltonics) gekoppelt. Für die Analyse der Proteine wurden dabei zwei verschiedene Quadrupol-Ionenfallen-Massenspektrometer (Q Exactive, Thermo Fisher; Orbitrap Elite, Thermo Fisher) eingesetzt.

3.11.4 Proteinidentifikation und Datenanalyse

Die Identifikation der Proteine aus den Daten der Massenspektrometrieanalyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Gereon Poschmann (Molecular Proteomics Laboratory (MPL), Düsseldorf) und Dr. Sebastian Temme (Institut für molekulare Kardiologie, Düsseldorf) mithilfe des MaxQuant framework (Version 1.5.3.8) durchgeführt.

Die identifizierten Peptidspektren wurden gegen die Proteomdatenbanken von UniProtKB abgeglichen, wobei die Sensitivität und Spezifität jeweils 99 % betrug, d. h. die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven bzw. falsch-negativen Proteinen lag bei 1 %. Um die Spezifität weiter zu erhöhen, wurden in der Analytik nur Proteine akzeptiert, die durch mindestens zwei unterschiedliche Peptide identifiziert wurden. Zudem wurden mögliche Modifikationen der Peptide (Acetylierung des N-Terminus, Oxidationen von Methionin und Carbamidomethylierungen) in die Analytik mit einbezogen.

Die Option für markierungsfreie Quantifizierung wurde aktiviert und als Voraussetzung hierfür mindestens zwei mögliche Peptidintensitätsverhältnisse gewählt, wobei im Verlauf der Prozessierung nochmal eine Requantifizierung erfolgte. Durch Aktivierung der entsprechenden Option bestand außerdem die Möglichkeit, Identifizierungsinformationen durch den Abgleich der m/z und Retentionszeitdaten von einem Lauf auf einen anderen zu übertragen.

Um eine Kontamination mit zytosolischen Proteinen auszuschließen, wurden ausschließlich Proteine mit Transmembrandomäne (TMHMM Server v. 2.0 [311]), Signalpeptid (SignalP 4.1 server [312]) oder GPI-Anker (PredGPI [313]) einbezogen.

Weiterhin wurden nur Proteine berücksichtigt, welche in wenigstens zwei unabhängigen biologischen Proben identifiziert wurden. Für den Vergleich der Proteine zwischen Ratten und Menschen wurden die orthologen Ratten-Proteine in den humanen Proben über die Ensembl Biomart Datenbank (Ensembl database Release 83) identifiziert. Weiterhin wurde eine funktionelle Anreicherung der Daten mithilfe von Cytoscape plugin ClueGO (Version 2.2.4) durchgeführt.

Zwischen Ratten und Menschen überlappende Proteine wurden unter Berücksichtigung von GO processes (Version 23.05.2012), KEGG (Version 24.05.2012) und REACTOME (Version 11.07.2012) analysiert. Dabei wurden 160 Gengruppen erstellt (Signifikanz bei $P < 0,005$), welche anschließend manuell in acht Kategorien eingeteilt wurden. Für die grafische Darstellung wurde die Software Projekt R verwendet.

3.12 Immortalisierung von hSC

Um hSC zu immortalisieren, wurden lentivirale Vektoren verwendet, welche in hSC für zyklin-abhängige Kinase 4 (CDK4) oder humane Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) kodieren.

3.12.1 Plasmidamplifikation und -isolierung

Die für die Immortalisierung benötigten Helferplasmide pMD2.G und psPAX2 sowie die CDK4 bzw. hTERT-tragenden Plasmide pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4 und pBabe-hygro-hTERT (s. Kapitel 2.8.3) wurden zunächst in *E.coli* amplifiziert. Dazu wurden bei -80 °C gelagerte kompetente XL1blue Zellen (s. Kapitel 2.8.2) auf Eis aufgetaut, mit $0,5\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA (s. Kapitel 2.8.3) versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 2 min wurde die Zellmembran permeabilisiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde $300\text{ }\mu\text{l}$ vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde auf einer Zellkulturplatte mit LB-Agar und dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektionierung ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

LB-Medium 1 l

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Einstellung auf pH 7, ggf. Zugabe von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicilin oder 50 mg/ml Kanamycin

LB-Agar 1 l

1 l LB-medium

15 g Agar

Autoklavierung des Mediums, ggf. Zugabe von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Ampicilin oder 50 mg/ml Kanamycin

Eine angewachsene Kolonie der ausplattierten Transformationslösung wurde gepickt, in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum überführt und für 6 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Suspension wurde bei 2.500 g für 15 min zentrifugiert und das Pellet bei -80 °C eingefroren. Für die Isolierung der Plasmide aus den Zellen wurde das NucleoBond Xtra midi EF-Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gemäß der Anleitung verwendet.

3.12.2 Analyse der Plasmide

Die Analyse der Plasmide erfolgte mittels analytischer Agarosegelelektrophorese. Dazu wurden die Plasmide zunächst mittels Restriktionsverdau linearisiert, da sich aufgrund ihrer nativen *coiled coil*-Struktur eine Wanderungsgeschwindigkeit im Gel ergibt, welche nicht relativ zu ihrer eigentlichen Größe ist. Für die Linearisierung werden Restriktionsendonukleasen (RE) verwendet, welche in der Lage sind, DNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu schneiden. Dabei können die 3'- und 5'-Enden des DNA-Doppelstranges entweder an der gleichen Stelle (*blunt-ends*) oder versetzt mit Überhang (*sticky-ends*) geschnitten werden. Die RE können genutzt werden, um DNA in Plasmide zu klonieren, aus diesen herauszuschneiden oder Plasmide für eine analytische Agarose-Gelelektrophorese zu linearisieren. Für Letzteres wird dabei eine RE verwendet, welche an nur einer Stelle das Plasmid schneidet. Dabei besteht jedoch die Gefahr einer Religation.

Für ein analytisches Agarosegel wurden in einem Restriktionsverdau 1 µg Plasmid-DNA mit 1 µl Restriktionsenzym und 5 µl Restriktionspuffer gemischt und auf 50 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

Tabelle 14: Verwendete Restriktionsansätze

Plasmid	Restriktionsendonuklease	Restriktionspuffer
pBABE-Hygro-hTERT	EcoRI/ XagI	EcoRI-Puffer
pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4	EcoRV oder EcoNI	Puffer R 10x
pMD2.G	HindIII	Puffer R 10x
psPAX2	EcoRV	Puffer R 10x

Der Ansatz wurde für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bei -80 °C gelagert. Für die Analyse der für die Immortalisierung zu verwendenden Plasmide wurden 10 µl des Restriktionsansatzes (s. Tabelle 14) mit 2 µl Orange DNA Loading Dye (6X) gemischt und auf ein 0,7 % Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Ethidiumbromid ist eine in DNA interkalierende Substanz und kann unter UV-Licht detektiert werden, weshalb es zur Markierung der DNA im Agarosegel dient.

Als Molekulargewichtsmarker wurden 7,5 µl Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder aufgetragen und das Gel in der Gelkammer mini SubCell GT (Bio-Rad) für 90 Minuten mit 50 V laufen gelassen.

Dabei erfolgte eine Trennung der Proteine, da die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA antiproportional zu ihrer Größe ist und somit kleinere DNA-Sequenzen eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen. Eine Analyse erfolgte über das interkalierte Ethidiumbromid mittels UV-Licht am FUSION-FX7 SPECTRA (Vilber).

1 l 50-fach Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer (TAE)

242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (1 M = 372,24 g/l)
Auffüllung mit ddH₂O auf 1 l, Einstellung auf pH 8,3

0,7 % Agarosegel (80 ml)

0,56 g Agarose
80 ml TAE-Puffer
Aufkochen in der Mikrowelle, Zugabe von 3 µl Ethidiumbromid

3.12.3 Herstellung von Lentiviren

Die Herstellung von Lentiviren für die Immortalisierung von hSC erfolgt durch Transfektion von HEK293FT-Zellen mit den Zielplasmiden (pBABE-hygro-hTERT oder pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4 (s. Kapitel 2.8.3)) zusammen mit den Helferplasmiden psPAX2 und pMD2.G. Dabei besitzen die Helferplasmide die Virusgene *gag*, *pol* und *env*, welche für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine kodieren. In Kombination mit den Zielplasmiden können sich so Lentiviren mit den gewünschten Plasmiden ausbilden, welche in den Zellkulturüberstand entlassen werden.

Kryokonservierte HEK293FT-Zellen wurden aus flüssigem Stickstoff entnommen, kurz angetaut und in 3 ml HEK-Kulturmedium überführt. Weitere 5 ml Medium wurden zugegeben und die Zellen anschließend für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Zellen wurden mit neuem Medium resuspendiert und in eine 275 cm² Zellkulturflasche überführt.

Ein Mediumwechsel wurde am Folgetag durchgeführt, danach alle 48 bis 72 h. Bei 90 % Konfluenz wurden jeweils 4×10^6 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Für jede Zellkulturschale wurden jeweils die beiden Hilfsvektoren 5 µg psPAX2 und 3 µg pMD2.G mit entweder 10 µg pBABE-hygro-hTERT oder 10 µg pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4 (s. Kapitel 2.8.3) vermischt und die Lösung mit Opti-MEM auf 1 ml aufgefüllt. Gleichzeitig wurden pro Zellkulturschale 45 µl PEI (1 mg/ml) mit 955 µl Opti-MEM gemischt. Beide Lösungen wurden kombiniert und 30 min bei RT inkubiert. Von den kultivierten HEK293FT-Zellen wurde das Medium entfernt und 4 ml Opti-MEM+15 % FCS zugegeben. Anschließend wurden 2 ml der Plasmid/PEI-Lösung zugegeben. Nach 12 h wurde das Medium abgenommen und 10 ml IMDM-Medium zugegeben.

Mit einer Einwegspritze wurden 48 h nach der Transfektion der lentivirale Überstand abgenommen und die Zellen verworfen. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Sterilfilter in ein Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

HEK-Kulturmedium

DMEM

10 % FCS

1 % MEM

2 mM Glutamax

3.12.4 Lentivirale Transduktion von hSC und Antibiotikaselektion

Die Immortalisierung von hSC mit hTERT oder CDK4 wurde mittels lentiviraler Transfektion durchgeführt. Dazu wurden hSC in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und auf 80 % Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wurde abgenommen und 4 ml Medium mit 30 % FCS und 16 ng/ml Polybrene sowie 4 ml des bei der Transfektion von HEK293FT-Zellen gewonnenen lentiviralen Zellkulturüberstands (s. Kapitel 3.22.3) auf die Zellen gegeben. Für die Doppeltransfektion mit hTERT und CDK4 wurden jeweils 2 ml des lentiviralen Zellkulturüberstands von hTERT-transfizierten HEK293FT-Zellen und CDK4-transfizierten HEK293FT-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für 48 h Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und hSC-Medium auf die Zellen gegeben. Nach 48 h wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und eine Antibiotikaselektionierung mit 0,8 µg/ml Puromycin oder 17,5 µg/ml Hygromycin durchgeführt.

Die hierfür eingesetzten Konzentrationen wurden in einem separaten Versuch ermittelt, bei welchem hSC mit steigender Antibiotikakonzentration inkubiert und die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei welcher alle Zellen im well abstarben, für die Antibiotikaselektionierung der immortalisierten hSC verwendet wurde.

Das Medium wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen alle zwei bis drei Tage erneuert. Für die Doppeltransfektion wurde abwechselnd jeweils mit 0,8 µg/ml Puromycin oder 17,5 µg/ml Hygromycin in hSC-Medium inkubiert. Anschließend wurden überlebende Zellen mit hSC-Medium ohne Antibiotikum expandiert und mittels mRNA-Analyse und Durchflusszytometrie analysiert.

4 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von stromalen Zellen (hSC) aus menschlichen Vorhöfen aus Biopsiematerial bei herzchirurgischen Eingriffen.

Um hSC aus humanen atrialen Biopsien charakterisieren zu können, musste zunächst ein robustes Protokoll für die zuverlässige Isolierung und Kultivierung etabliert werden. Weiterhin wurde analysiert, ob sich Zellen - isoliert aus dem Myokard und Epikard derselben Biopsie - voneinander unterscheiden (Kapitel 4.1.1 - 4.1.2).

Weiterhin wurde untersucht, ob die hSC über einen Zeitraum von mehreren Wochen in Kultur ihre Stamm- bzw. Progenitorzeleigenschaften beibehalten und inwiefern sich die isolierten hSC von anderen kardialen Zelltypen abgrenzen lassen (Kapitel 4.1.3).

Für die Charakterisierung der hSC wurden diese hinsichtlich der Expression verschiedener Zellmarker auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu hMSC analysiert (Kapitel 4.2.2).

Ebenfalls wurde die Fähigkeit zur Endozytose von hSC untersucht (Kapitel 4.2.1).

Weiterhin wurde das basale Sekretom analysiert und detektiert, wie sich dieses nach Stimulation mit spezifischen A_{2A}/A_{2B} -Agonisten verändert (Kapitel 4.2.3 - 4.2.4).

Zusätzlich wurde eine Oberflächenproteomanalyse der hSC durchgeführt (Kapitel 4.2.5).

Als letzter Punkt wurde untersucht, ob aus hSC mittels lentiviraler Transfektion eine immortalisierte Zelllinie hergestellt werden kann (Kapitel 4.2.6 – Kapitel 4.2.7).

4.1 Gewinnung und Charakterisierung von hSC aus atrialen Biopsien

Während EPDC aus dem Ventrikel von Ratten nach Ischämie und Reperfusion (I/R) vergleichsweise gut beschrieben sind [7, 19], wurden EPDC aus humanen Herzen (hEPDC) bisher kaum charakterisiert. Ein Grund hierfür ist, dass humane Biopsie-Proben aus den Ventrikeln von infarzierten Herzen praktisch nicht verfügbar sind. Da sich hEPDC während der embryonalen Herzentwicklung auch im Bereich der Vorhöfe ansiedeln, wurde daher untersucht, ob sich hEPDC alternativ aus atrialen Biopsien von Patienten, welche im Rahmen von Bypassoperationen, Herzklappenoperationen oder Herztransplantationen gewonnen wurden, isolieren lassen.

4.1.1 Isolierung und Kultivierung von hSC

Zunächst musste ein Protokoll etabliert werden, um die in der Biopsie enthaltenen hSC zu isolieren und *in vitro* zu kultivieren (s. Kapitel 3.2). Als Grundlage dienten dazu etablierte Protokolle zur Isolierung von Ratten-EPDC (rEPDC) [146] sowie zur Isolierung von humanen stromalen Zellen und Stammzellen aus Biopsiegewebe [155, 314].

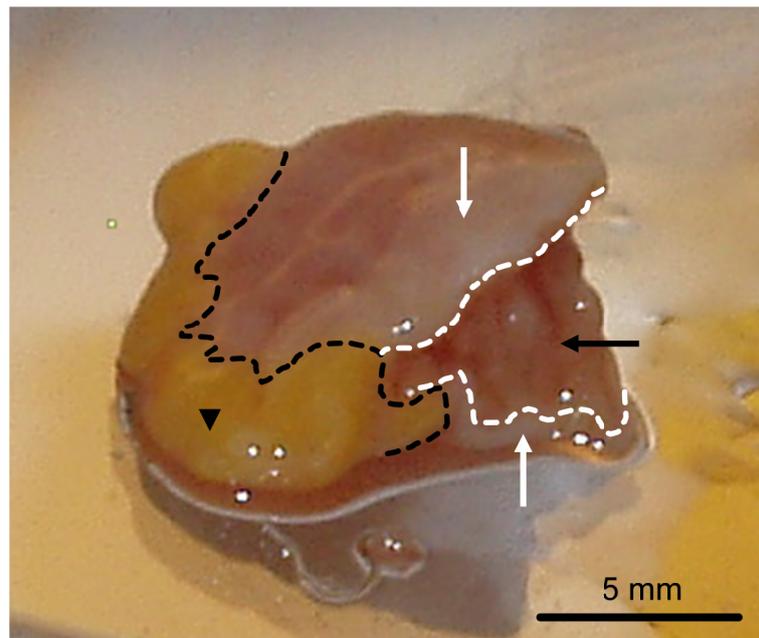


Abb. 4.1: Bild einer humanen atrialen Biopsie

Für die Isolierung der Zellen wurden Biopsien humaner Vorhöfe von der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie Düsseldorf erhalten. Dabei wurden das Fett (schwarze Pfeilspitze) mit einem Skalpell abgetrennt, Epikard (weiße Pfeile) und Myokard (schwarzer Pfeil) getrennt voneinander bearbeitet und die Zellen in Zellkulturflaschen kultiviert.

Die erhaltenen Biopsien wurden nach Entnahme wie in Abbildung 4.1 optisch in Fettgewebe, Epikard und Myokard unterteilt. Das weiche, gelbe Fettgewebe am Randbereich der Biopsie wurde mit einem Skalpell mechanisch separiert (schwarze Linie). Anhand der Schnittkante der Biopsie wurde das verbleibende Gewebe in Epikard (außen) und Myokard (innen) mit einem Skalpell getrennt (weiße Linien).

Myokard und Epikard wurden separat in Kollagenase-Lösung verdaut und die entstandene Zellsuspension gefiltert und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt. Das detaillierte Protokoll ist in Abschnitt 2.2 dieser Arbeit beschrieben.

Die angewachsenen Zellen wurden zunächst als humane stromale Zellen (hSC) bezeichnet, da im Rahmen dieser Arbeit schrittweise untersucht werden musste, ob es sich hierbei tatsächlich um hEPDC handelt.

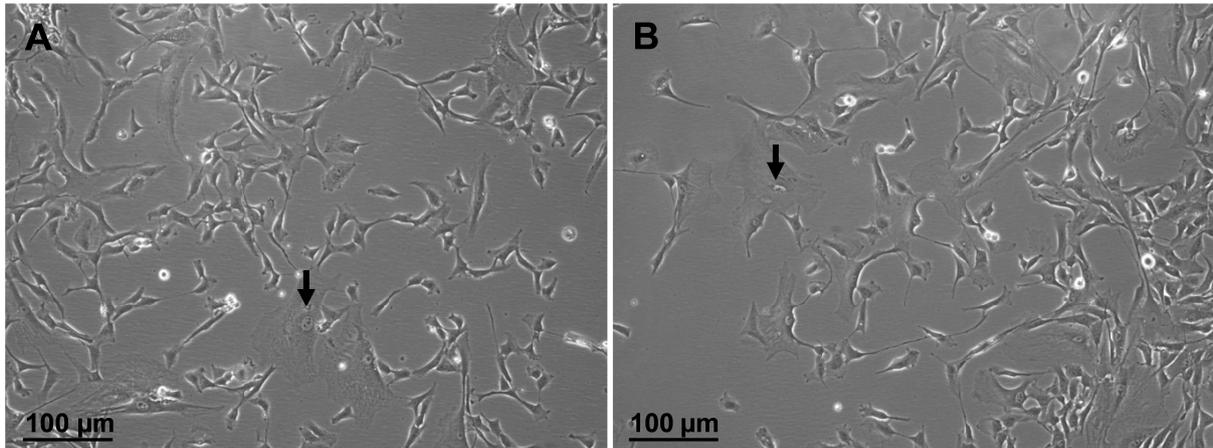


Abb. 4.2: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von kultivierten hSC aus atrialem Myokard (A) und Epikard (B)

Zu sehen sind die aus humanen Vorhoffbiopsien kultivierten hSC aus Myokard (A) und Epikard (B) 2 Wochen nach der Isolierung. Beide Fraktionen zeigen eine heterogene Population mit mesenchymalem, spindelförmigen Phänotyp sowie Myofibroblast ähnlichen Zellen (schwarze Pfeile).

In Abbildung 4.2 sind die aus atrialem Myokard (A) und Epikard (B) isolierten Zellen nach 2 Wochen in Kultur abgebildet. Der Großteil dieser Zellen zeigt einen typischen mesenchymalen Phänotyp mit länglich-spindelförmiger Zellstruktur, jedoch waren auch Zellen mit größerem Zellumfang (schwarze Pfeile) zu sehen, welche eher an Myofibroblasten erinnern. Dabei war kein Unterschied zwischen hSC aus atrialem Myokard und Epikard in Bezug auf den Phänotyp zu erkennen.

4.1.2 Basale Charakterisierung stromaler Vorhofzellen

Die isolierten und kultivierten hSC (aus Myokard und Epikard) wurden mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich folgender Oberflächenmarker untersucht, die in der Literatur [147, 315] für die Charakterisierung mesenchymaler Stamm- bzw. Progenitorzellen eingesetzt wurden: CD73 und CD90 als mesenchymale Stamm- bzw. Progenitorzellmarker, die Stammzellmarker CD105, CD44 und c-Kit sowie als Kontrolle der Endothelmarker CD31.

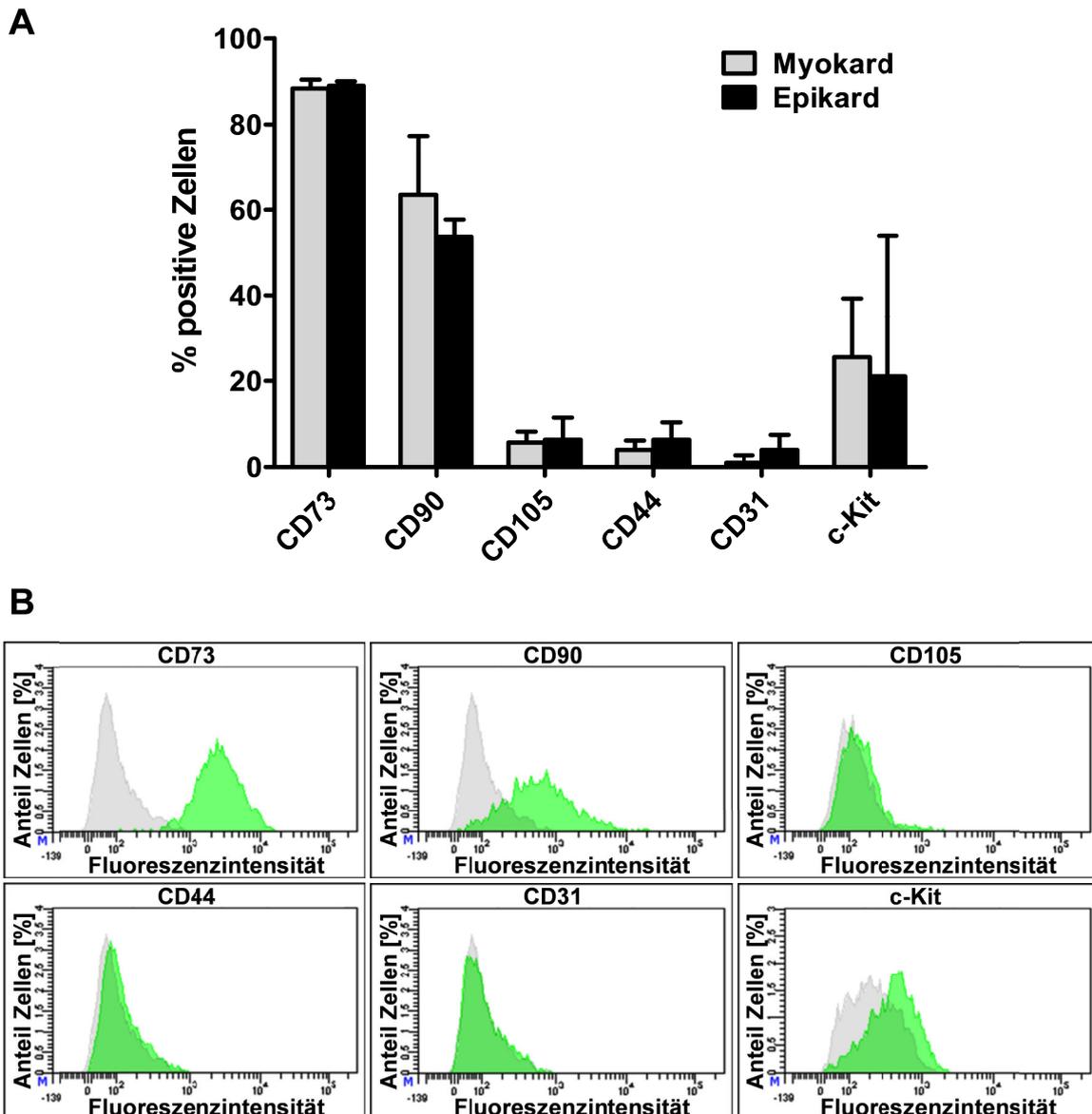


Abb. 4.3: Vergleich der untersuchten Oberflächenmarker von hSC aus Myokard und Epikard mittels Durchflusszytometrie

Unter (A) ist die statistische Analyse der Oberflächenmarker von hSC aus Myokard (graue Balken) und Epikard (schwarze Balken) abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD ($n = 3$). Darunter (B) sind exemplarisch repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen von epikardialen hSC gezeigt, welche den Histogrammen der myokardialen hSC stark ähneln. Graues Histogramm = Kontrolle ohne Primärantikörper, grünes Histogramm = Oberflächenmarker-Expression.

In Abbildung 4.3 (A) ist die Expression der untersuchten Oberflächenmarkerproteine als Vergleich zwischen hSC aus Myokard und Epikard dargestellt. Es zeigt sich, dass die hSC aus Myokard und Epikard sich in ihrem Expressionsverhalten in Bezug auf die untersuchten Marker nicht signifikant unterscheiden ($P > 0,05$). Beide hSC-Fraktionen weisen einen hohen Anteil positiver Zellen für CD73 und CD90 auf ($> 90\%$).

Der Stammzellmarker c-Kit wird bei deutlich weniger Zellen exprimiert (~ 20 %). In sehr wenigen Zellen sind die Stammzellmarker CD105 und CD44 sowie der Endothelmarker CD31 auf der Oberfläche nachweisbar (< 10 %).

Weiterhin wurde für die Charakterisierung der hSC RNA von für zwei bis drei Wochen kultivierten hSC aus Myokard und Epikard isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und über qPCR analysiert. Hierbei wurde ein Fokus auf die Analyse von aus der Literatur bekannten epikardialen Markern sowie frühen und späten kardialen Marker gelegt [316, 317]).

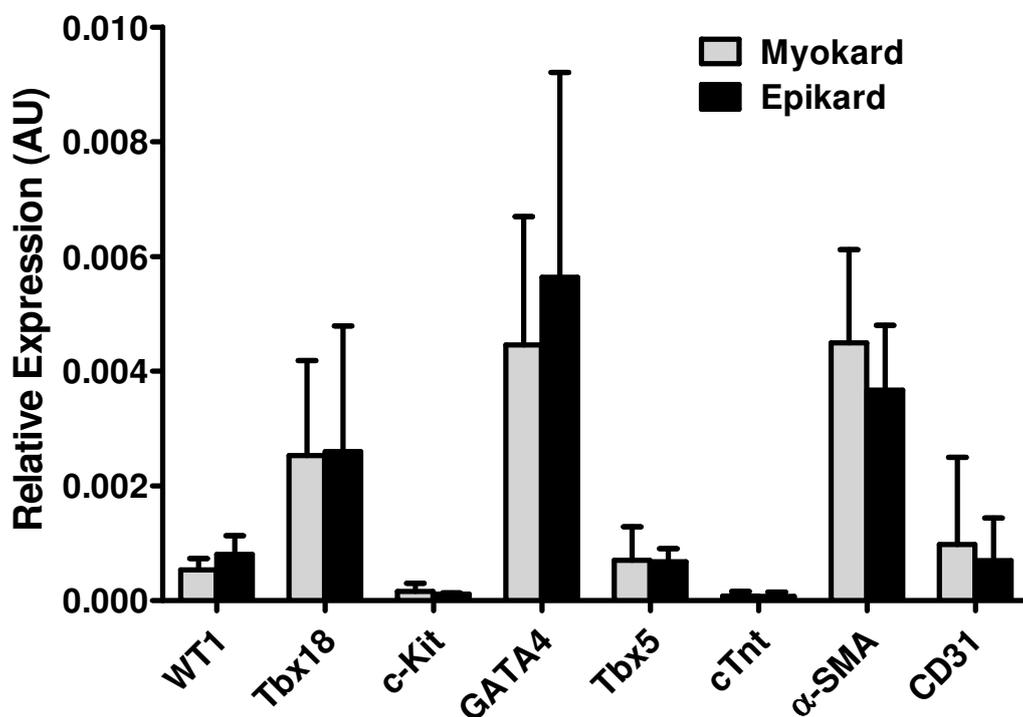


Abb. 4.4: Vergleichende quantitative Analyse der mRNA-Expression verschiedener Markergene in hSC aus Myokard und Epikard

Die mRNA von kultivierten hSC aus Myokard (graue Balken) und Epikard (schwarze Balken) humaner atrialer Biopsien wurde isoliert und mittels qRT-PCR quantifiziert. Abgebildet ist die statistische Analyse der Expression der epikardialen Marker WT1 und Tbx18, die Stamm- bzw. Progenitorzellmarker c-Kit und Tbx5, der frühe kardiale Marker GATA4, der späte kardiale Marker cTnt sowie der EMT-Marker α-SMA und der Epithelmarker CD31 von hSC aus Myokard und Epikard. Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen beta-Actin normiert. Dargestellt sind Mittelwerte±SD, jeweils n = 3.

Wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist, unterscheiden sich die Zellen aus Myokard und Epikard in den untersuchten Genen nicht signifikant voneinander ($P > 0,05$). So exprimieren sie in gleicher Weise die epikardialen Marker WT1 und Tbx18 sowie den Stammzellmarker c-Kit in geringem Umfang.

Überraschenderweise werden die frühen kardialen Marker GATA4 und Tbx5 in hohem Maße exprimiert, während der späte kardiale Marker cTnt kaum detektiert werden konnte. Hingegen stark exprimiert wird α -SMA, ein Marker für EMT. Des Weiteren kann eine Expression des Endothelmarkers CD31 festgestellt werden.

Als weitere Untersuchung wurden die für zwei bis drei Wochen kultivierten hSC aus Myokard und Epikard mittels Immunfluoreszenz auf die Expression von Zellmarkern auf Proteinebene hin analysiert.

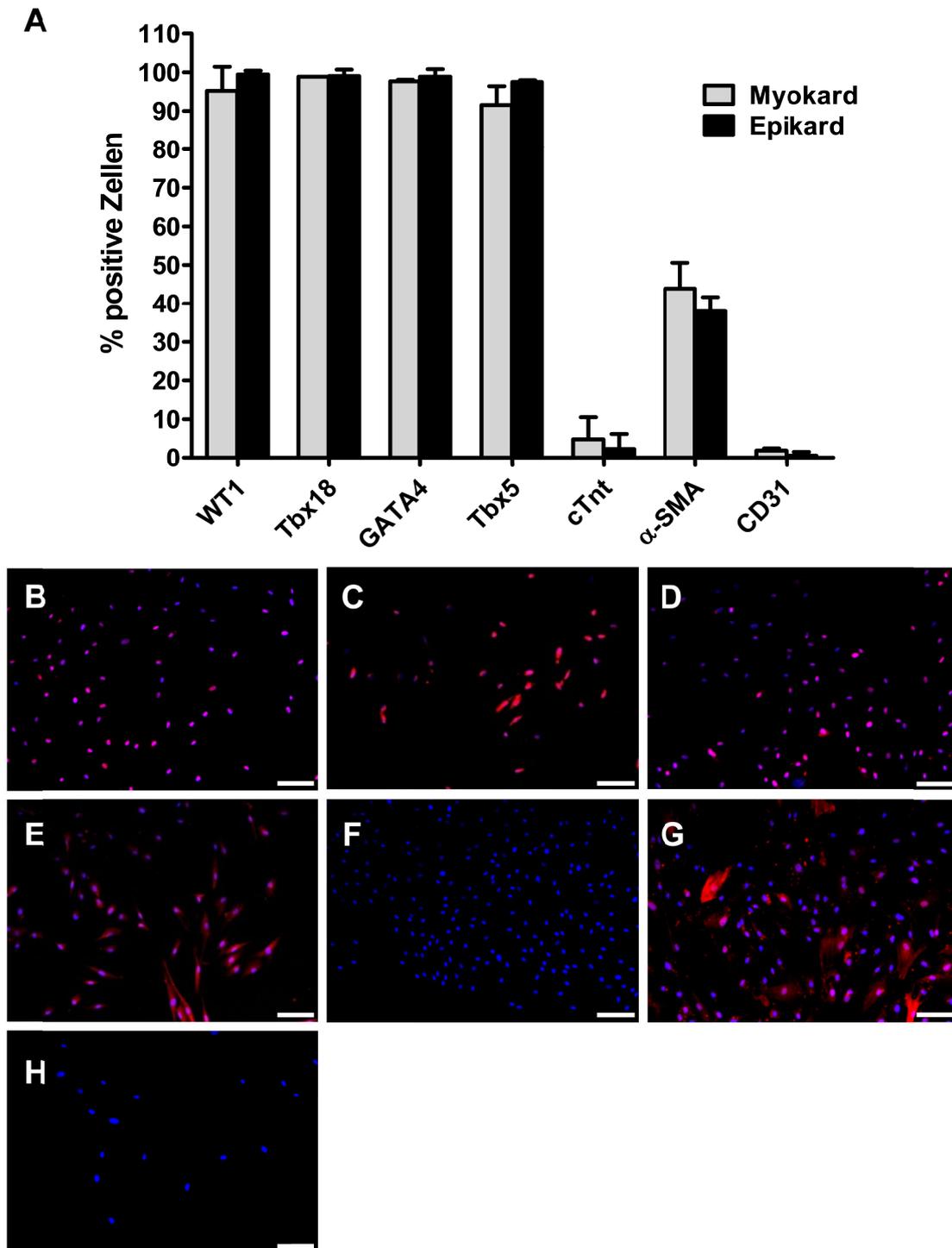


Abb. 4.5: Vergleich der Expression verschiedener Markerproteine von hSC aus Myokard und Epikard mittels Immunfluoreszenzanalyse *in vitro*

Die statistische Analyse der Markerproteine von hSC aus Myokard (graue Balken) und Epikard (schwarze Balken) in A dargestellt. Ausgewertet wurden Zellen von jeweils 5 mikroskopischen Aufnahmen mit insgesamt mindestens 200 Zellen pro Marker. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3. Weiterhin sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von epikardialen hSC dargestellt. Analysiert wurden die epikardialen Marker WT1 (B) und Tbx18 (F), die frühen kardialen Marker GATA4 (C) und Tbx5 (D), der späte kardiale Marker cTnt (E), der EMT-Marker α -SMA (G) sowie der Epithelmarker CD31 (H). Rot: analysiertes Protein, blau: DAPI. Skala: 100 μ m.

Wie in der Abbildung 4.5 **A** ersichtlich, zeigt die zusammengefasste statistische Analyse, dass sich hSC aus Myokard und Epikard bezüglich der Expression der untersuchten Markerproteine nicht signifikant voneinander ($P > 0,05$) unterscheiden. In beiden Zellpopulationen können die epikardialen Marker WT1 und Tbx18 in fast allen Zellen detektiert werden. Auch die Expression der frühen kardialen Zellmarker Tbx5 und GATA4 können in beinahe allen Zellen beider Zellpopulationen gefunden werden.

Der späte kardiale Marker Tnnt wird hingegen nur bei einigen wenigen Zellen mit schwacher Expression detektiert. Ebenfalls kann bei nur wenigen Zellen die Expression des Endothelmarker CD31 nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigt nur ein Teil der hSC (~ 40 %) die Expression des EMT-Marker α -SMA.

Die in Abbildung 4.5 **B-H** gezeigten repräsentativen Aufnahmen epikardialer hSC, welche sich nicht von Aufnahmen myokardialer hSC unterscheiden, zeigen die starke Expression sowohl von epikardialen Markern wie WT1 (**B**) und Tbx18 (**F**) als auch von kardialen Markern wie GATA4 (**C**) und Tbx5 (**D**) in mehr als 90 % der Zellen. Dabei zeigen sowohl WT1 und Tbx18 als auch GATA4 eine Kernlokalisierung, wohingegen Tbx5 sowohl eine Kern- als auch eine zytosolische Lokalisation aufweist. Während der EMT-Marker α -SMA (**G**) in manchen Zellen exprimiert wird, zeigen der Endothelmarker CD31 (**H**) und der späte kardiale Marker cTnt (**E**) keine Expression.

Da die untersuchten hSC aus dem Myokard keine Unterschiede zu den hSC aus dem Epikard in Bezug auf ihr analysiertes Expressionsmuster zeigten, wurde untersucht, ob die hSC homogen im atrialen Gewebe verteilt sind oder sich vorzugsweise im Epikard befinden. Für die Untersuchung der Lokalisation wurden Kryoschnitte von Biopsien angefertigt und mit Antikörpern gegen cTnt für die Detektion von Kardiomyozyten angefärbt sowie mit dem epikardialen Stammzellmarker WT1, welcher als EPDC-Marker dient, farbig markiert (s. Kapitel 3.5.1).

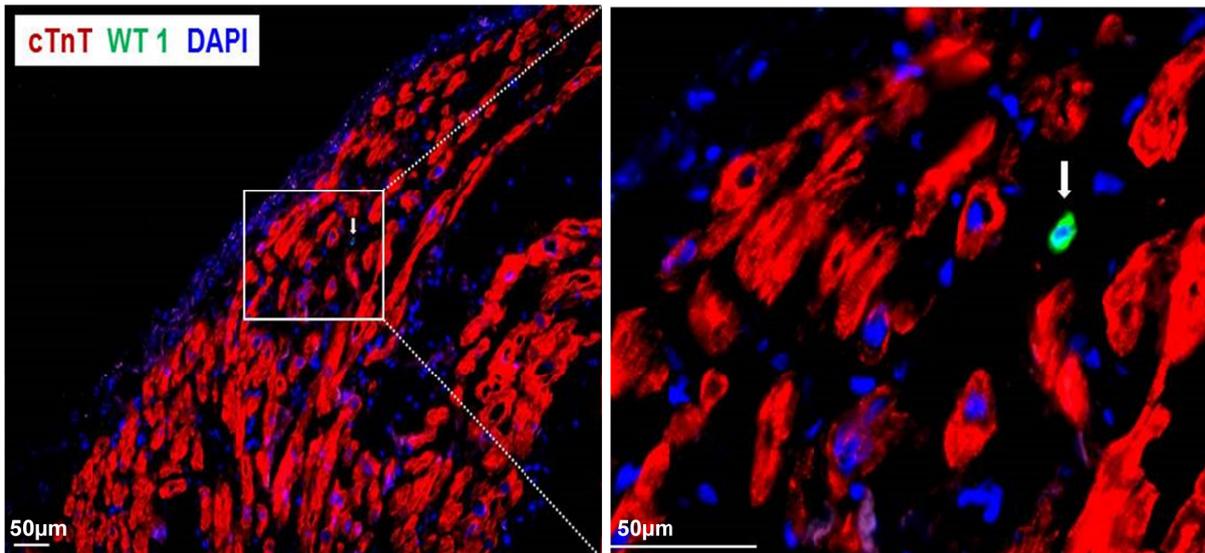


Abb. 4.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Kryoschnittpräparates einer humanen Vorhoffbiopsie

Kryoschnittpräparate (8 µm) einer humanen Vorhoffbiopsie wurden mit Antikörpern gegen kardiales Troponin T (cTnT, rot) und WT1 (grün) sowie mit DAPI (blau) gefärbt. Einzelne WT1⁺-Zellen können dabei im Myokard der Biopsie identifiziert werden (weißer Pfeil).

Wie die Abbildung 4.6 zeigt, können mithilfe der Antikörperfärbung der Zellkerne mit WT1 einzelne WT1⁺-Zellen im Gewebe identifiziert werden; dabei fanden sich jedoch nur wenige WT1⁺-Zellen. Die Abgrenzung von Myokard, welches cTnT-positive Kardiomyozyten enthält, mit dem außenliegenden Epikard zeigt die Lokalisation einzelner WT1⁺-Zellen innerhalb des Myokards. Die Quantifizierung der WT1⁺-Zellen der Kryoschnitte ergab 3500 positive Zellen pro cm² atriales Biopsiegewebe.

Zusammengefasst kann man festhalten, dass WT1⁺-Zellen, welche sowohl Stammzell- als auch kardiale Marker exprimieren, erfolgreich aus Epikard und Myokard von humanen Biopsien isoliert und kultiviert werden konnten.

4.1.3 Weitergehende Charakterisierung von hSC aus gesamtatrialem Gewebe mit optimiertem Protokoll

Die Ergebnisse der basalen Charakterisierung der kultivierten hSC aus Epikard und Myokard legen nahe, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um hEPDC handelt und dass diese Zellen nicht vorzugsweise im Epikard lokalisiert sind. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen kultivierten hSC aus Myokard und Epikard detektiert werden konnten, wurden für die folgende weitergehende Charakterisierung hSC aus der gesamten atrialen Biopsie isoliert.

Da die Ausbeute von hSC aus humanen atrialen Biopsien trotz der Verwendung der gesamten Biopsie gering war, wurde eine für die unterschiedlichen Charakterisierungsmethoden ausreichende Zellzahl erst nach mehreren Wochen in Kultur erreicht. Um eine spontane Differenzierung *in vitro* zu verhindern, wurden die Zellen in Anwesenheit von bFGF im Kulturmedium kultiviert. Da die hSC *in vitro* bei einer geringen Konfluenz nur eine geringe Proliferation zeigten, wurden die Zellen zunächst in 25 cm²-Flaschen bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Nach ein bis zwei Wochen konnten die angewachsenen Zellen in größere Zellkulturflaschen überführt und nach zusätzlichen ein bis zwei Wochen für Analysen verwendet werden.

Für die weitere Charakterisierung der nach dem verbesserten Protokoll isolierten hSC sollten Zellen in einem Kultivierungszeitraum von bis zu sieben Wochen bzw. Passagen 3-6 verwendet werden. Dafür musste der Nachweis erbracht werden, dass sich die hSC über diesen Zeitraum in ihren Stamm- bzw. Progenitorzeleigenschaften nicht signifikant verändern.

Zunächst wurde die Ausbeute von hSC aus der gesamten atrialen Biopsie ermittelt. Da die initiale Zellzahl gering war, wurde die Menge an kultivierten Zellen nach sechs Tagen erfasst und ihre initiale Anzahl mithilfe der Wachstumsgeschwindigkeit extrapoliert. Die Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde wie in Kapitel 3.3.1 dieser Arbeit beschrieben durchgeführt.

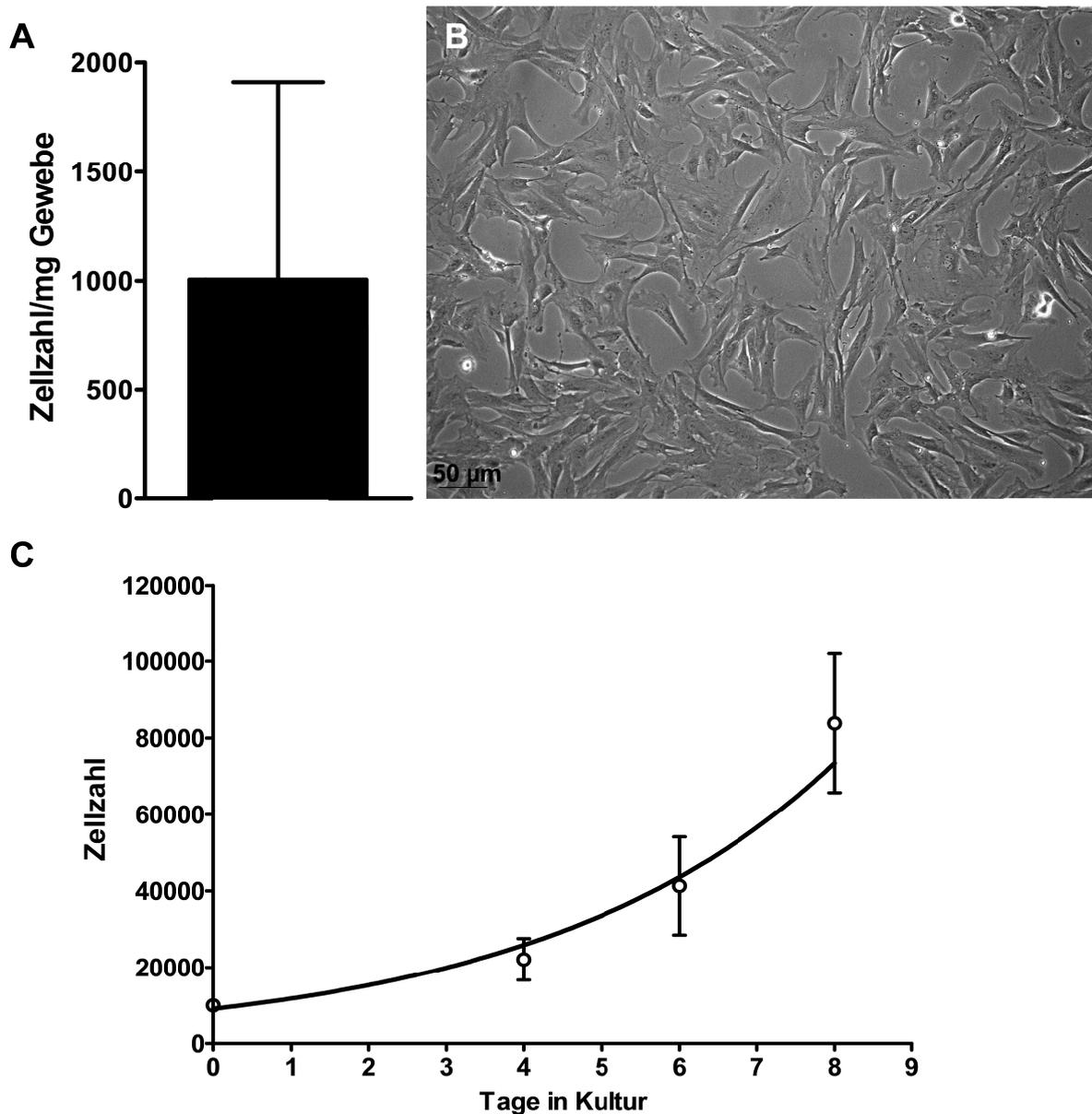


Abb. 4.7: Isolierung und Kultivierung von hSC aus gesamten atrialen Herzbiopsien

Dargestellt ist die Anzahl der aus den gesamten atrialen Herzbiopsien isolierten hSC pro mg Biopsiegewebe nach sechs Tagen in Kultur (A). Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD (n = 5). Die durchlichtmikroskopische Aufnahme der isolierten hSC aus den gesamten atrialen Biopsien zeigt den mesenchymalen Phänotyp der hSC (B). Im Diagramm (C) ist die Wachstumskinetik von hSC in Kultur abgebildet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD (n = 3).

Wie in Abbildung 4.7 A zu sehen ist, konnten aus 1 mg humanen Gewebes durch eine sechstägige Kultur der isolierten Zellen insgesamt 1006 ± 904 (n = 5) erhalten werden. Nach insgesamt zwei bis drei Wochen in Kultur besaßen sie eine Konfluenz von bis zu 90 % (s. Abb. 4.7 B) und konnten für Analysen verwendet werden.

Die Wachstumsanalyse von kultivierten hSC, welche zu Beginn dieses Versuchs bereits zwei Wochen in Kultur gewachsen waren, ergab eine Verdopplungszeit von $47,12\pm 6,04$ Stunden (n = 3).

Aus Verdopplungszeit und der Analyse der Ausbeute sechs Tage nach Kultivierung errechnete sich eine mittlere initiale Anzahl an hSC von 251 Zellen pro mg Biopsie. Die Verdopplungszeit der Zellen verringerte sich nach 10-12 Wochen in Kultur so stark, dass die Proliferation völlig zum Erliegen kam.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob hSC über einen Zeitraum von mehreren Wochen in Kultur ihre Stamm- bzw. Progenitorzeleigenschaften behalten. Dazu wurden in hSC aus verschiedenen Biopsien mittels Durchflusszytometrie und mRNA-Analyse die Expression von wichtigen Zellmarkern analysiert.

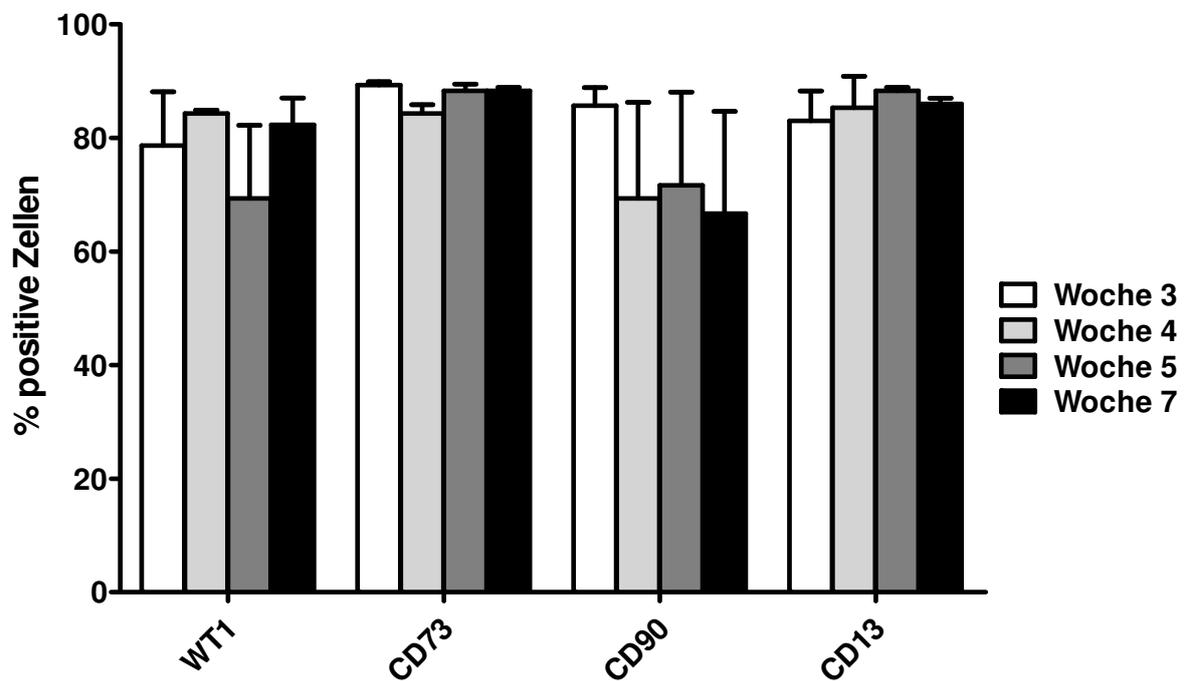


Abb. 4.8: Analyse von epikardialen und Stamm- bzw. Progenitorzellmarkern bei hSC in Zellkultur

Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Zellmarker in hSC nach drei Wochen (weiße Balken), vier Wochen (hellgraue Balken), fünf Wochen (dunkelgraue Balken) und sieben Wochen (schwarze Balken) in Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD, n = 3.

Für den Nachweis der Expression von Stamm- bzw. Progenitorzellmarkern wurden hSC drei, vier, fünf und sieben Wochen nach Beginn der Kultivierung mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Wie Abbildung 4.8 zeigt, ist der epikardiale Marker WT1 bei 70-80 % der Zellen zu allen untersuchten Zeitpunkten nachweisbar. Ebenso zeigt ein Großteil der hSC eine Expression von CD73 und CD13. Der Anteil an positiven Zellen bleibt über den untersuchten Zeitraum konstant, sowohl für CD73 als auch für CD13.

Die Expression von CD90 ist deutlich heterogener bei hSC und der Anteil an positiven Zellen nimmt tendenziell nach drei Wochen in Kultur leicht ab, bleibt danach jedoch konstant. Insgesamt unterscheiden sich die untersuchten Marker der hSC nach drei Wochen und sieben Wochen in Kultur nicht signifikant ($P > 0,05$) voneinander.

Zusätzlich zu der Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde die mRNA-Expression verschiedener Markergene über die Zeit untersucht. Dazu wurden Zellen nach drei, vier und sechs Wochen in Kultur gewonnen, die mRNA isoliert und mit qRT-PCR analysiert.

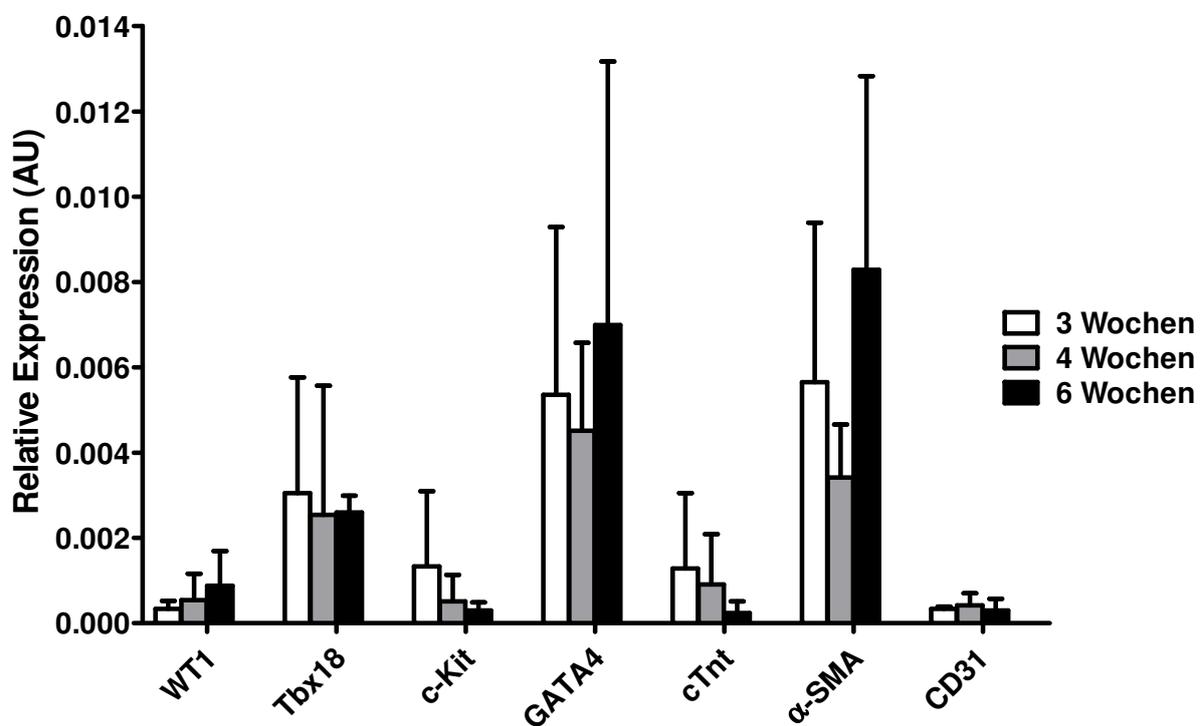


Abb. 4.9: Quantitative Analyse der mRNA-Expression verschiedener Zellmarkergene in hSC

Dargestellt ist die Expression verschiedener Markergene von hSC nach drei Wochen (weiße Balken), vier Wochen (graue Balken) und sechs Wochen (schwarze Balken) in Kultur. Es wurde die mRNA-Expression typischer epikardialer Marker (WT1, Tbx18), des Stammzellmarkers c-Kit, des frühen kardialen Markers GATA4, des späten kardialen Markers cTnt, des EMT-Markers α -SMA und des Epithelmarker CD31 per qRT-PCR analysiert. Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen beta-Actin normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, nimmt die mRNA-Expression des epikardialen Markers WT1 tendenziell zu, wohingegen die Expression des frühen kardialen Marker Tbx18 eher unverändert bleibt. Über den gesamten Untersuchungszeitraum nimmt die Expression von c-Kit und cTnt ab, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen ($P > 0,05$).

Nicht signifikant ändert sich ebenfalls der frühe kardiale Marker GATA4, der EMT-Marker α -SMA und der Endothelmarker CD31 ($P > 0,05$).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Bezeichnung der isolierten hSC aus humanen Biopsien als hEPDC war die Abgrenzung von anderen im Herz vorkommenden Zellarten wie z. B. Epithelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen. Ebenso wurden die isolierten Zellen mit den bereits charakterisierten EPDC aus infarzierten Rattenherzen (rEPDC) verglichen.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der hSC und rEPDC mit Markern für glatte Muskulatur (VE-Cadherin), Endothelzellen (CD31) und Fibroblasten (Vimentin) sind in Abb. 4.10 dargestellt.

Als Positivkontrollen wurden die Markerexpressionen bei glatten Muskelzellen aus der Rattenaorta (rSM) von VE-Cadherin, Endothelzellen aus der Rattenlunge (RLE) von CD31 und Zellen der Fibroblastenzelllinie RAT2 von Vimentin analysiert.

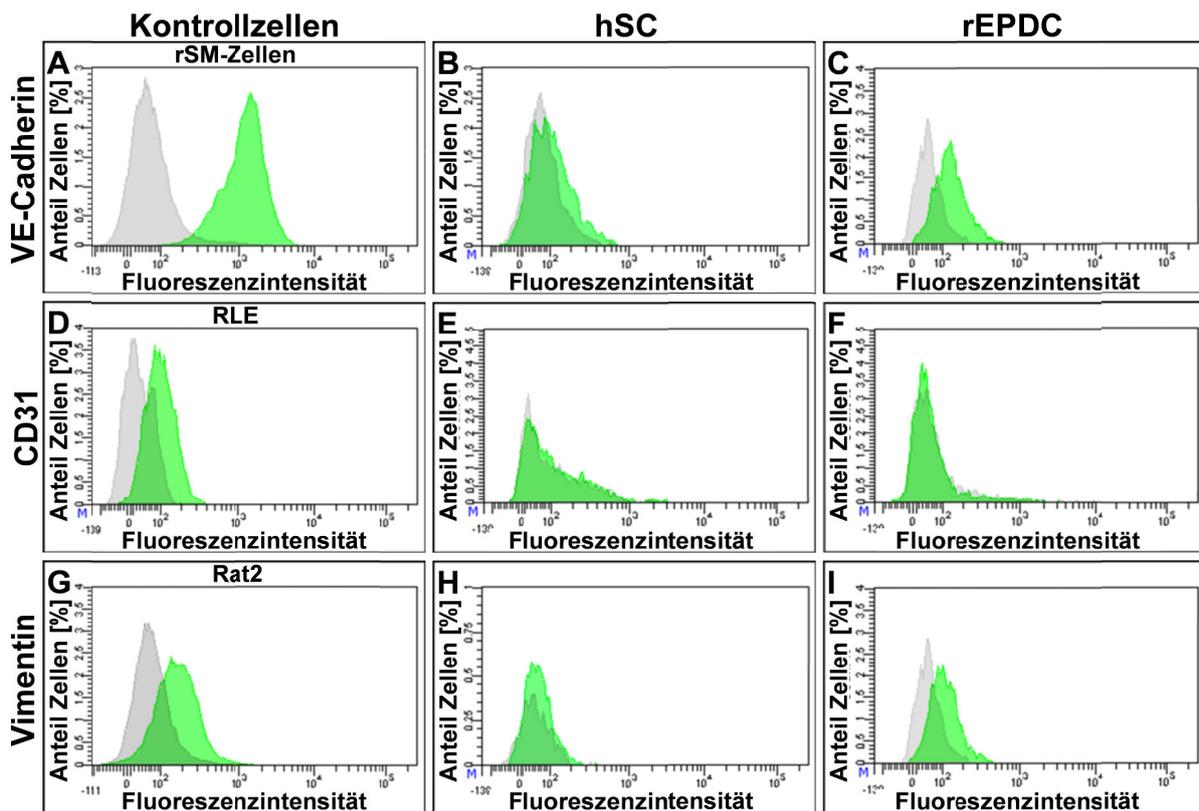


Abb. 4.10: Vergleich der Expression zelltypspezifischer Oberflächenmarkern auf hSC und Ratten-EPDC mittels Durchflusszytometrie

Dargestellt sind repräsentative Histogramme der Durchflusszytometrie-Analyse von hSC (B, E, H), rEPDC (C, F, I), Zellen der glatten Muskulatur aus einer Rattenaorta (rSM-Zellen) (A), Endothelzellen aus der Rattenlunge (RLE, D) und der Rattenfibroblasten-Zelllinie RAT2 (G). Verglichen wurde die Expression von VE-Cadherin (A, B, C), CD31 (D, E, F) und Vimentin (G, H, I). Graues Histogramm = Kontrolle ohne Primärantikörper, grünes Histogramm = Färbung mit Primärantikörper.

Aus der Darstellung der repräsentativen Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse ist die Expression von VE-Cadherin (**A-C**), CD31 (**D-F**) und Vimentin (**G-I**) bei hSC (**B, E, H**) und rEPDC (**C, F, I**) sowie der Positivkontrollen rSM (**A**), RLE (**D**) und Rat2 (**G**) zu ersehen.

Beim Vergleich der Expression von VE-Cadherin (**A-C**) zeigt sich, dass hSC kein VE-Cadherin ausbilden (**B**) und rEPDC nur wenig VE-Cadherin (**C**) besitzen, während im Vergleich die isolierten Zellen der glatten Muskulatur aus der Rattenaorta erwartungsgemäß positiv für VE-Cadherin sind (**A**). Der Endothelzellmarker CD31 wird von den Rattenendothelzellen exprimiert (**D**), wohingegen sich bei den hSC (**E**) und rEPDC (**F**) kein Unterschied zur Kontrolle ohne Primärantikörper zeigt. Bei der Analyse des Fibroblastenmarkers Vimentin weist die Fibroblastenzelllinie RAT2 eine deutliche Expression auf (**G**). Während bei den hSC keine Expression detektiert wird (**H**), ist diese bei rEPDC schwach ausgeprägt (**I**).

Die hSC exprimieren, wie in Abb. 4.8 und Abb. 4.9 gezeigt, für mehrere Wochen in Kultur Stamm- bzw. Progenitormarker. Um zu prüfen, ob sich die hSC kryokonservieren lassen, wurden diese bei -80 °C gemäß der beschriebenen Methode in Kapitel 3.3.3 kryokonserviert. Um zu kontrollieren, dass die hSC durch eine Kryokonservierung ihren Phänotyp nicht verändern, wurden hSC aufgetaut, wieder in Kultur genommen und mittels Durchflusszytometrie und qPCR auf die Expression wichtiger Zellmarker hin untersucht. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse wurden mit der Analyse von hSC vor der Kryokonservierung verglichen.

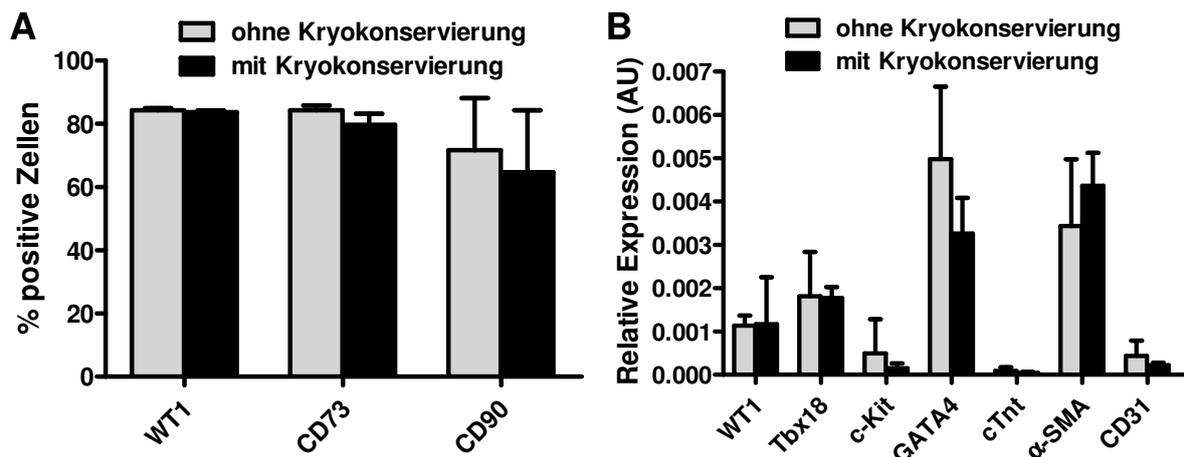


Abb. 4.11: Vergleich der Expression verschiedener Marker in kryokonservierten und nicht-kryokonservierten hSC mittels Durchflusszytometrie und RT-qPCR

Dargestellt ist die Expressionsanalyse verschiedener Zellmarker von kryokonservierten (schwarze Balken) und nicht-kryokonservierten (graue Balken) hSC. Links ist dabei die durchflusszytometrische Analyse von WT1, CD73 und CD90 bei nicht-kryokonservierten und kryokonservierten hSC zu sehen (A). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils $n = 3$. Auf der rechten Seite ist die Analyse der mRNA-Expression von nicht-kryokonservierten (graue Balken) und kryokonservierten (schwarze Balken) hSC mittels RT-qPCR zu sehen (B). Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen *beta-Actin* normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils $n = 3$.

Wie aus den Daten in Abbildung 4.11 A hervorgeht, besteht zwischen nicht-kryokonservierten und kryokonservierten hSC kein verändertes Expressionsverhalten ($P > 0,05$) bezüglich WT1, CD73 und CD90. Im Vergleich zeigt auch die mRNA-Expression (s. Abb. 4.11 B) keine Unterschiede in den Expressionen des epikardialen Markers WT1, des frühen kardialen Markers Tbx18 sowie des späten kardialen Markers cTnt. Insgesamt lassen sich keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Parameter feststellen.

Insgesamt konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die als humane stromale Zellen (hSC) bezeichneten isolierten WT1⁺-Zellen eine große Ähnlichkeit zu EPDC in Bezug auf die Expression von in der Literatur beschriebenen Zellmarkern aufweisen [144, 146, 147].

Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass sich die hSC ohne Änderung ihres Expressionsmusters über mehrere Wochen kultivieren und kryokonservieren lassen. Ferner wurde gezeigt, dass sich die hSC eindeutig von anderen kardialen Zelltypen über ihre Proteinmarkerexpression unterscheiden lassen.

4.1.4 Immortalisierung von hSC durch lentivirale Transfektion

Die begrenzte Proliferationsfähigkeit der hSC (s. Kapitel 4.1.3), die durch unterschiedliche Patienten verursachten Schwankungen in den Messungen und die begrenzte Verfügbarkeit von humanem Biopsiematerial veranlassten die Bestrebung, die hSC zu immortalisieren.

Hierfür wurde eine lentivirale Transduktion mit einem Vektor kodierend für humane Telomerase (hTERT, pBABE-Hygro-hTERT) bzw. einem Vektor kodierend für Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4, pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4) durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Plasmide in Bakterien transformiert und amplifiziert.

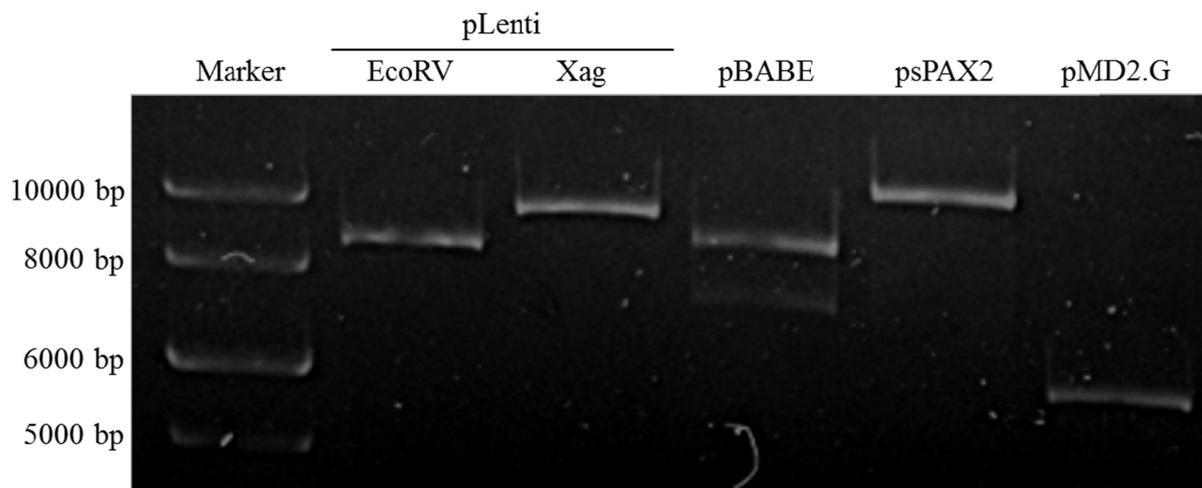


Abbildung 4.12: Kontrolle der restriktionsverdauten Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese

Dargestellt ist die Analyse der Agarose-Gelelektrophorese der für die Immortalisierung verwendeten Plasmide pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4 (pLenti, 10,1 kb) und pBABE-Hygro-hTERT (pBABE, 8,7 kb) sowie der Hilfsvektoren psPAX2 (10,7 kb) und pMD2.G (5,8 kb).

Abbildung 4.12 zeigt die Kontrolle der für die Immortalisierung der hSC verwendenden, linearisierten Plasmide in der Agarose-Gelelektrophorese. In der Analyse weisen die Plasmide die erwarteten Banden mit pBABE bei 8,7 kb, pLenti bei 10,1 kb, psPAX2 bei 10,7 kb und pMD2.G bei 5,8 kb auf. Für das Plasmid pLenti mit Linearisierung durch EcoNI zeigt sich neben der Bande bei 10,1 kb keine weiteren Fragmente, weshalb eine teilweise Eliminierung des Inserts ausgeschlossen werden kann.

Mit dem Restriktionsverdau des an zwei Stellen schneidenden Restriktionsenzym EcoRV ist die Extraktion des Inserts aus dem Plasmid durch eine verringerte Größe des Plasmids gezeigt. Bei dem Restriktionsverdau von pBABE zeigt sich eine schwache Bande bei ca. 7,5 kb. Dies kann eine partielle Eliminierung des Inserts aus dem Plasmid bedeuten.

Zur Virusherstellung wurden die aufgereinigten Plasmide für humane Telomerase (hTERT, pBABE-Hygro-hTERT) bzw. für Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK4, pLenti-GIII-CMV-GFP-2A-Puro-CDK4) einzeln oder beide in Kombination jeweils zusammen mit den Hilfsvektoren pMD2.G und psPAX2, kodierend für die viralen Gene *gag*, *pol* und *env* (Verpackungs- und Hüllproteine) in die Zelllinie HEK293FT transfiziert.

Mit dem lentiviralen Überstand wurden anschließend hSC infiziert. Durch die auf dem Plasmid befindlichen Resistenzgene für Hygromycin (pBABE) oder Puromycin (pLenti) wurden infizierte hSC selektioniert. Bei der Doppelimmortalisierung mit beiden Plasmiden wurde die Selektion abwechselnd mit jeweils entweder Hygromycin (17,5 µg/ml) oder Puromycin (0,8 µg/ml) durchgeführt; es konnten jedoch am Ende der Selektionierung keine hSC detektiert werden.

Überlebende hSC der Einzelimmortalisierung (hSC-hTERT⁺, n = 3 bzw. hSC-CDK4⁺, n=1) wurden in Zellkultur vermehrt und auf die mRNA-Expression von hTERT und CDK4 sowie auf die Expression von Stammzellmarkern hin untersucht. Dabei fand sich, dass die überlebenden hSC-CDK4⁺ nur ein geringes Wachstum aufwiesen und die Proliferation nach wenigen Wochen völlig zum Erliegen kam.

Im Gegensatz dazu war bei der mit *hTERT* immortalisierten Zellen trotz geringer Proliferation nach Antibiotikaselektion ein konstantes Wachstum über mehr als 30 Wochen in Kultur zu beobachten.

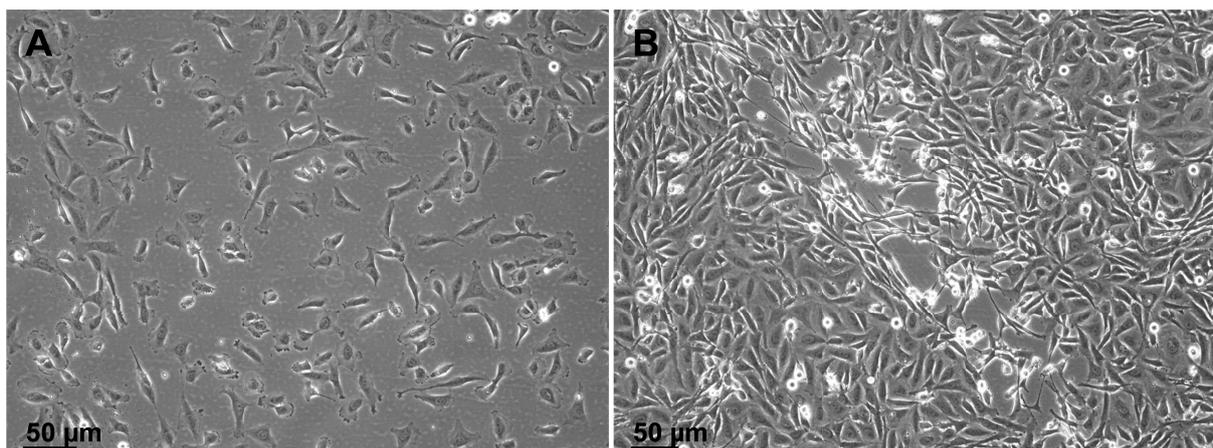


Abb. 4.13: Kultivierung von immortalisierten hSC-hTERT⁺

Gezeigt sind die durchlichtmikroskopischen Aufnahmen der mit *hTERT* immortalisierten hSC nach 32 (A) Wochen und 33 (B) Wochen in Kultur.

In Abbildung 4.13 sind die mit *hTERT* immortalisierten hSC in Zellkultur dargestellt. Im Gegensatz zu nativen hSC zeigten die immortalisierten Zellen auch nach 33 Wochen weiterhin eine Proliferation in Zellkultur. Dabei blieb der spindelförmige Phänotyp der Zellen unverändert erhalten.

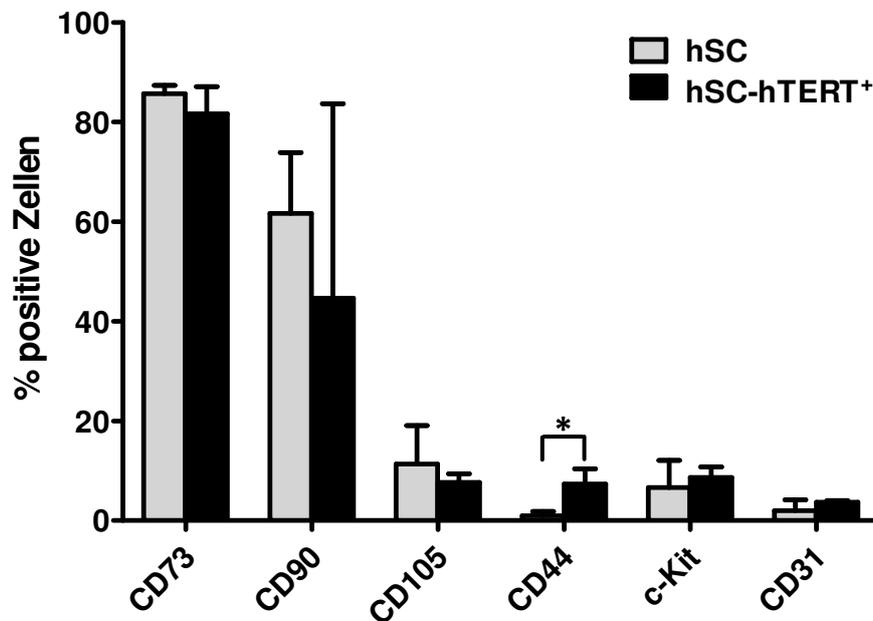


Abb. 4.14: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Zellmarker in immortalisierten hSC

Gezeigt ist die statistische Analyse der Oberflächenmarker von hSC (graue Balken) und hSC-hTERT⁺ (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte±SD, n = 3.

Abbildung 4.14 weist vergleichend die durchflusszytometrische Analyse von hSC (graue Balken) und mit pBABE-Hygro-hTERT immortalisierten hSC (hSC-hTERT⁺, schwarze Balken) aus. Analysiert wurden die bereits für hSC etablierten mesenchymalen Marker CD73 und CD90, die Stamm- bzw. Progenitormarker CD105, CD44 und c-Kit sowie der Epithelmarker CD31.

Insgesamt findet sich für die untersuchten Marker ein gleiches Expressionsmuster zwischen immortalisierten und nicht immortalisierten Zellen. Lediglich bei CD44 ist ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zu verzeichnen.

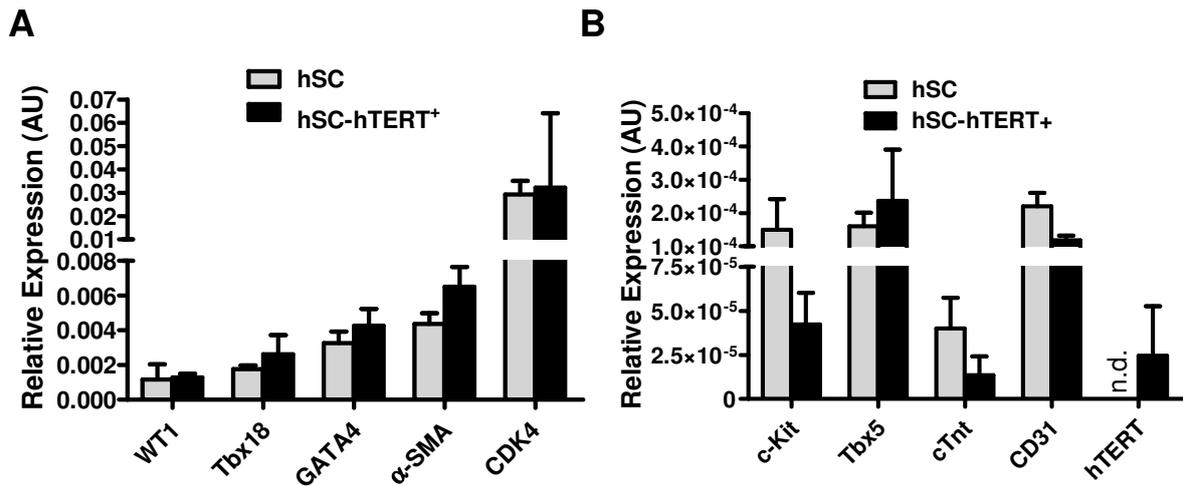


Abb. 4.15: Quantitative Analyse der mRNA-Expression verschiedener Zellmarkergene in immortalisierten hSC

Dargestellt ist die statistische Analyse der Expression verschiedener Markergene von hSC nach Immortalisierung mit *hTERT* (schwarze Balken) mittels lentiviraler Transfektion. hSC wurden mit lentiviralem Überstand von mit pBABE-Hygro-hTERT (pBABE) transfizierten HEK293FT-Zellen infiziert, mittels Antibiotikum selektioniert und in Zellkultur vermehrt. Als Kontrolle sind mRNA-Analysen der entsprechenden Biopsien ohne Immortalisierung dargestellt (graue Balken). Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen beta-Actin normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3. n. d.: nicht detektierbar.

In Abbildung 4.15 (A + B) ist die quantitative Analyse der mRNA-Expression von mit pBABE-Hygro-hTERT (hSC-hTERT⁺, schwarze Balken) immortalisierten hSC dargestellt. *hTERT* kommt in hSC nicht auf natürliche Weise vor und kann bei den Kontrollzellen nicht gefunden werden. Im Gegensatz dazu wird eine schwache Expression bei allen drei hSC-hTERT⁺-Fraktionen detektiert. *CDK4* hingegen erscheint als wichtiger Parameter der Zellzykluskontrolle auch ohne Immortalisierung in hSC.

In Bezug auf die bereits in 4.1.3 untersuchten Markergene zeigt sich, dass sich die immortalisierten Zellen weder in den epikardialen Markern *WT1* und *Tbx18*, den frühen kardialen Markern *GATA4* und *Tbx5* noch dem Endothelmarker *CD31* und dem EMT-Marker α -SMA unterscheiden. Für den späten kardialen Marker *cTnt* sowie den Stammzellmarker *c-Kit* zeigt sich eine nicht signifikant ($P > 0,05$) geringere Expression bei mit pBABE-Hygro-hTERT immortalisierten Zellen.

Insgesamt heben diese Versuche hervor, dass hSC erfolgreich mit pBABE-Hygro-hTERT immortalisiert werden konnten. Die so erhaltenen Zellen zeigten für weitere drei Monate *in vitro* Proliferation und unterschieden sich nicht signifikant von den ursprünglichen Zellen.

4.1.5 Basale Charakterisierung von mit hTERT immortalisierten hSC der Biopsie 35

Zwei der drei hSC-hTERT⁺-Kulturen zeigten drei Monate nach ihrer Immortalisierung ein deutlich verringertes Wachstum. Wenige Wochen danach konnte keine weitere Proliferation mehr detektiert werden. Insgesamt ließen sich diese Zellen für mehr als sechs Monate in Kultur vermehren. In der dritten Kultur (hB35) wurde eine schnell proliferierende Kolonie identifiziert. Mit diesen Zellen wurde die Untersuchung der Wachstumsgeschwindigkeit mit drei technischen Replikaten, wie in Kapitel 3.3.1 dieser Arbeit angegeben, durchgeführt.

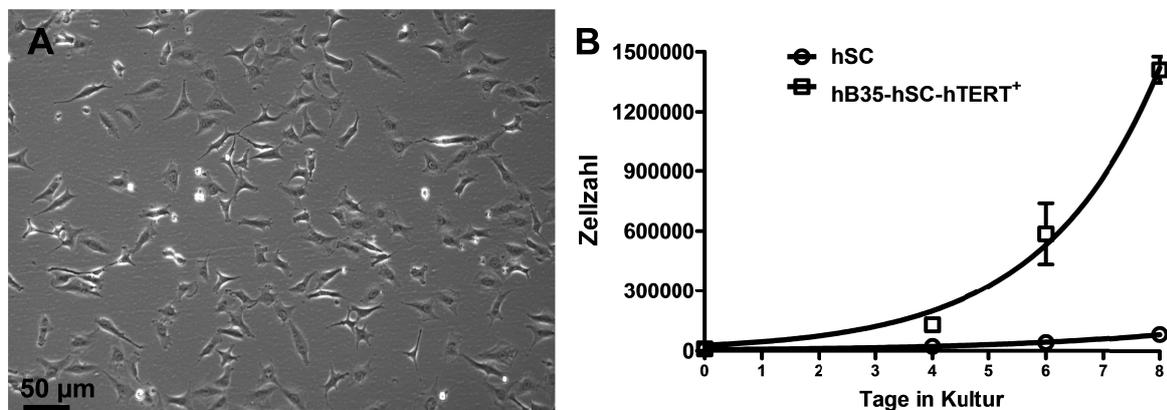


Abb. 4.16: Kultivierung und Wachstumsanalyse von hB35-hSC-hTERT⁺

Gezeigt ist eine durchlichtmikroskopische Aufnahme der hB35-hSC-hTERT⁺ (A). In (B) ist die Wachstumskinetik von hB35-hSC-hTERT⁺ fünf Monate nach ihrer Immortalisierung abgebildet. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD (n = 3, technische Replikate).

Wie in Abb. 4.16 zu erkennen ist, zeigen die hB35-hSC-hTERT⁺ im Vergleich zu den normalen hSC eine deutlich höhere Proliferation. Während für normale hSC eine Verdopplungszeit von $47,1\pm 6,0$ Stunden berechnet wurde (s. Abb. 4.7 C), zeigen die hB35-hSC-hTERT⁺ eine Verdopplungszeit von $25,8\pm 0,3$ Stunden.

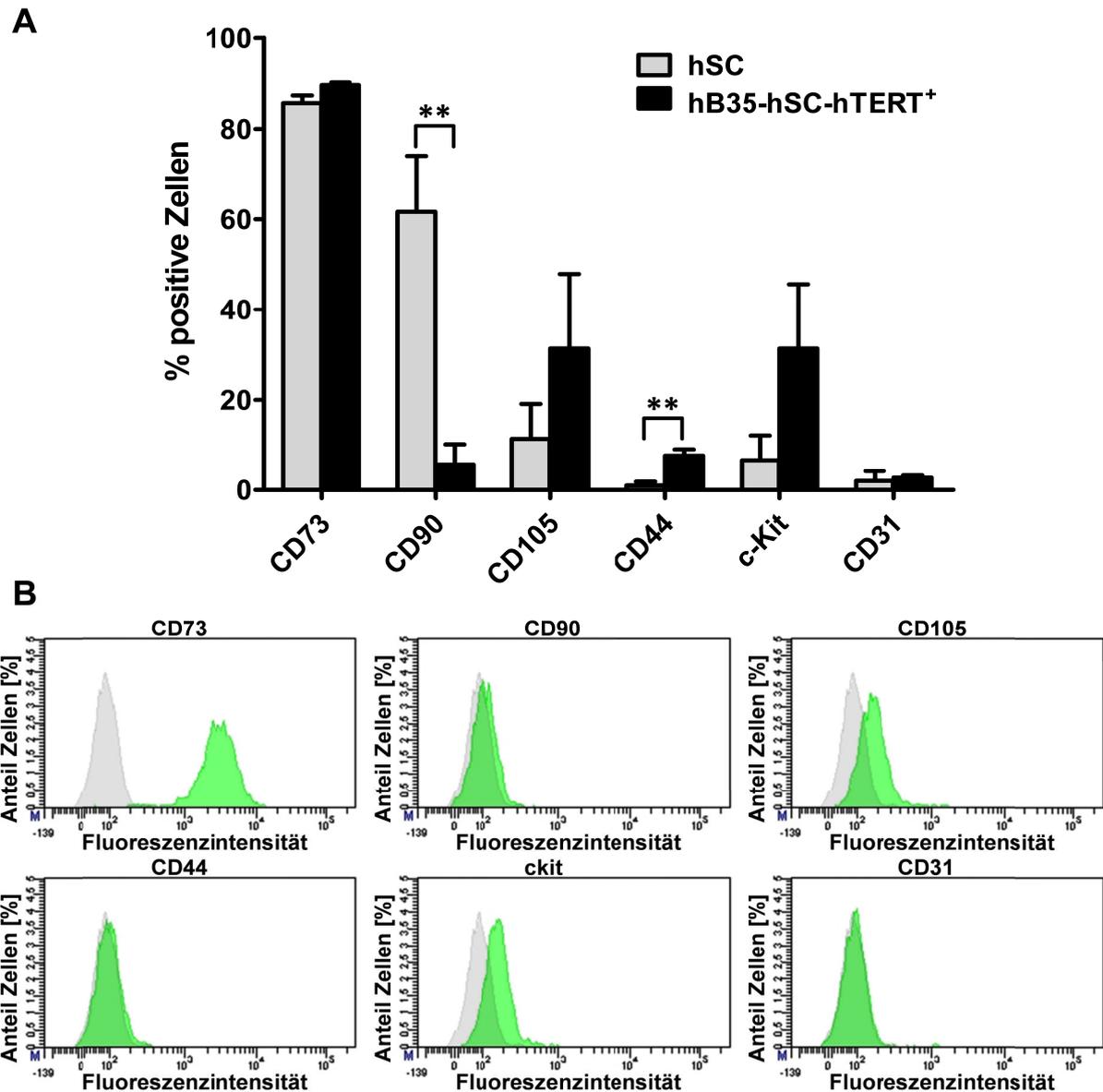


Abb. 4.17: Durchflusszytometrische Analyse der Expression verschiedener Zellmarker in immortalisierten hSC der Biopsie 35

In (A) wird der Vergleich der statistischen Analyse der Oberflächenmarker von hSC (graue Balken) und hB35-hSC-hTERT⁺ (schwarze Balken) gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 3 (hSC) bzw. drei technische Replikate (hB35-hSC-hTERT⁺). In (B) sind repräsentative Histogramme von hB35-hSC-hTERT⁺ abgebildet. Graues Histogramm = Kontrolle ohne primären Antikörper, grünes Histogramm = Markerexpression.

Wie in Abbildung 4.17 zu sehen ist, zeigen die meisten hB35-hSC-hTERT⁺ ebenso wie nicht immortalisierte hSC CD73 auf ihrer Oberfläche. Des Weiteren besitzen nur wenige Zellen eine Expression von CD31. Jedoch zeigen signifikant mehr Zellen der hB35-hSC-hTERT⁺ eine Expression des Stamm- bzw. Progenitorzellmarkers CD44 ($P < 0,01$). Weiterhin exprimieren mehr Zellen der hB35-hSC-hTERT⁺ die Stamm- bzw. Progenitorzellmarker CD105 und c-Kit, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen ($P > 0,05$). Im Gegensatz dazu fand sich eine signifikant geringere Expression von CD90 ($P < 0,01$).

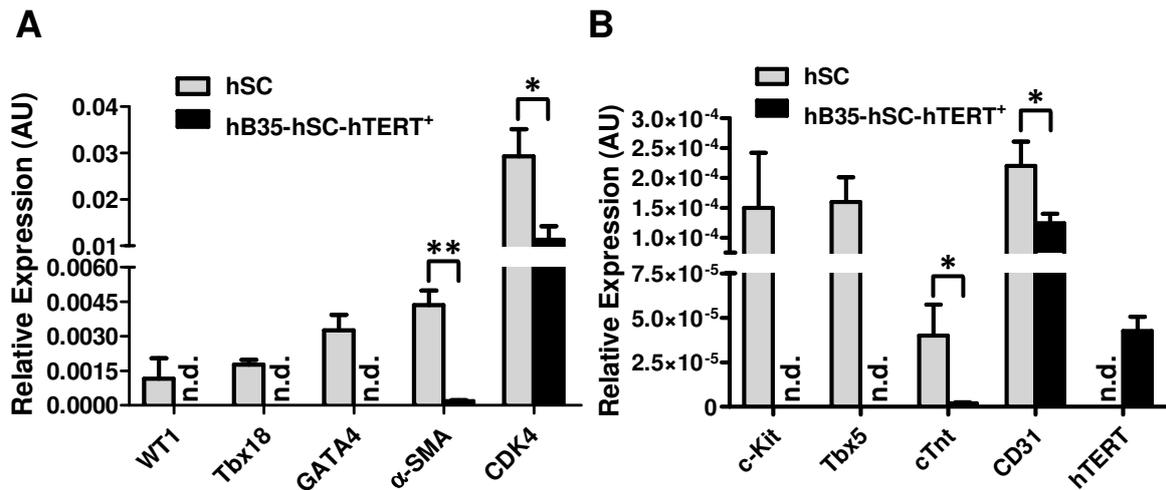


Abb. 4.18: Vergleich der quantitativen Analyse der mRNA-Expression verschiedener Zellmarkergene von hSC und hB35-hSC-hTERT⁺

Abgebildet ist die statistische Analyse der Expression verschiedener Markergene von hSC (graue Balken) und hB35-hSC-hTERT⁺ (schwarzer Balken). Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen *beta-Actin* normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, n = 3 (hSC) bzw. drei technische Replikate (hB35-hSC-hTERT⁺). n. d.: nicht detektierbar.

In Abbildung 4.18 ist die quantitative Analyse der mRNA-Expression von Zellen dargestellt, welche aus der mit pBABE-Hygro-hTERT immortalisierten hSC-Probe 35 entstanden sind (schwarze Balken). Als Kontrolle sind die Ergebnisse aus nicht immortalisierten hSC (graue Balken) abgebildet (s. Abb. 4.22). Es findet sich eine deutliche Expression von hTERT in hB35-hSC-hTERT⁺, nicht jedoch in hSC. In beiden Zellarten ist CDK4 detektierbar, wobei die immortalisierten Zellen weniger CDK4 exprimieren ($P < 0,05$). Weiterhin zeigt sich eine geringere Expression von CD31 ($P < 0,05$).

Unterschiede werden vor allem bei den Stamm- bzw. Progenitorzellmarkern sowie kardialen Markern ersichtlich. Bei den hB35-hSC-hTERT⁺-Zellen kann keine Expression für die Marker WT1, Tbx18, GATA4, c-Kit oder Tbx5 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigt sich eine signifikant geringere Expression der Marker α -SMA ($P < 0,01$) und cTnt ($P < 0,05$).

Letztlich lässt sich festhalten, dass die aus den mit pBABE-Hygro-hTERT immortalisierten hB35-hSC gewachsenen hB35-hSC-hTERT⁺ zwar eine starke andauernde Proliferation zeigten, sich jedoch erheblich in der Expression verschiedener Marker vom Expressionsprofil der heterogenen Population von hSC unterschieden.

4.2 Analyse des kardioregenerativen Potentials von hSC

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sich hSC aus atrialen Biopsien erfolgreich kultivieren und kryokonservieren lassen, sollten mögliche Einflüsse der hSC auf die Regeneration nach einem Herzinfarkt untersucht werden. Hierfür wurden das Endozytosepotential und das Sekretom der hSC untersucht sowie eine Oberflächenproteomanalyse durchgeführt.

4.2.1 Endozytosepotential von hSC

Bei einer langanhaltenden Ischämie des Herzens sterben die Zellen des dem verschlossenen Gefäß nachgeschalteten Gewebes ab. Für die Regeneration des Gewebes müssen zunächst die Reste apoptotischer und nekrotischer Zellen entfernt werden, wofür vor allem nach dem Infarkt eingewanderte Immunzellen wie Monozyten verantwortlich sind.

Für ventrikuläre EPDC, die aus infarzierten Rattenherzen gewonnen wurden, konnte nachgewiesen werden, dass sie endozytotisch aktiv sind und Nanopartikel aufnehmen können [146]. Dies könnte in Kombination mit einer daraus resultierenden Aktivierung und Sekretion von Signalmolekülen einen wichtigen Faktor der Modulation der Inflammation darstellen. Entsprechend wurde untersucht, ob sich hSC und rEPDC in diesem Aspekt gleichen. Zusätzlich wurden das Endozytosepotential von hSC mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) verglichen, da bei diesen eine Phagozytose von apoptotischen Zellen gezeigt werden konnte [318].

Zu diesem Zweck wurden hSC und hMSC sowie CHO-Zellen als Negativkontrolle *in vitro* mit Carboxyfluorescein-gekoppelten Nanopartikeln (PFCE, Ø 100 nm) inkubiert und die Endozytose mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

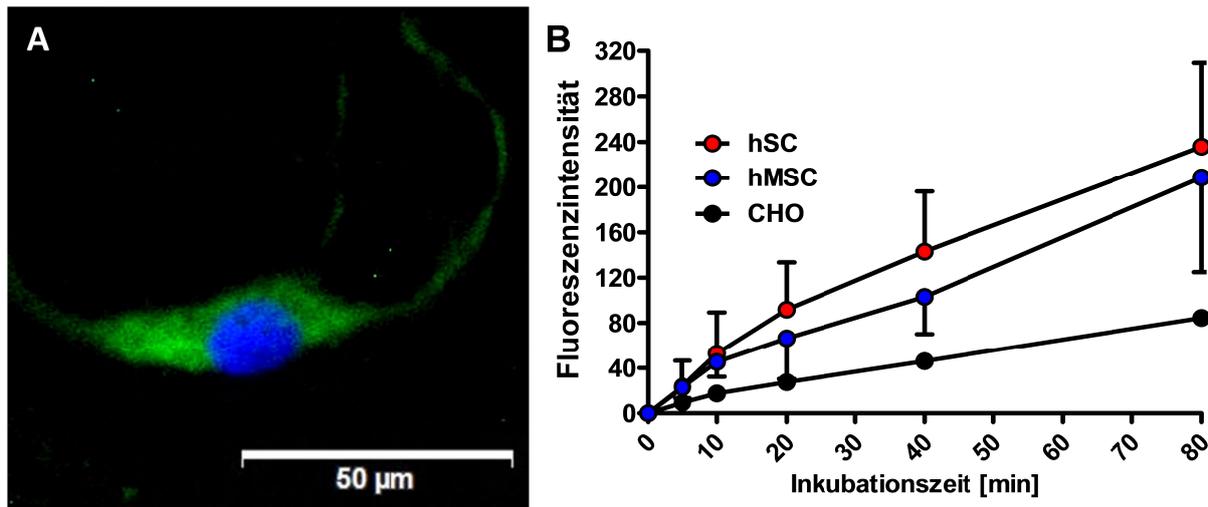


Abb. 4.19: Endozytose von FITC-gekoppelten Nanopartikeln durch hSC und hMSC

Die linke Seite zeigt eine repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer hSC nach Inkubation mit FITC-gekoppelten Nanopartikeln (\varnothing 100 nm) für 60 Minuten (A). Auf der rechten Seite ist die durchflusszytometrisch bestimmte mittlere Fluoreszenzintensität von hSC (rot), hMSC (blau) und CHO-Zellen (schwarz) dargestellt, welche mit FITC-gekoppelten Nanopartikeln (\varnothing 100 nm) für jeweils 5, 10, 20, 40 oder 80 Minuten inkubiert wurden (B). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (hSC und hMSC n = 3, CHO n=1 mit zwei technische Replikaten).

Wie in Abbildung 4.19 A zu erkennen ist, wurden mit Carboxyfluorescein gekoppelte Nanopartikel von hSC endozytiert. Dieser Prozess begann bereits nach wenigen Minuten und setzte sich über einen beobachteten Zeitraum von 80 Minuten linear fort (s. Abb. 4.12 B). Weiterhin erkennt man, dass Nanopartikel von hMSC zu einem vergleichbaren Maße wie durch hSC aufgenommen wurden. Im Gegensatz dazu zeigten CHO-Zellen nur eine geringe Aufnahme der Nanopartikel.

Zusätzlich zu der Analyse der Endozytose mittels Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob auch Nanopartikel aus ^{19}F -Perfluorkarbonen (PFC) von diesen Zellen aufgenommen werden. Bei diesen Partikeln handelt es sich um Nanopartikel, welche mittels ^{19}F -NMR detektiert werden können.

Dies kann nichtinvasiv *in vivo* durchgeführt werden und stellt daher eine interessante Möglichkeit der Überwachung und Verfolgung einerseits von endozytotisch aktiven Zellen wie Monozyten und Makrophagen bei Inflammation, andererseits auch für EPDC nach Infarkt dar [319].

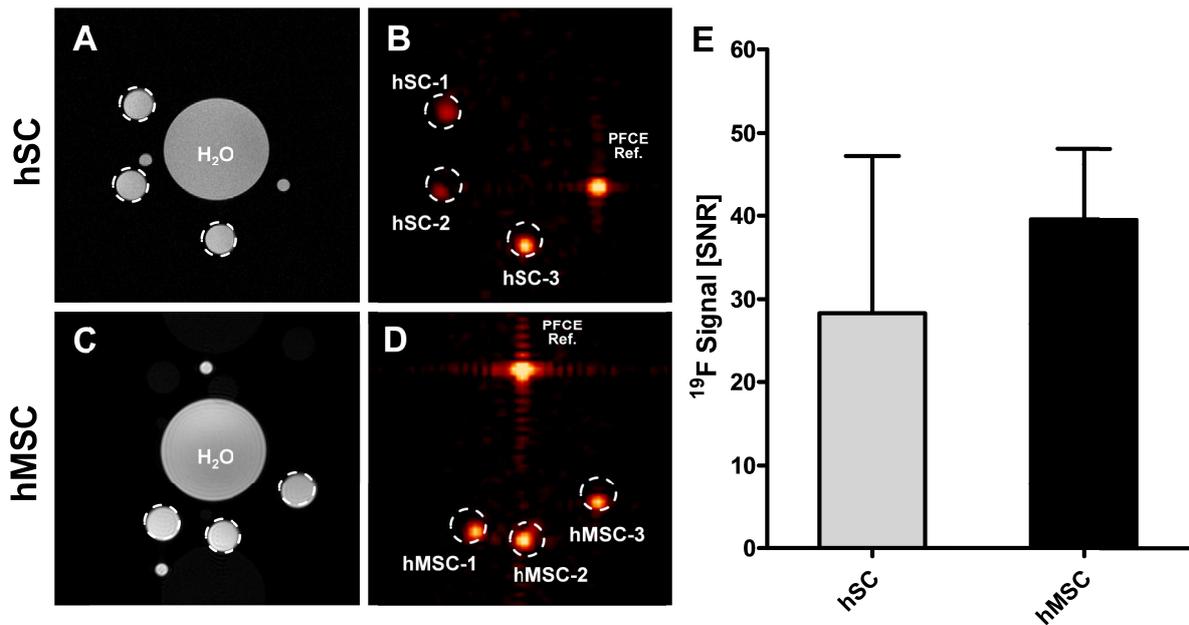


Abb. 4.20: Endozytose von Nanopartikel aus ^{19}F -Perfluorkarbonen durch hSC und hMSC

Die vier Abbildungen auf der linken Seite zeigen die Messungen von hSC (A, B) und hMSC (C, D) mittels NMR. Dabei wurden sowohl ^1H -Signale (A, C) zur Kontrolle und zur Bestimmung der zu untersuchenden Region als auch ^{19}F -Signale (C, D) vermessen. Aus dieser Messung konnte das Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) ermittelt werden, welches auf der rechten Seite als Säulendiagramm gezeigt ist (E). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (n = 3).

In Abbildung 4.20 sind die Ergebnisse der Endozytose von Nanopartikeln aus ^{19}F -Perfluorkarbonen durch hSC und hMSC zusammengefasst. Die Position der Zellen wurde mit den ^1H -Signalen der hSC (A) und der hMSC (C) bestimmt. Die Detektion des ^{19}F -Signals bei hSC (B) und hMSC (D) zeigt deutliche Signale in allen eingesetzten Zellproben.

Zur Kontrolle ist jeweils eine Referenzprobe aus PFCE-Lösung mitgeführt. Die Intensitäten der ^{19}F -Signale der vermessenen hSC und hMSC sind statistisch als Signal-Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*, SNR) erfasst und ausgewertet (E).

Hierbei zeigt sich, dass hMSC ($39,56\pm 4,94$; n = 3) die PFCE-Nanopartikel tendenziell stärker aufnahmen als hSC ($28,32\pm 10,93$; n = 3), allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant ($P > 0,05$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass hSC - ebenso wie für rEPDC beschrieben - endozytotisch aktiv sind.

4.2.2 Vergleich von Markergenen und -proteinen bei hSC und hMSC

Ebenso wie hSC wurden auch hMSC für die Regeneration des Herzens nach Infarkt untersucht [320]. In dieser Arbeit wird daher die Expression verschiedener Marker auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie sowie auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR vergleichend untersucht.

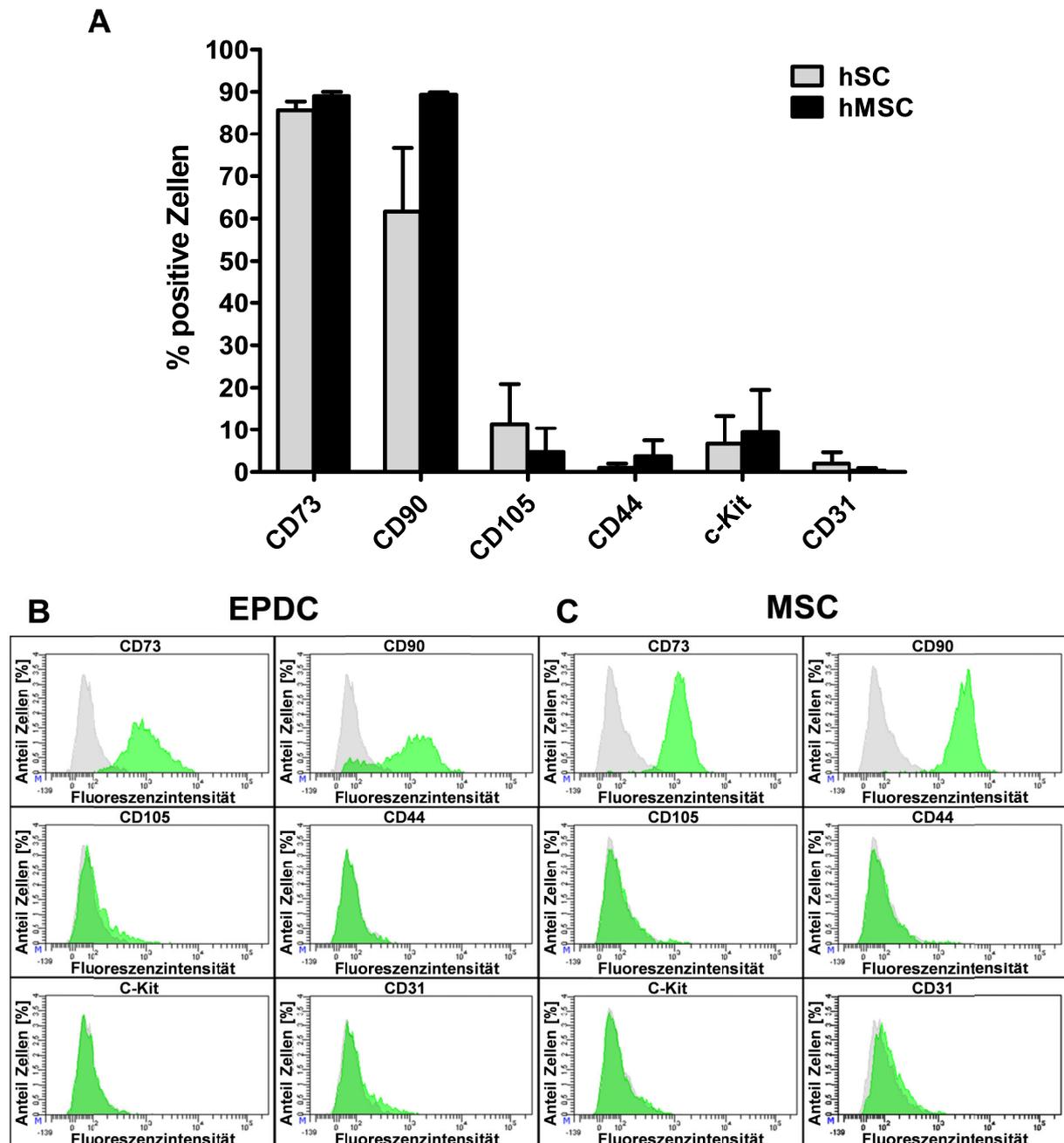


Abb. 4.21: Vergleich der Oberflächenmarker von hSC und hMSC mittels Durchflusszytometrie
A: Statistische Analyse der Oberflächenmarker von hSC (graue Balken) und hMSC (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils $n = 3$. Darunter sind repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analysen von hSC (B) und hMSC (C) abgebildet. Graues Histogramm = Kontrolle ohne primären Antikörper, grünes Histogramm = Marker-Expression.

Die Analyse der Oberflächenmarkerexpression (s. Abb. 4.21 A) von hSC und hMSC zeigt, dass beide Zellpopulationen einen hohen Anteil an CD73⁺-Zellen besitzen. Bei hSC sind ~ 60 % der Zellen positiv für CD90, was jedoch in einer vergleichsweise heterogenen Fluoreszenzintensität der Zellen begründet liegt.

Im Vergleich dazu ist die Expression bei hMSC deutlich homogener, ein Großteil der Zellen exprimiert CD90. Während die Stamm- bzw. Progenitorzellmarker CD105 und c-Kit in beiden Zelltypen lediglich in geringen Maß exprimiert werden, ist der Stamm- bzw. Progenitorzellmarker CD44 nur bei wenigen hMSC nachweisbar. Der Endothelmarker CD31 wird weder von hSC noch von hMSC exprimiert. Somit zeigen hSC (B) und hMSC (C) ein ähnliches Muster von Oberflächenmarkern.

Um diese Ähnlichkeit auf Transkriptionsebene zu bestätigen, wurde eine qRT-PCR-Analyse durchgeführt.

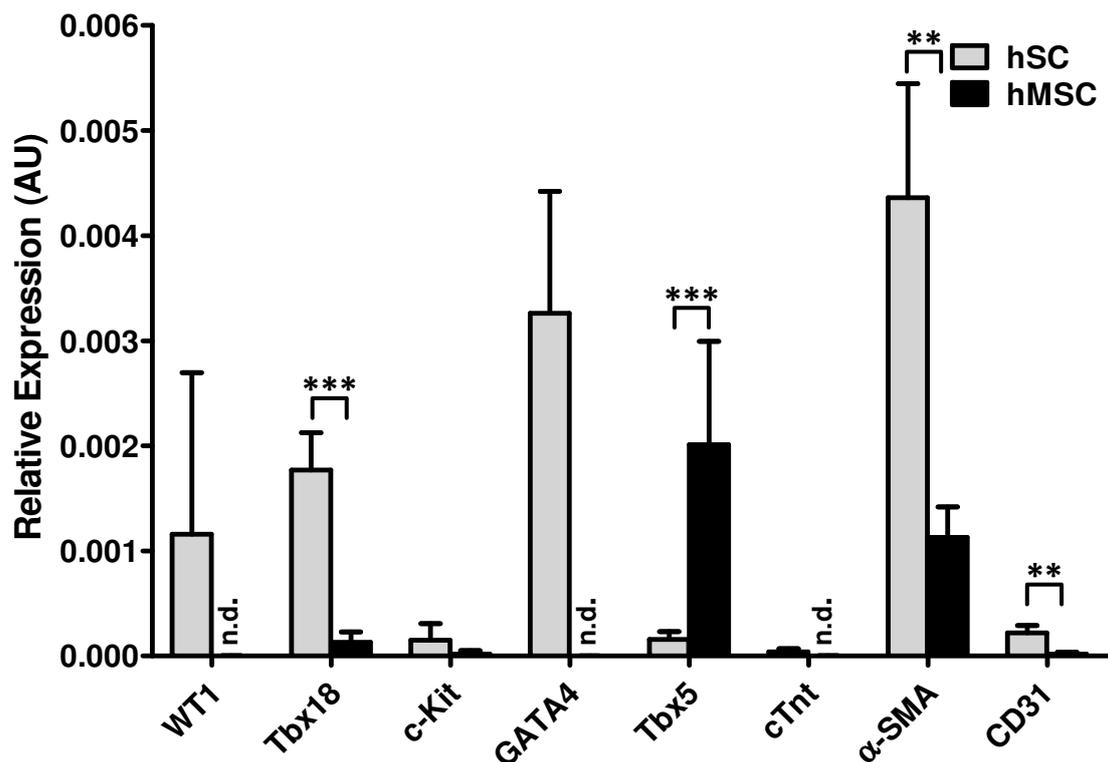


Abb. 4.22: Vergleichende quantitative Analyse der mRNA-Expression verschiedener Zellmarkergene in hSC und hMSC

Abgebildet ist die statistische Analyse der Expression verschiedener Markergene in hSC (graue Balken) und hMSC (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte±SD, jeweils n = 3. n. d.: nicht detektierbar.

Wie aus Abb. 4.22 ersichtlich, ergaben sich auf mRNA-Ebene deutliche Unterschiede zwischen hSC und hMSC.

Während hSC den epikardialen Marker WT1 exprimieren, ist dieser Transkriptionsfaktor bei hMSC nicht zu detektieren. Der epikardiale Marker Tbx18 wird zwar bei den hMSC gefunden, jedoch signifikant weniger als bei hSC ($P < 0,001$). Der bereits bei der Durchflusszytometrie untersuchte Marker c-Kit wird bei beiden Zellpopulationen nur geringfügig detektiert. Während der frühe kardiale Marker GATA4 von hSC stark exprimiert wird, ist dieser jedoch bei hMSC nicht zu detektieren. Auch der späte kardiale Marker cTnt findet sich nur bei hSC.

Im Gegensatz dazu exprimieren hMSC eine große Menge des Stamm-/Progenitorzellmarkers Tbx5, wohingegen bei hSC signifikant weniger Tbx5 detektiert wird ($P < 0,001$). Weiterhin wird der EMT-Marker α -SMA in großen Mengen von hSC exprimiert, von hMSC jedoch signifikant weniger ($P < 0,01$). Außerdem wird der schon bei der durchflusszytometrischen Analyse untersuchte Endothelmarker CD31 in geringen Mengen exprimiert, wobei die mRNA-Expression bei hMSC signifikant geringer ist ($P < 0,01$).

Neben dem Unterschied der Expression von WT1 bei hSC und hMSC tritt der Unterschied vor allem bei der höheren Expression in hSC von kardialen Markern, jedoch auch bei α -SMA und CD31 zu Tage. Hingegen exprimieren hMSC erheblich höhere Mengen an Tbx5.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass hSC und hMSC ein ähnliches Muster an Stamm- bzw. Progenitorzellmarkern auf ihrer Oberfläche besitzen. Auf mRNA-Ebene zeigten nur hSC, jedoch nicht hMSC, die Expression von epikardialen und kardialen Markern.

4.2.3 Zytokinsekretion von hSC

Die Sekretion von bioaktiven Signalmolekülen wie den Zytokinen spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von inflammatorischen Prozessen und der Zelldifferenzierung. Da vermutet wird, dass hSC durch Sekretion von Zytokinen einen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung haben können [133], wurde die Sekretion von hSC *in vitro* bestimmt werden.

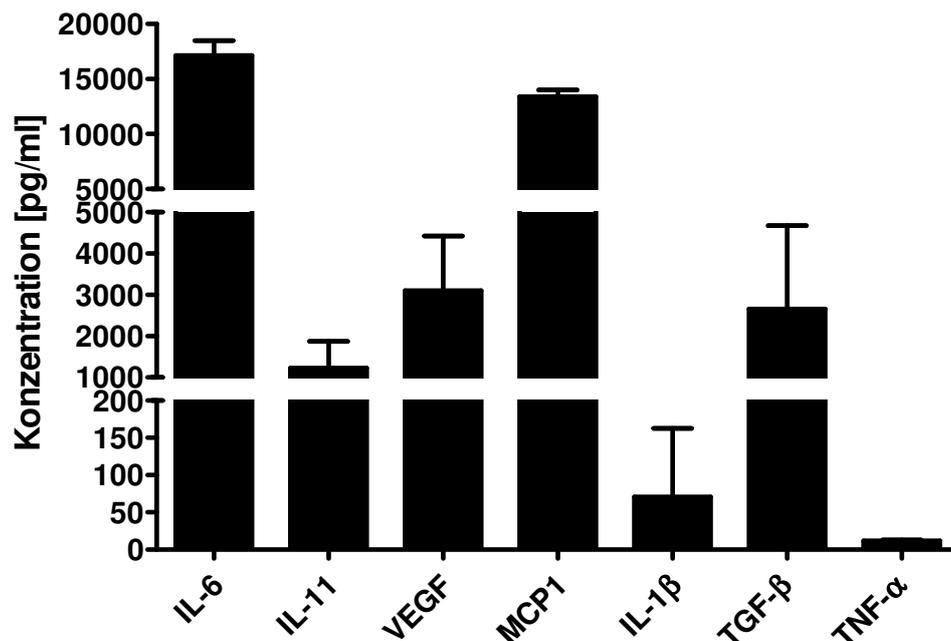


Abb. 4.23: Analyse der Zytokinsekretion von hSC mittels BioPlex®

Dargestellt ist die statistische Analyse verschiedener Zytokine im Überstand von hSC, die mittels Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assay detektiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, jeweils n = 3.

Die Analyse der Zellkulturüberstände (s. Abb. 4.23) zeigt eine starke Sekretion von Interleukin 6 (IL-6, 17108 ± 784 pg/ml) durch hSC. Das mit IL-6 verwandte Molekül IL-11 wird ebenfalls sezerniert, jedoch in deutlich geringeren Mengen (1227 ± 374 pg/ml). Ebenfalls sekretiert wird VEGF (3100 ± 764 pg/ml).

Der für die Differenzierung von Gewebe wichtige TGF-β wird ebenfalls in hoher Konzentration freigesetzt (2661 ± 1163 pg/ml). Weiterhin sekretiert werden die proinflammatorischen Faktoren *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP1/CCL2; 13395 ± 350 pg/ml) und in geringen Konzentrationen IL-1β (71 ± 53 pg/ml) und der Tumornekrosefaktor α (TNF-α, 12 ± 1 pg/ml).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass hSC eine Vielzahl an Zytokinen, welche bei Inflammation oder beim Remodeling involviert sind, freisetzen.

Die hohe Freisetzungsrates von IL-6 stellte uns vor die Frage, ob IL-6 ausschließlich als parakriner Faktor oder außerdem als autokriner Faktor fungiert. Dazu wurde die Expression des Rezeptors für IL-6 mittels qRT-PCR untersucht. Zusätzlich wurde die Expression des Rezeptors von IL-11 sowie weiterer mit IL-6 assoziierter Zytokine analysiert.

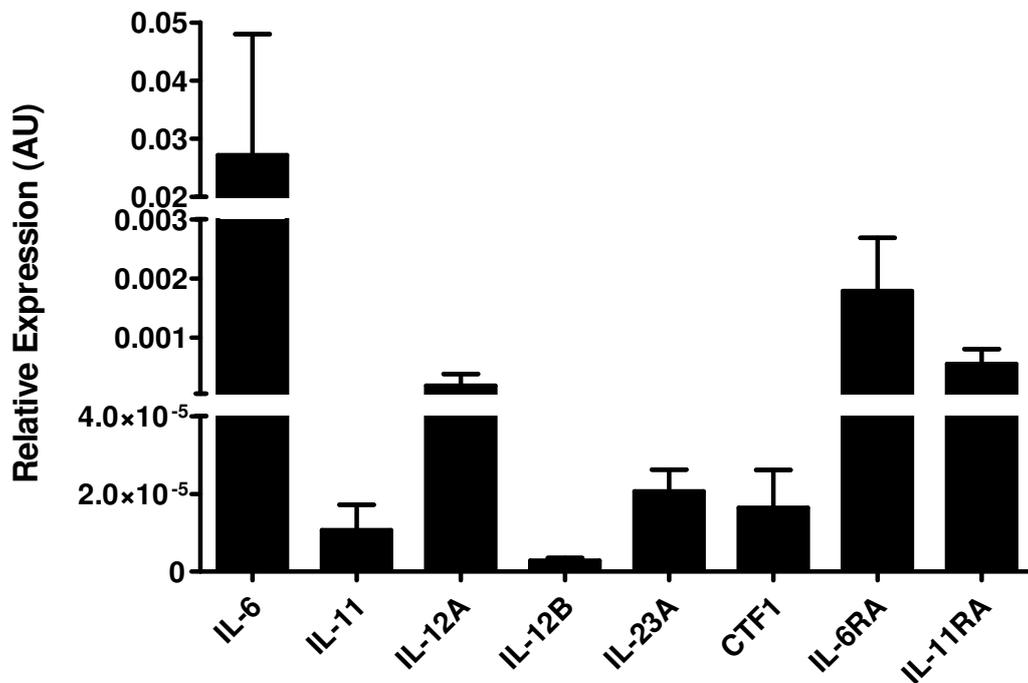


Abb. 4.24: Quantitative mRNA-Analyse der Expression von IL-6 und IL-11 sowie deren Rezeptoren und weiterer assoziierter Signalmoleküle

Im Diagramm ist die statistische Analyse der Expression von IL-6 und IL-11 und ihrer Rezeptoren sowie mit IL-6 assoziierter Zytokine dargestellt. Inkludiert ist das zur IL-6-Familie gehörende Cardiotrophin1 (CTF1) und auch die inflammatorisch aktiven Zytokine IL-12A, IL-23A sowie die zu IL-12 und IL-23 gehörende Untereinheit IL-12B. Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen *beta-Actin* normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3.

In Abbildung 4.24 ist die quantitative mRNA-Analyse der bei der Zellüberstandsanalyse (s. Abb. 4.23) detektierten Zytokine IL-6 und IL-11, ihrer Rezeptoren IL-6RA und IL-11RA sowie weiterer inflammatorisch relevanter Zytokine zusammengefasst.

Wie durch die Sekretionsanalyse bereits vermutet, zeigen sich eine hohe Expression von IL-6 sowie eine geringere Expression vom IL-11. Die Untereinheit B von Interleukin 12 (IL-12B) formt sowohl zusammen mit der Untereinheit A (IL-12A) das Heterodimer IL-12, kann jedoch ebenfalls zusammen mit der Untereinheit A von Interleukin 23 (IL-23A) das Heterodimer IL-23 bilden [321].

Während die mRNA-Expression von IL-12B sehr gering ist, sind die zugehörige Untereinheit A von IL-12 und die Untereinheit A von IL-23 deutlich nachweisbar. CTF1 kann in geringen Mengen bei hSC detektiert werden. Weiterhin finden sich sehr hohe mRNA-Mengen der Rezeptoren IL-6R Untereinheit A und IL-11R Untereinheit A.

Der Befund, dass IL-6R und IL-11R auf mRNA-Ebene exprimiert wird, ließ vermuten, dass IL-6 und IL-11 autokrin auf hSC wirken können. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden hSC mit IL-6 oder IL-11 stimuliert und die Aktivierung intrazellulärer Signalwege anhand der Phosphorylierung von STAT3 mittels Western Blot untersucht.

Neben einer Kontrolle ohne Zugabe von IL-6 oder IL-11 wurden hSC mit IL-6 und Tocilizumab inkubiert. Tocilizumab ist ein monoklonaler neutralisierender Antikörper, welcher durch seine Bindung an IL6-R die Wirkung von IL-6 verhindert. Eine Unterbindung der Phosphorylierung durch Tocilizumab wäre ein weiterer Hinweis, dass die Phosphorylierung von STAT3 über den IL6-R verläuft. Als Positivkontrolle der Aktivierung wurde HyperIL-6 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) [322].

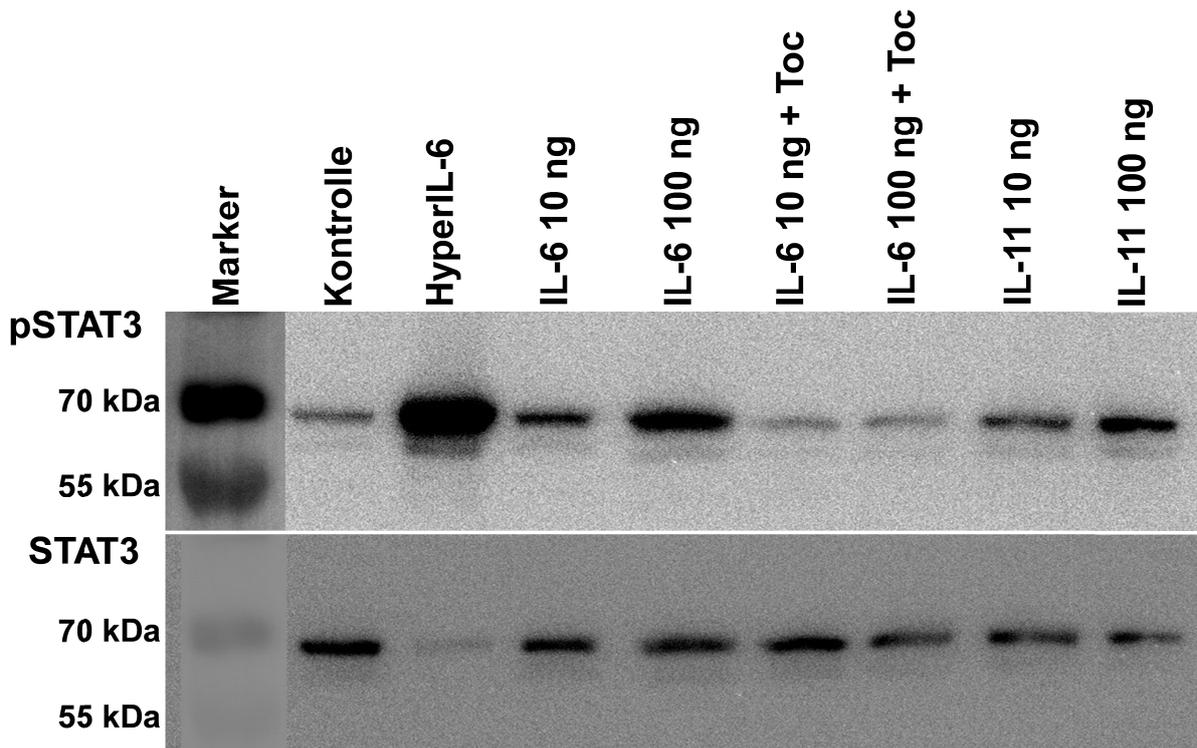


Abb. 4.25: Western-Blot-Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 und IL-11

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Detektion von phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3). hSC wurden für 15 min mit HyperIL-6 (0,1 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml oder 100 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml oder 100 ng/ml) oder IL-6 (10 ng/ml oder 100 ng/ml) in Kombination mit Tocilizumab (100 µg/ml) inkubiert. Für HyperIL-6 wurde 4 µg Protein aufgetragen, für alle anderen Proben wurden 20 µg Protein / Spur verwendet. n = 3.

In Abbildung 4.25 ist die Aktivierung des STAT3-Signalweges durch IL-6 und IL-11 bei hSC *in vitro* mittels Western-Blot-Analyse dargestellt.

Für IL-6 zeigt sich schon bei der geringeren Konzentration von 10 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von STAT3. Bei der höheren Konzentration von 100 ng/ml ist dieses Signal wesentlich verstärkt. Weiterhin offenbart auch IL-11 eine konzentrationsabhängige Induktion der STAT3-Phosphorylierung. Zusätzlich kann festgestellt werden, dass nach Gabe von Tocilizumab (100 ng/ml) die Aktivierung von STAT3 nahezu vollständig unterbunden wird.

Das als Positivkontrolle verwendete HyperIL-6 zeigt aufgrund seiner Eigenschaft als Fusionsprotein von IL-6 und sIL-6R eine starke Aktivierung des STAT3-Signalweges. Entsprechend wird hier eine geringere Proteinmenge für die Analyse verwendet, was durch ein niedrigeres Signal der STAT3-Untersuchung zu erkennen ist.

Somit bestätigen diese Ergebnisse eine funktionelle Expression der Rezeptoren für IL-6 und IL-11 auf hSC und deuten auf eine autokrine Wirkung von IL-6 und IL-11 hin.

4.2.4 Untersuchung der Zytokinregulation über Adenosinrezeptorsignalwege

Bisher konnte gezeigt werden, dass hSC proinflammatorische Zytokine freisetzen. Daher stellte sich die Frage, welche Signalwege bei der Regulation der Sekretion involviert sind. Ein Kandidat hierfür ist der Adenosin-Signalweg (s. Kapitel 1.4.2). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, in welchem Maße die Adenosinrezeptoren von hSC exprimiert werden.

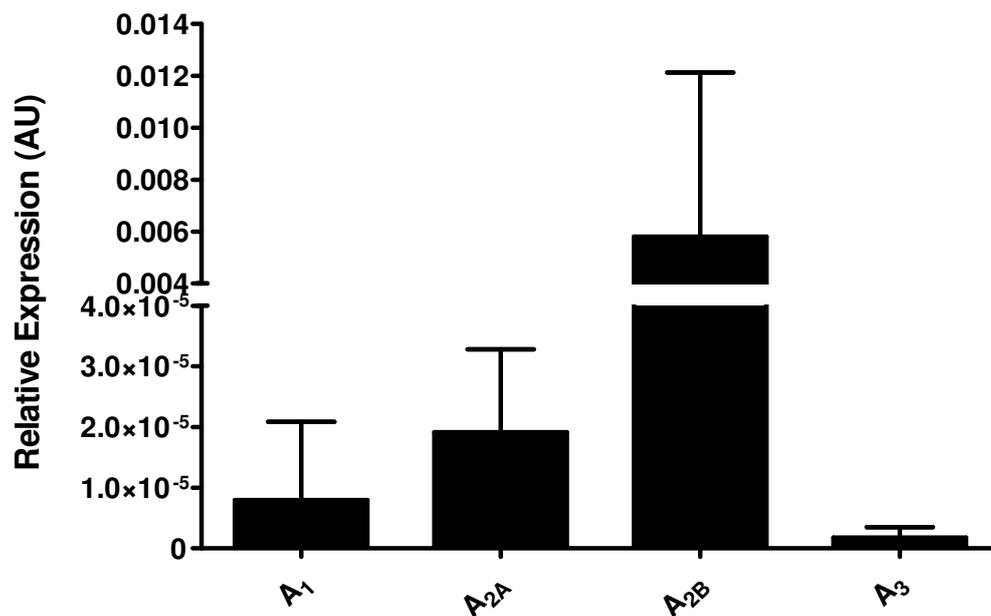


Abb. 4.26: Analyse der Expression der vier Adenosinrezeptor-Subtypen in hSC mittels qRT-PCR
Aufgeführt ist die statistische Analyse der Expression der vier Adenosinrezeptor-Subtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃. Die Expressionsmengen sind auf das Referenzgen *beta-Actin* normiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3.

Wie in Abbildung 4.26 zu erkennen ist, kann bei hSC die mRNA von allen vier Subtypen der Adenosinrezeptoren nachgewiesen werden. Jedoch unterscheidet sich dabei die Expression der verschiedenen Subtypen deutlich voneinander. Die stärkste mRNA-Expression zeigt der Adenosinrezeptor A_{2B}. Im Vergleich zu A_{2B} ist die mRNA-Expression der Subtypen A₁ (ADORA1) etwa 750-fach und von Subtyp A_{2A} (ADORA2) um 300-fach geringer. Nur knapp über dem Detektionslimit liegt die mRNA-Expression des Subtyps A₃ (ADORA3).

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung von Adenosinrezeptoren die Zytokinsekretion von hSC beeinflusst, wurden hSC mit spezifischen Agonisten für die beiden am stärksten exprimierten Adenosinrezeptoren A_{2A} (CGS-21680) und A_{2B} (BAY 60-6583) stimuliert.

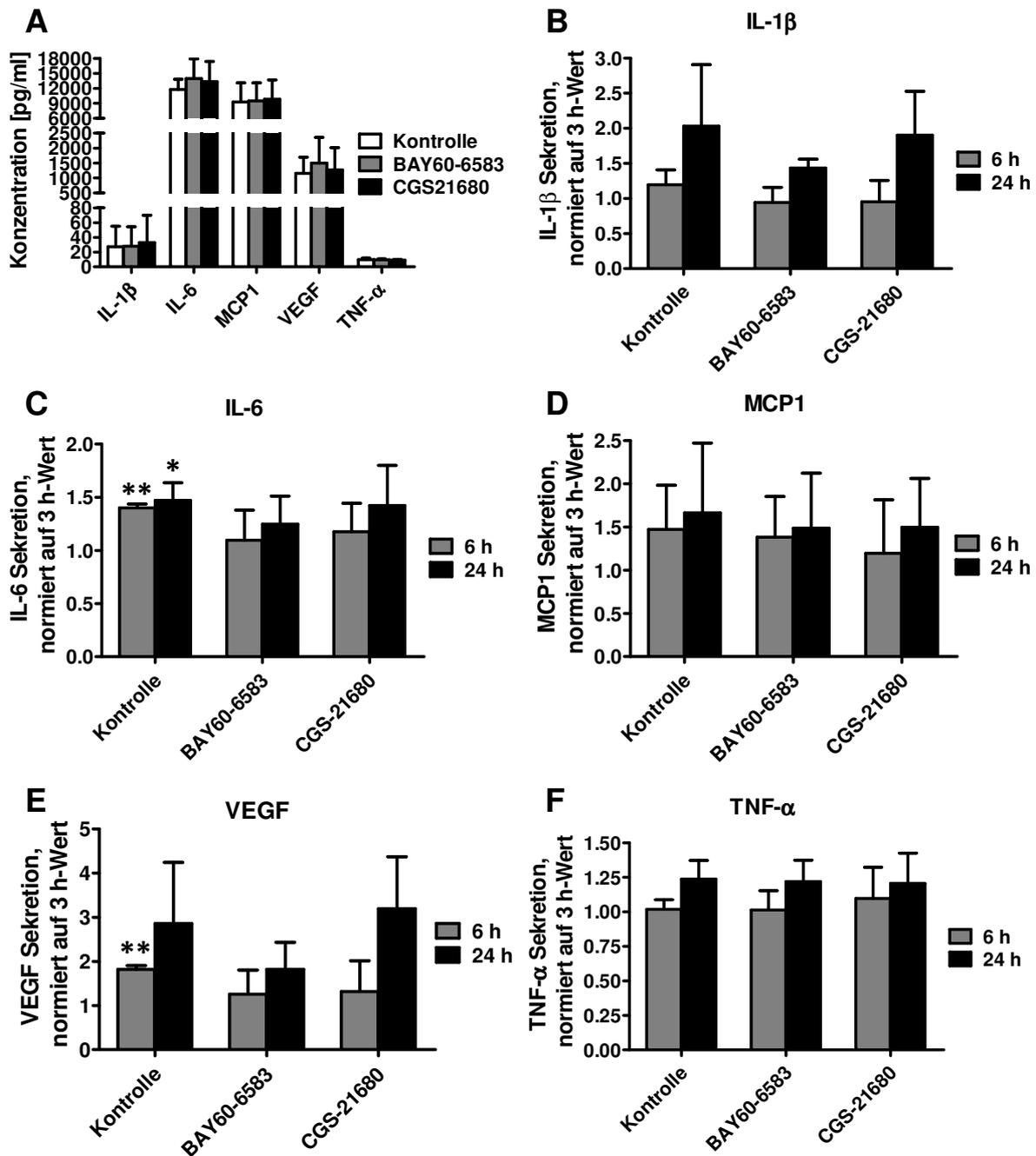


Abb. 4.27: Zeitabhängige Zytokinsekretion unter Einfluss der Adenosinrezeptoragonisten BAY60-6583 und CGS-21680 bei hSC

Dargestellt ist die Sekretion der Zytokine IL-6, IL-1 β , MCP1, VEGF und TNF- α über 6 h (graue Balken) und 24 h (schwarze Balken) ohne und mit Stimulation durch BAY60-6583 (0,8 μ M) oder CGS-21680 (2 μ M). In (A) ist die Konzentration der sekretierten Zytokine nach 3 h bei hSC unter Einfluss von BAY60-6583, CGS-21680 und bei Kontrollzellen ohne Stimulation abgebildet. In (B - F) ist die Konzentration der Zytokine IL-1 β (B), IL-6 (C), MCP1 (D), VEGF (E) und TNF- α (F) nach 6 h und 14 h als *fold change* in Bezug auf die jeweiligen Zytokinkonzentrationen nach 3 h aufgezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3.

Wie schon bei vorherigen Experimenten (s. Abb. 4.23) zeigt sich eine hohe basale Sekretion (4.27 A, weiße Balken) von IL-6 und MCP1. Ebenfalls deutlich detektierbar ist die Sekretion von VEGF. Zusätzlich finden sich geringe Mengen IL-1 β . Die Werte für TNF- α liegen nur knapp über dem Hintergrund.

Der Vergleich der Zytokinfreisetzung unter Einfluss von BAY60-6583 oder CGS-21680 (A) belegt für keines der untersuchten Zytokine nach 3 h eine signifikante Änderung ($P > 0,05$).

Die Analyse der Freisetzung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 6 h, 24 h) beweist eine Akkumulation der Zytokine, welche im Fall von IL-6 (C) und VEGF (E) das Signifikanzniveau erreichten.

Für die Sekretion der Zytokine unter Einfluss von BAY60-6583 (0,8 μM) oder CGS-21680 (2 μM) zeigen sich auch nach 6 h und 24 h keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Zytokinfreisetzung von unstimulierten hSC ($P > 0,05$).

Insgesamt verdeutlichen diese Daten eine Zunahme der Zytokinsekretion über den Beobachtungszeitraum, die jedoch nicht durch Aktivierung des $A_{2A}R$ und $A_{2B}R$ verändert wurde.

Da hMSC in der Forschung ebenfalls für die Regeneration untersucht werden, sollte die Sekretion der Zytokine durch hMSC im Vergleich zu hSC analysiert werden. Des Weiteren sollten die hMSC zusätzlich zu den durchgeführten Experimenten (s. Abb. 4.21 und 4.22) von hSC abgegrenzt werden. Dafür wurden hSC und hMSC für 24 h mit BAY60-6583 (0,8 μM) oder CGS-21680 (2 μM) stimuliert.

In Abbildung 4.28 ist der Vergleich der Zytokinsekretion von hSC und hMSC zusammenfassend dargestellt. Bei der Analyse von IL-1 β (A), IL-6 (B) und TNF- α (D) zeigt sich im Vergleich zu hSC für hMSC nur eine geringere Sekretion. Im Gegensatz dazu ist die Sekretion von TGF β (C) bei hSC und hMSC vergleichbar. Die Sekretion von TNF- α (D), die für hSC nur knapp über dem Hintergrund (5 pg/ml) liegt, ist bei hMSC fast nicht nachweisbar (*lower limit of quantification*, LLOQ: 0,9 pg/ml).

Somit zeigen hSC und hMSC deutliche Unterschiede in der Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α . Die Zytokinfreisetzung nach Stimulation der hMSC mit BAY60-6583 (0,8 μM) oder CGS-21680 (2 μM) offenbart ebenso wie bei hSC (s. Abb. 4.20) keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$) zu der Zytokinfreisetzung von unstimulierten hMSC.

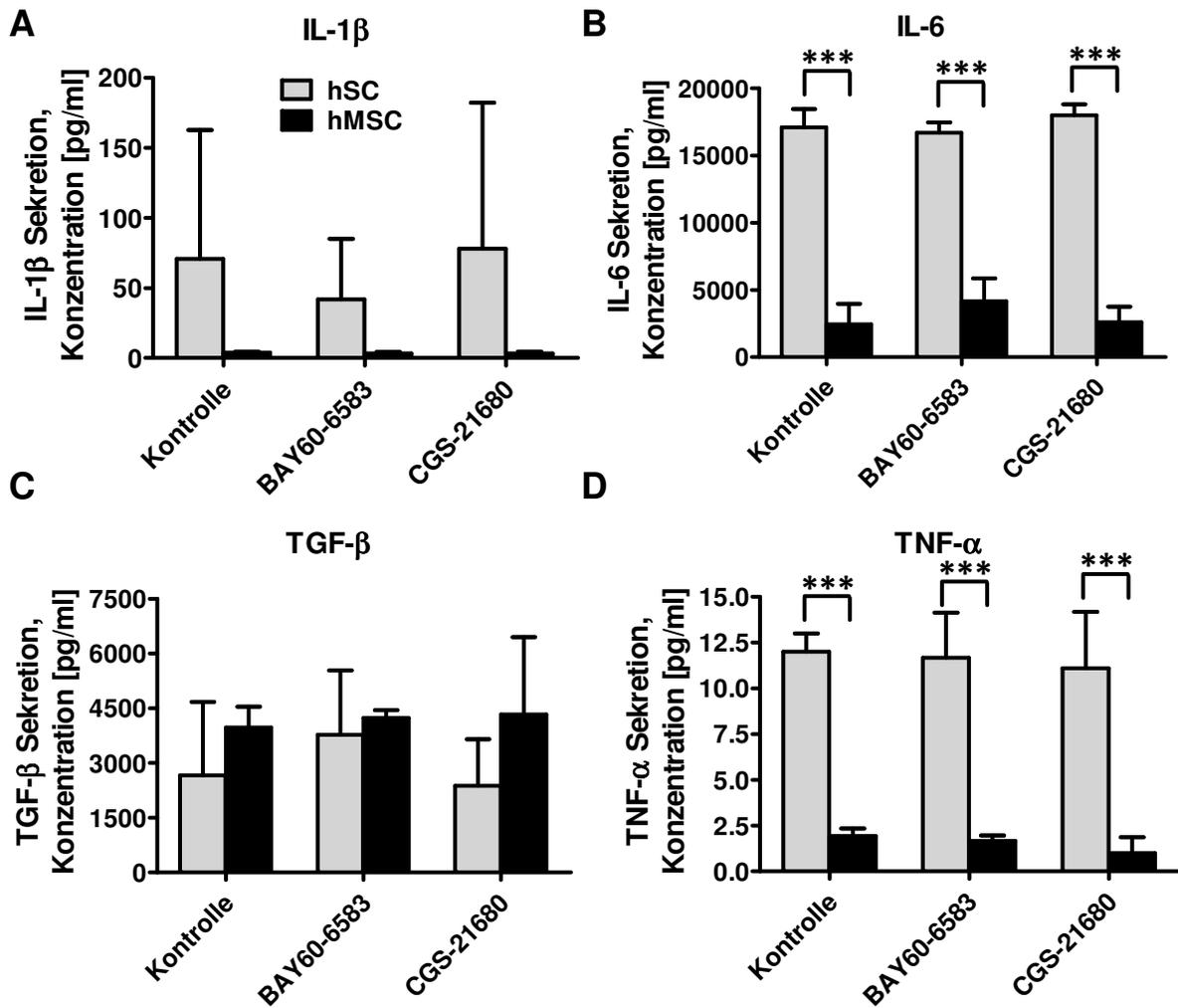


Abb. 4.28: Vergleich der Zytokinsekretion von hSC und hMSC

Die Diagramme geben Auskunft über die Sekretion der Zytokine IL-1 β (A), IL-6 (B), TGF- β (C) und TNF- α (D) von hSC (graue Balken) und hMSC (schwarze Balken) über 24 h. Dabei ist die Konzentration der sekretierten Zytokine im Überstand von unstimulierten Kontrollzellen sowie unter Einfluss von BAY60-6583 und CGS-21680 abgebildet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, jeweils n = 3.

Um zu unterscheiden, ob die Sekretion der hSC konzentrationsabhängig von den A_{2A}- und A_{2B}-Agonisten modifiziert wird, wurden hSC mit unterschiedlichen Konzentrationen von BAY60-6583, CGS-21680 oder dem unspezifischen Adenosinrezeptoragonisten NECA für 24 h inkubiert.

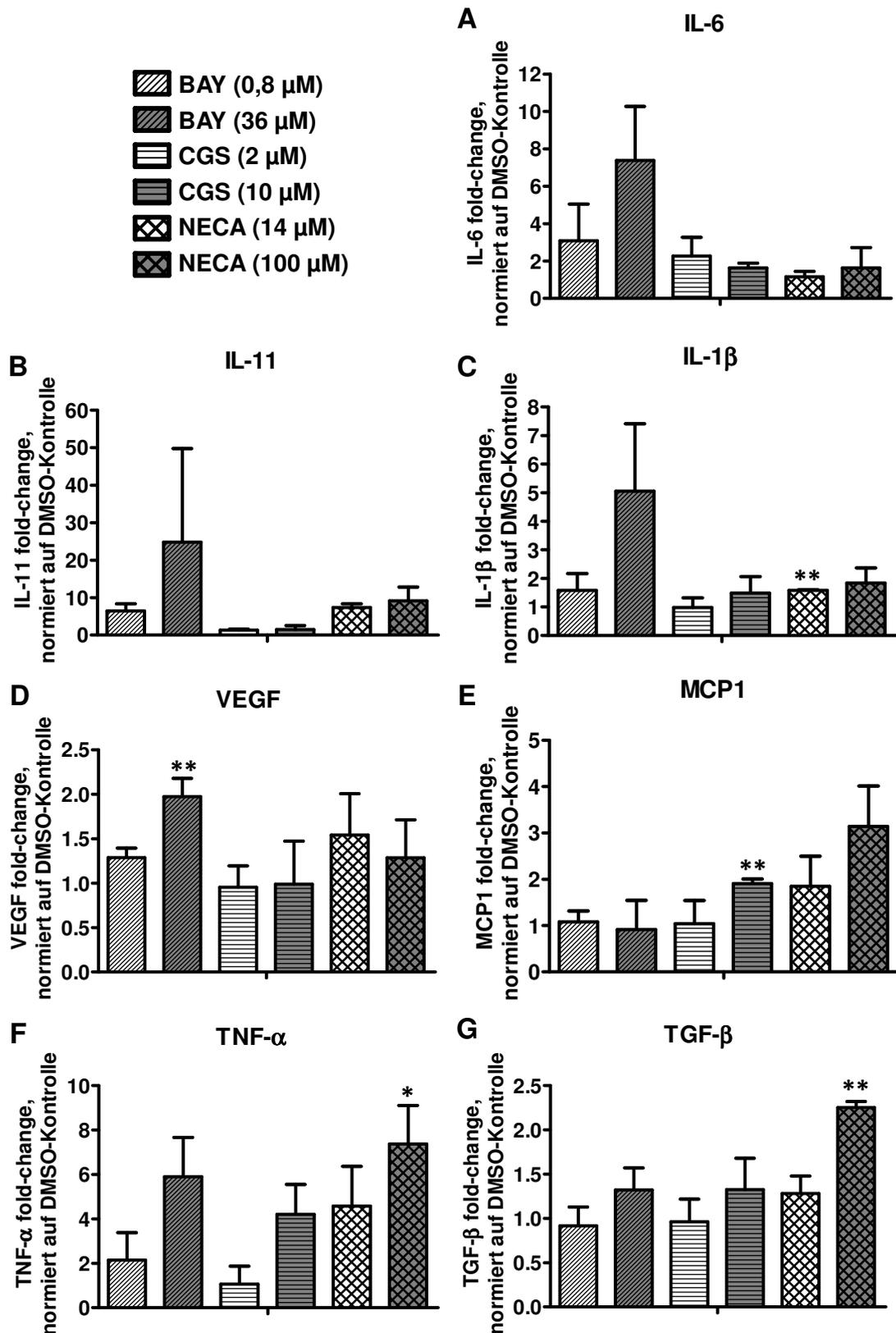


Abb. 4.29: Vergleich der mRNA-Expression von Zytokinen bei hSC nach Agonistenstimulation

In den Diagrammen wird die mRNA-Expression der Zytokine IL-6 (A), IL-11 (B), IL-1β (C), VEGF (D), MCP1 (E), TNF-α (F) und TGF-β (G) von hSC nach Stimulation mit den Agonisten BAY60-6583, CGS-21680 oder NECA für 24 h gezeigt. Dabei ist die Konzentration der mRNA jeweils auf die Expression der mRNA von unstimulierten hSC (DMSO-Kontrolle) normiert. Dargestellt sind Mittelwerte±SD, jeweils n = 3.

In Abbildung 4.29 ist die Expression der mRNA der Zytokine IL-6 (**A**), IL-11 (**B**), IL-1 β (**C**), VEGF (**D**), MCP1 (**E**), TNF- α (**F**) und TGF- β (**G**) von hSC nach Stimulation mit den Agonisten BAY60-6583, CGS-21680 oder NECA für 24 h zusammenfassend dargestellt.

Während die Stimulation mit 0,8 μ M BAY60-6583 keine signifikanten Unterschiede zeigt (s. Abb. 4.27), ist bei der Stimulation mit 36 μ M BAY60-6583 eine Steigerung der mRNA-Expression der Zytokine IL-6 (7,4-fach, **A**), IL-11 (24,8-fach, **B**), IL-1 β (5,1-fach, **C**), VEGF (2-fach, **D**) und TNF- α (5,9-fach, **F**) zu detektieren, wobei die Steigerung für VEGF Signifikanzniveau erreicht ($P < 0,01$).

Die Stimulation mit 10 μ M CGS führt zu einer erhöhten mRNA-Expression von MCP1 (1,9-fach, **E**) und TNF- α (4,2-fach, **E**), wobei für MCP1 Signifikanzniveau erreicht wird ($P < 0,01$).

Die Stimulation mit 14 μ M NECA führt zu einer gesteigerten mRNA-Expression von IL-11 (7,4-fach, **B**), IL-1 β (1,6-fach, **C**), VEGF (1,5-fach, **D**), MCP1 (1,8-fach, **E**) und TNF- α (4,6-fach, **F**). Dabei wird jedoch lediglich bei IL-1 β Signifikanzniveau erreicht ($P < 0,01$).

Im Vergleich dazu führt die Stimulation mit 100 μ M NECA zu einer gesteigerten Expression von IL-11 (9,2-fach, **B**), IL-1 β (1,8-fach, **C**), MCP1 (3,1-fach, **D**) und TNF- α (7,4-fach, **F**), jedoch nicht von VEGF (**D**). Es wird jedoch kein Signifikanzniveau erreicht ($P > 0,05$). Stattdessen ist eine signifikant gesteigerte Expression von TGF- β (2,3-fach, **G**) zu detektieren ($P < 0,01$).

Insgesamt konnte demonstriert werden, dass das Sekretionsmuster von hSC durch Stimulation mit Adenosinrezeptoragonisten, insbesondere bei hoher Konzentration, modifiziert werden kann.

4.2.5 Analyse des Oberflächenproteoms von hSC

Um die hSC weiter molekular zu charakterisieren, wurden die Membranproteine der hSC isoliert und mittels Massenspektrometrie analysiert.

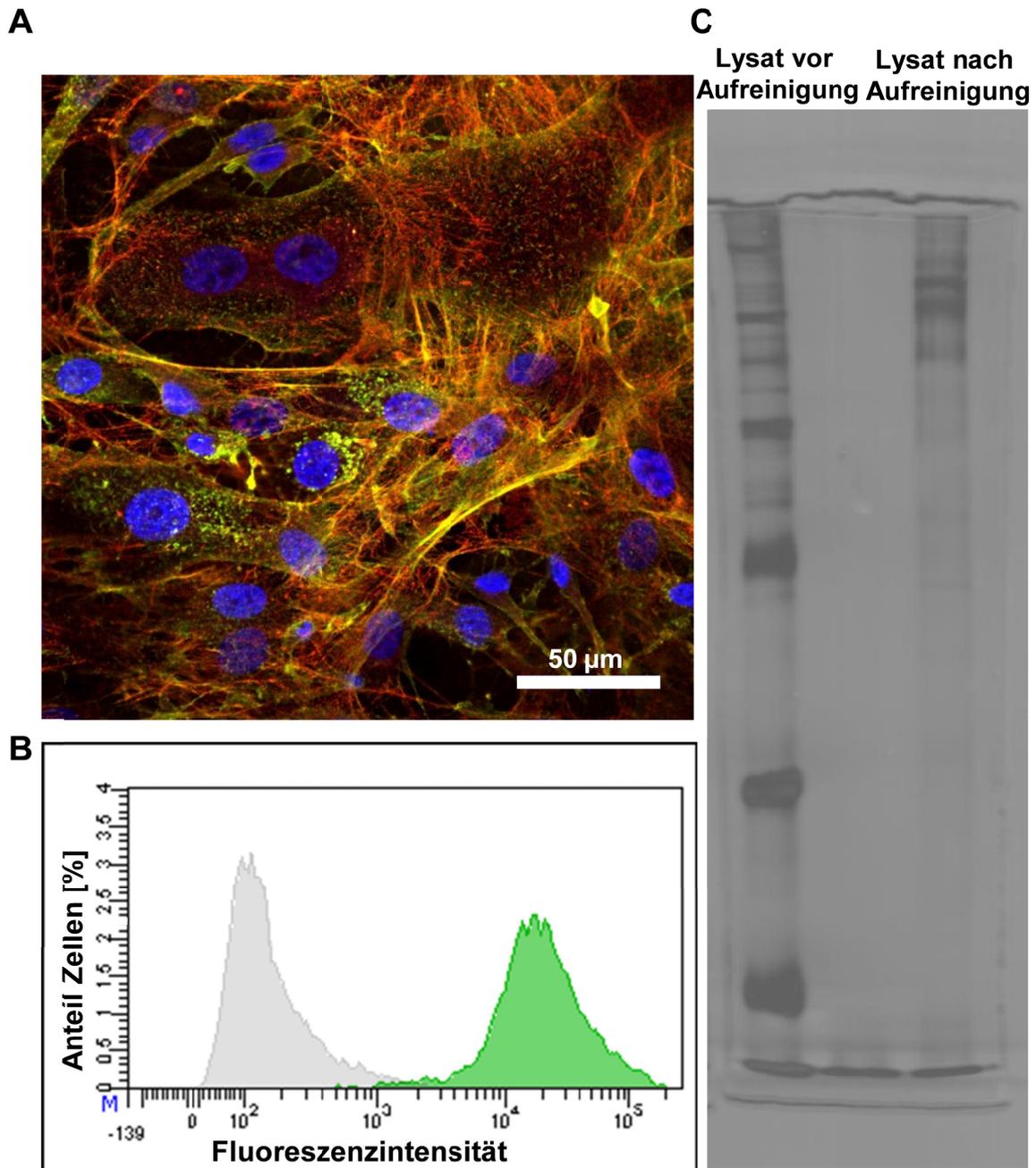


Abbildung 4.30: Biotinylierung und Isolierung der Oberflächenproteine von hSC

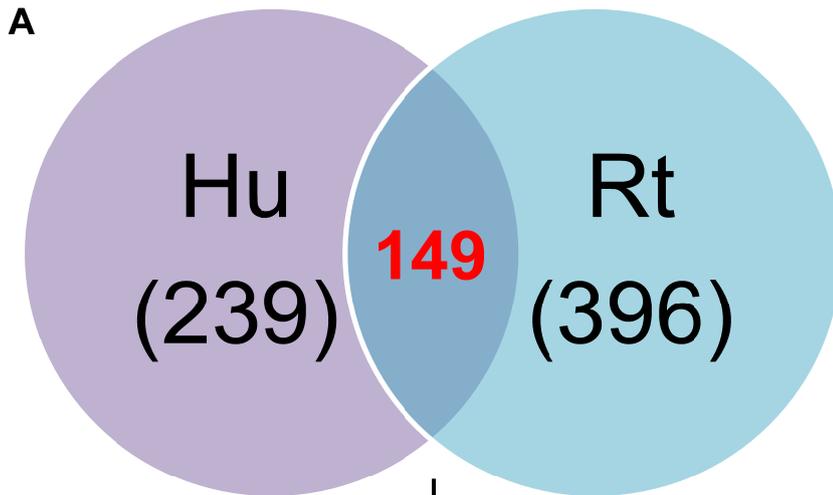
Dargestellt sind die zur Kontrolle der erfolgreichen Biotinylierung der Oberflächenproteine von hSC durchgeführten Analysen. Dazu wurden biotinylierte hSC mit FITC-Streptavidin und *wheat germ agglutinin* (WGA) Alexa Fluor® 633 inkubiert und mikroskopisch untersucht (A). Grün: FITC, rot: WGA, blau: DAPI. Skala = 50 µm. Zusätzlich wurden abgelöste biotinylierte hSC mit FITC-Streptavidin inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert (B). Dargestellt ist hier ein repräsentatives Histogramm der biotinylierten hSC (grünes Histogramm) im Vergleich mit hSC ohne Biotinylierung (graues Histogramm). n = 3. Das mit Neutravidin-Agarose aufgereinigte Lysat der biotinylierten hSC wurde über SDS-Page und Silberfärbung mit nicht aufgereinigtem Lysat verglichen. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel mit Lysat vor und nach Aufreinigung (C).

Abbildung 4.30 zeigt exemplarisch die erfolgreiche Biotinylierung von hSC. Biotinylierte und fluoreszenzmarkierte hSC (s. Kapitel 3.11.2) können lichtmikroskopisch detektiert werden (s. Abb. 4.30 A).

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigt sich eine deutlich höhere Fluoreszenz von hSC mit biotinylierten Oberflächenproteinen (Median: 21132 *mean fluorescence intensity*, MFI) im Vergleich zu Kontrollzellen (Median: 164 MFI) (s. Abb. 4.30 B). Diese Ergebnisse lassen ebenfalls auf eine erfolgreiche Biotinylierung der Oberflächenproteine schließen.

Die biotinylierten Oberflächenproteine der Lysate von hSC wurden mit Neutravidin-Agarose aufgereinigt und mit nicht aufgereinigtem Lysat über SDS-Page und Silberfärbung (s. Kapitel 3.11.2) verglichen (s. Abb. 4.30 C). Hier zeigt sich die selektive Isolierung der biotinylierten Oberflächenproteine aus dem Lysat anhand einer deutlichen Reduktion der Anzahl an Proteinbanden.

Das aufgereinigte Lysat wurde von Dr. Gereon Poschmann im Molecular Proteomics Laboratory (MPL) der Heinrich Heine Universität Düsseldorf mittels Flüssigkeitschromatografie und gekoppelter Massenspektrometrie mit Nano-Elektrospray-Ionisation (ESI) analysiert. Für die Identifikation der Proteine wurden detektierte Fragmentmuster mit Datenbanken verglichen. Die Isolierung der Oberflächenproteine wurde wie beschrieben von Dr. Sebastian Temme aus der Arbeitsgruppe für molekulare Kardiologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf analog mit rEPDC durchgeführt.



B

<p>Extrazelluläre Matrix Kollagen, Typ I, Alpha 1 Matrix Metallopeptidase 2, 14 ADAM Metallopeptidase Domäne 10 Fibronectin 1 Laminin, beta 1 Laminin, gamma 1 Glypikan 1, 6 Kalretikulिन Myoferlin Integrin, alpha 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 11 Integrin, beta 1, 3</p>	<p>Rezeptoren Anthrax-Toxin-Receptor 1, 2 Insulinähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptoren 1, 2 <i>platelet-derived</i> Wachstumsfaktor-Rezeptor Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor Plexin A1, B1, B2 EPH-Rezeptor A2 EPH-Rezeptor B2, B4 Ephrin-B1 Mannoserezeptor, C Typ 2 Neuropilin 1 Endoglin</p>
<p>Transporter Peptidtransporter (SLC1A5, SLC A2, SLC7A5) Cholintransporter (SLC44A1, SLC44A2) Monocarboxylat-Transporter (SLC16A1, SLC16A3) Zinktransporter (SLC39A14)</p>	<p>Enzyme ATPase, Na⁺/K⁺-Pumpe, UE alpha 1 ATPase, Na⁺/K⁺ Pumpe, UE beta 1, 3 ATPase, Ca⁺⁺ transporting Kalzium Kanal, spannungsabhängig 5'-Nukleotidase, ekto (CD73) Endothelin-konvertierendes Enzym 1 Prostaglandin I2 (Prostazyclin) Synthase</p>

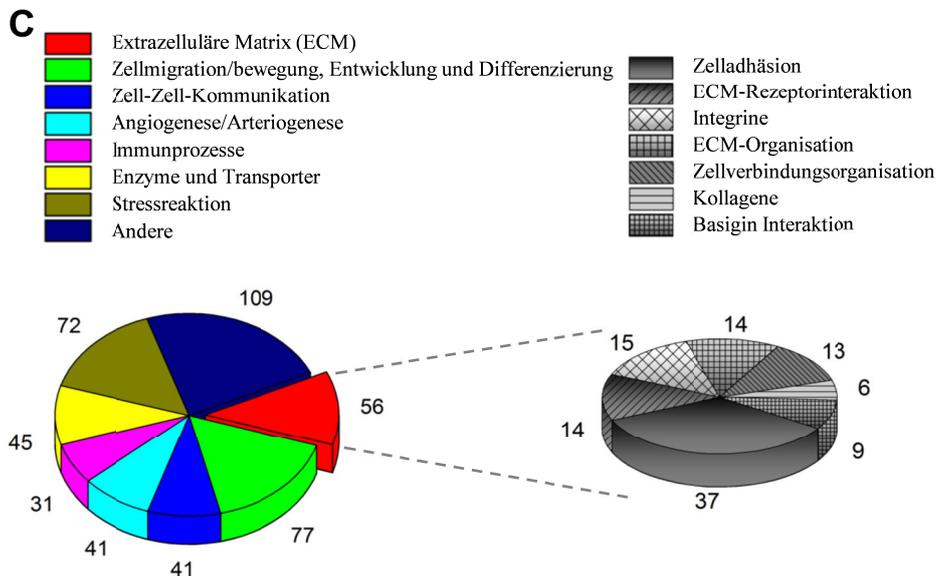


Abbildung 4.31: Analyse der isolierten Oberflächenproteine von hSC im Vergleich mit rEPDC

Abgebildet ist die Analyse der detektierten Oberflächenproteine von SC aus humanen Biopsien und EPDC aus infarzierten Rattenherzen. In mindestens zwei der drei Proben vorkommende Oberflächenproteine aus hSC (239 Proteine, violetter Kreis) und aus rEPDC (396 Proteine, grüner Kreis) wurden als Venn-Diagramm mit einer gemeinsamen Schnittmenge von 149 Proteinen dargestellt (**A**). Die gemeinsamen Proteine wurden in Gruppen unterteilt, ausgewählte Proteine sind hier exemplarisch in Untergruppen tabellarisch eingeordnet (**B**). Die Proteine wurden in insgesamt acht Gruppen eingeordnet und hier im farbigen Kreisdiagramm dargestellt, wobei Proteine mehreren Gruppen zugeordnet werden können. Mit extrazellulärer Matrix assoziierte Proteine (rotes Segment) wurden in sieben Unterkategorien im grauen Kreisdiagramm eingeteilt (**C**).

Wie in Abbildung 4.31 zu sehen ist, wurden mittels Massenspektrometrie nach bioinformatischer Analyse 239 Proteinen bei hSC und 396 Proteinen bei rEPDC detektiert, wobei 149 gemeinsame Proteine identifiziert wurden (s. Abb. 4.31 **A**).

Dies deutet auf eine hohe Kongruenz zwischen dem Oberflächenproteom der hSC und der rEPDC hin. Die 149 gemeinsamen Proteine ließen sich aufgrund ihrer Funktionalität in acht Gruppen einteilen: extrazelluläre Matrix (ECM, 56), Zellmigration/Bewegung, Entwicklung und Differenzierung (77), Zell-Zell-Kommunikation (41), Angiogenese/Arteriogenese (41), Immunprozesse (31), Enzyme und Transporter (45), Stressreaktion (72) sowie andere Proteine (109). Hierbei konnten Proteine aufgrund ihrer Funktion mehreren Gruppen zugeordnet werden. Exemplarisch sind dabei einige ausgewählte Proteine tabellarisch dargestellt (s. Abb. 4.31 **B**).

Mit der extrazellulären Matrix assoziierte Proteine wurden zusätzlich in sieben Unterkategorien eingeteilt, wobei auch hier Proteine in mehrere Kategorien eingeordnet werden konnten. Dabei wurde die Unterteilung in die Kategorien Zelladhäsion (37), ECM-Rezeptorinteraktion (14), Integrine (15), ECM-Organisation (14), Zellverbindungsorganisation (13), Kollagene (6) und Basigin Interaktion (9) gewählt (s. Abb. 4.31 **C**). Eine vollständige Liste der identifizierten Proteine befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Oberflächenproteomanalyse eine hohe Übereinstimmung zwischen hSC und rEPDC. Weiterhin wurden verschiedene, bisher bei hSC und EPDC wenig untersuchte, jedoch potentiell nützliche Oberflächenproteine für zukünftige Analysen identifiziert.

5 Diskussion

5.1 Die Regeneration des Herzens

Obwohl es in den vergangenen Jahren große Fortschritte in der Diagnostik und Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gegeben hat, bleiben diese Krankheiten mit 39 % die häufigste Todesursache in Deutschland [323]. Darüber hinaus gehört der Herzinfarkt zu einer der häufigsten Todesarten der Menschen aller Industrienationen [57, 59].

Typischerweise werden bei einem Infarkt bis zu einer Billion Herzmuskelzellen nekrotisch. Der Verlust einer derart großen Anzahl an Zellen übersteigt bei weitem die regenerative Reserve des Herzens.

5.1.1 Stammzelltherapie zur Regeneration des Herzens

In der kardiovaskulären regenerativen Medizin wurde im letzten Jahrzehnt im Zusammenhang mit Infarkten über eine Vielzahl von Studien zur therapeutischen Rolle von Stamm- bzw. Progenitorzellen zur Regeneration des Herzens berichtet [324, 325].

Dabei hat sich herausgestellt, dass die Applikation von Zellen des Knochenmarks nur zu einer geringen Funktionsverbesserung nach Infarkt führte, die wahrscheinlich nicht durch Regeneration des geschädigten Myokards, sondern indirekt über die Freisetzung von parakrinen Faktoren zustande kommt [326, 327].

In neuerer Zeit rücken daher endogene Stammzellen des Herzens zunehmend in den Fokus des Interesses. In diesem Zusammenhang sind epikardiale Stammzellen (EPDC), die sich auf der Herzoberfläche nach Infarkt bilden, eine vielversprechende Zellpopulation [7, 136].

EPDC sind während der Embryonalentwicklung an der Entstehung des Herzens beteiligt [141, 328] und können nach Reaktivierung ihres embryonalen Programmes nach Infarkt zur Regeneration des Herzens beitragen [136, 137, 148, 159].

5.1.2 Gegenwärtiger Stand der Forschung

Ein wichtiger Ansatz bei der Regeneration des Herzens nach Infarkt ist die Verwendung von Stamm- oder Progenitorzellen, welche im geschädigten Herzen zu einer Regeneration des Gewebes führen sollen. Dabei zeigen unterschiedliche Arten von Zellen wie mesenchymale Stammzellen (MSC) oder induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) in Tiermodellen meist nur geringe Erfolge [122-125]. Da es sich hierbei außerdem meist um patienten- und/oder organfremde Zellen handelt, sind immunologische Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen. Zusätzlich besteht bei diesen Zellen das Risiko einer Tumorbildung aufgrund von Kontaminierungen mit undifferenzierten Stammzellen [329].

Auf der anderen Seite gibt es endogene epikardiale Zellen (EPDC), welche eine wichtige Rolle für die Herzentwicklung während der Embryonalentwicklung spielen. Diese EPDC entstehen während der Embryonalentwicklung durch EMT aus Zellen des Epikards, welches sich aus einer extrakardialen, mesodermalen Zellpopulation entwickelt [2-4, 8-10].

Eine Subpopulation der epikardialen Zellen durchläuft eine EMT, in dessen Folge die dabei aus den epikardialen Zellen entstehenden epikardialen Progenitorzellen (EPDC) in den proepikardialen Raum migrieren [3, 23-25].

Im weiteren Verlauf erfolgt eine Migration in das Myokard, wo die EPDC zu Zellen der glatten Muskulatur, Endothelzellen und Fibroblasten differenzieren können [24, 28, 29].

Nach der Geburt geht das Epikardium in einen Ruhezustand über, wobei es weiterhin zum Austausch von Signalen mit dem Myokardium kommt, was für die Homöostase des Herzens eine wichtige Rolle spielt [330].

Interessanterweise wird nach einem Herzinfarkt die einschichtige Epikardschicht reaktiviert, die Zellen proliferieren und es kommt erneut zu einer Expression embryonaler Marker, wie WT1 und Tbx18 zeigen [133]. Ebenso wie bei der Embryonalentwicklung können diese adulten EPDC in das Myokard migrieren und zu Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen der glatten Muskulatur sowie in geringer Zahl zu Kardiomyozyten differenzieren [133, 137].

So zeigten Studien mit EPDC in Nagern, dass der Beitrag von EPDC zu Kardiomyozyten normalerweise nur gering ist [133, 137, 331]. Offensichtlich ist der Beitrag von EPDC zur *de novo* Generierung von Kardiomyozyten nicht ausreichend, um das Herz effektiv zu regenerieren [332].

5.2 Epikardiale Zellen des Atriums

Während bei Nagern das Differenzierungspotential von EPDC bereits gut beschrieben ist [137, 144], sind EPDC des Menschen jedoch weit weniger charakterisiert. Ein Grund hierfür ergibt sich aus der Tatsache, dass ventrikuläres Biopsiematerial von Patienten mit Infarkt nicht verfügbar ist.

Alternativ können jedoch sogenannte stromale Zellen aus Vorhöfen des Menschen isoliert werden, die als Biopsiematerial bei verschiedenen herzchirurgischen Eingriffen anfallen. Allerdings sind die stromalen Zellen des Vorhofs bisher nur wenig charakterisiert und es ist nicht vollständig geklärt, ob es sich hierbei tatsächlich um EPDC handelt. Es gibt jedoch erste Hinweise, dass die aus dem Atrium isolierten stromalen Zellen (hSC) wesentliche Merkmale von EPDC besitzen [333]. Aus diesen und weiteren Befunden leitete sich die Vermutung ab, dass es sich bei den beschriebenen hSC tatsächlich um humane EPDC handeln könnte.

In dieser Arbeit wurde zunächst ein robustes Protokoll für die Isolierung von hSC aus klinischem Biopsiematerial etabliert. Die so gewonnenen hSC wurden dann hinsichtlich der Morphologie, des Zellwachstums und der Gen- und Proteinexpression im Detail charakterisiert.

Im Ergebnis konnte erstmals gezeigt werden, dass die im Vorhof des Menschen vorkommenden hSC nicht wie bisher angenommen vorzugsweise auf dem Epikard lokalisiert sind, sondern sich homogen über das Vorhofmyokard verteilen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass hSC ein großes Panel von bekannten Zytokinen freisetzen, welche wahrscheinlich an der Modulation der Immunantwort beteiligt sind.

Mittels Oberflächenproteomanalyse konnte zusätzlich eine Reihe von Rezeptoren identifiziert werden, die potentiell bei der weiteren Differenzierung der hSC eine wichtige Rolle spielen könnten. Der Vergleich mit Oberflächenproteinen der ventrikulären EPDC der Ratte ergab außerdem eine hohe Speziesübereinstimmung, eine Tatsache, welche für eine Konservierung der für die Kardiogenese wichtigen Signaltransduktionswege spricht.

Die für EPDC am Ventrikel beschriebene epikardiale EMT konnte nicht bei stromalen Zellen des Atriums beobachtet werden [29]. Allerdings entwickelt sich auch über dem Atrium eine Einzelzellschicht aus WT1⁺-Zellen, wobei diese Zellen während der Embryonalentwicklung weniger stark strukturell miteinander verbunden sind [334].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass diese WT1⁺-Zellen im adulten Atrium vereinzelt ebenfalls im Myokard nachgewiesen werden können (s. Abb. 4.6). Dies bedeutet, dass auch im Atrium die epikardialen Zellen grundsätzlich zu einer EMT mit nachfolgender Migration in das Myokardium befähigt sind. Die EMT der epikardialen Zellen kann *in vitro* sowohl von *fibroblast growth factor* (FGF) als auch *vascular endothelial growth factor* (VEGF) stimuliert werden [26]. Die Sekretion von VEGF durch die hSC (s. Abb. 4.23) sowie die Expression der VEGF-Rezeptoren Neuropilin 1 (NRP1) und VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor*, KDR, Flk1) (s. Abb. 4.31) untermauern die vermutete Fähigkeit zur EMT dieser Zellen.

WT1 ist ein wichtiger Marker von epikardialen Zellen des Ventrikels. Im nicht geschädigten Herzen wird WT1 praktisch nicht exprimiert, jedoch kommt es nach Herzinfarkt in den EPDC zu einer erneuten Expression von WT1, wodurch die Zellen zu EMT und einer Migration in das Myokard befähigt werden [43, 139, 141].

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand von Kryoschnittpräparaten gezeigt werden, dass einzelne WT1⁺-Zellen im Myokard des humanen Atriums lokalisiert sind (s. Abb. 4.6). Allerdings konnten keine WT1⁺-Zellen des Epikards beobachtet werden, was möglicherweise mit der bekannten niedrigen Expression von WT1 am nicht geschädigten Herzen zusammenhängt. Durch das hier verwendete Protokoll zur Isolierung der stromalen Zellen aus atrialem Gewebe wurden jedoch sowohl aus dem Epikardium als auch aus dem Myokardium WT1⁺-Zellen isoliert. Diese unterscheiden sich weder in ihrem Phänotyp (s. Abb. 4.2) noch in der Expression der anderen untersuchten Marker signifikant ($P > 0,05$) voneinander (s. Abb. 4.3 – 4.5). Mit Hilfe des verwendeten enzymatischen Isolierungsverfahrens konnte gezeigt werden, dass sich im Mittel 251 stromale Zellen pro mg Biopsiematerial isolieren lassen. Diese erstaunlich geringe Zellzahl deutet einerseits darauf hin, dass im Atrium nur wenige hSC vorhanden sind, andererseits ist dies ein Hinweis dafür, dass es sich nicht um Fibroblasten handelt, da diese mit Endothelzellen zusammen die Hauptanzahl an Zellen des Vorhofs ausmachen [335]. Um einer möglichen Kontamination mit Fibroblasten in den Versuchen vorzubeugen, wurde bei allen Zellisolierungen ein *pre-plating step* durchgeführt, um die schnell adhärierenden Fibroblasten zu entfernen [314].

Bei keinen von uns durchgeführten Zellisolationen fanden sich Zellen in der Kultur, die einen endothelialen Phänotyp aufwiesen. In der Literatur wurde auch ein endothelialer Phänotyp beschrieben, wenn Auswuchskulturen aus Biopsiegewebe des Herzens verwendet wurden; jedoch wird bei dem Passagieren der Zellen eine EMT durchlaufen, wobei die Zellen anschließend Charakteristika von glatten Muskelzellen annehmen [144]. Es wird vermutet, dass es sich bei den Zellen um epikardiale Zellen handelt, welche noch keine EMT durchlaufen haben. Durch die Passagierung der Zellen wird eine EMT der Zellen ausgelöst, infolgedessen die Zellen von einem endotheliale Phänotyp zu einem mesenchymalen, spindelförmigen Phänotyp wechseln. Demnach ist davon auszugehen, dass bei dem von mir angewendeten Protokoll die atrialen hSC ebenfalls eine EMT durchlaufen und den für EPDC beschriebenen Phänotyp annehmen (s. Abb. 4.2). Initial konnten in einigen Kulturen Zellen mit Myofibroblasten ähnlichem Phänotyp detektiert werden. Diese wurden jedoch bei der Stimulation der Zellen mit bFGF nach einigen Tagen in Kultur nicht mehr beobachtet.

5.2.1 Die verschiedenen Zellen des Herzens

Sowohl Ventrikel als auch Atrium bestehen aus einer Vielzahl von Zellen, wobei neben 30-35 % Kardiomyozyten [336] vor allem Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Gefäßmuskelzellen [203] sowie endogene Immunzellen [337] vorkommen.

Obwohl Kardiomyozyten volumenmäßig die wesentliche Zellpopulation darstellen, zeigen neuere Befunde, dass Endothelzellen die am häufigsten vertretene Zellpopulation ist, gefolgt von den Fibroblasten und Kardiomyozyten [338]. Dabei können die jeweiligen Zellpopulationen sowohl phänotypisch als auch über die Expression von Markergenen bzw. Markerproteinen voneinander abgegrenzt werden.

Kardiomyozyten bilden den sogenannten kontraktilem Apparat. Im Gegensatz zu Skelettmuskelzellen besitzen sie entweder einen oder zwei Zellkerne und sind über Glanzstreifen miteinander verbunden. Ein wichtiger Marker der Kardiomyozyten ist kardiales Troponin T, welches auch als diagnostischer Marker bei Herzinfarkt untersucht wird [339].

Kardiale Marker zum Nachweis der Kardiomyozyten-Progenitorzellen sind Nkx2.5 [340], Tbx5 [30]), Isl1 [341] und GATA4 [156].

Fibroblasten haben einen länglichen Phänotyp und können zytoplasmatische Fortsätze ausbilden. Durch die Synthese von extrazellulärer Matrix wie dem Kollagen tragen Fibroblasten entscheidend zur Struktur des Gewebes sowie der Wundheilung nach Verletzung bei [342, 343].

Fibroblasten des Herzens haben durch Zell-Zell-Kontakte mit Kardiomyozyten und anderen Fibroblasten über Connexine (Cx40, Cx43, und Cx45) [344, 345] einen wichtigen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Herzens. Weiterhin besitzen die Fibroblasten durch ihre Zell-Zell-Kontakte eine elektrochemische Kopplung an die Kardiomyozyten und tragen durch die Fähigkeit zur Ausbildung eines Membranpotentials entscheidend zu den elektrophysiologischen Eigenschaften des Herzens bei [346]. Ebenfalls sind sie in der Lage verschiedenste Zytokine und Wachstumsfaktoren zu sekretieren. So führt die Stimulation mit Angiotensin II zu einer Ausschüttung von TGF- β und Endothelin-1, was eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zur Folge hat [347]. Ebenfalls wurde bei Stimulation mit Angiotensin II eine erhöhte Sekretion von IL-6, Leukämiehemmender Faktor (LIF) und Cardiotrophin-1 durch kardiale Fibroblasten gefunden [348]. Zur Identifikation von Fibroblasten werden verschiedene Marker wie *fibroblast specific protein 1* (FSP1) [349] oder Vimentin [350] verwendet, wobei die Spezifität der einzelnen Marker diskutiert wird.

Endothelzellen kleiden als Einzelzellschicht das Lumen von Blutgefäßen aus. Sie besitzen eine flache, prismatische Form und sind deutlich kleiner als Kardiomyozyten oder Fibroblasten. Die Identifikation von Endothelzellen erfolgt meist durch Oberflächenmarker wie CD31 [351, 352] oder von Willebrand Faktor (vWF) [351].

Mit Ausnahme der Kapillaren werden Blutgefäße von Schichten aus glatten Gefäßmuskelzellen umschlossen, wobei Arterien und Arteriolen im Vergleich zu Venen und Venolen eine deutlich dickere Schicht besitzen. Glatte Muskelzellen haben einen spindelförmigen Phänotyp mit einem zentralen Kern und besitzen im Gegensatz zur Herz- oder Skelettmuskulatur keine Querstreifung.

Als häufigste Marker werden in der Literatur *α -smooth muscle actin* (α -SMA) und *smooth muscle-myosin heavy chain* (SM-MHC) [353] verwendet.

Neben diesen Zelltypen, welche zusammen die Hauptmasse des Myokardiums ausmachen, ist das Herz auf seiner Außenseite von einer einschichtigen Epithelschicht umgeben, den epikardialen Zellen, welche über die perikardiale Flüssigkeit an das Perikard angrenzt.

Diese epikardialen Zellen haben – wie oben bereits ausgeführt - einen entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung des Herzens und sind möglicherweise an der Regeneration des adulten Herzens nach Infarkt beteiligt.

5.2.2 Einfluss von atrialen EPDC auf Remodelingprozesse

Ein Myokardinfarkt im Ventrikel führt zu einer Aktivierung der adulten EPDC, in Folge dessen es zu einer EMT und Proliferation mit Migration der Zellen in das Subepikardium kommt [139, 141]. Allerdings ist bislang nichts über eine Aktivierung der EPDC des Atriums, z. B. bei einem ventrikulären Infarkt, bekannt. Daher war bisher unklar, ob ohne einen Auslöser für EMT überhaupt EPDC im Vorhofmyokard vorhanden sind und ob diese sich von EPDC des Epikards unterscheiden.

Statt eines ventrikulären Infarktes können im Vorhof andere Erkrankungen vorliegen, welche aufgrund ihrer Pathophysiologie wahrscheinlich zu einer Aktivierung der EPDC führen.

Eine der häufigsten Erkrankungen des Vorhofs ist das Vorhofflimmern (VHF). VHF kennzeichnet sich durch einen abnormal schnellen bzw. irregulären Herzschlag aus, manchmal gepaart mit Kurzatmigkeit, Schwindel oder Brustschmerzen [354].

Pathophysiologisch zeigt sich ein VHF durch kreisende elektrische Impulse in den Vorhöfen, meist beginnend an den Pulmonarvenen [355]. Als Folge entwickelt sich eine Fibrose in Kombination mit einer Dilatation der Vorhöfe sowie einer verstärkten Inflammation [356-359]. Bei VHF sind Erkrankungen des Ventrikels, wie z. B. ein MI, wichtige Risikofaktoren [360-363]. So entwickeln etwa 10-15 % der Patienten nach einem ventrikulären Myokardinfarkt ein VHF [364-367]. Ebenfalls können häufig (17-42 %) atriale Infarkte postmortem bei Patienten mit MI gefunden werden [368, 369]. Da das Atrium im Vergleich zum Ventrikel relativ dünn ist, sind diese Infarkte meist transmural.

Die Therapie der Wahl von schwerem VHF ist oft eine Katheterablation [370]. Hierbei wird ein Katheter - zumeist über die Leistenvene - bis in das linke Atrium eingeführt, wo eine Hochfrequenzablation zu einer transmuralen Läsion des Vorhofgewebes führt. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer nichtleitenden Narbe, die bewirkt, dass die kreisenden elektrischen Impulse gestoppt werden.

Allerdings konnte festgestellt werden, dass in den dabei geschädigten Bereichen atriale Koronararterien verlaufen [371, 372], deren Schädigung zu atrialen Infarkten führen kann. Des Weiteren wurden bei Ablation eine Dysfunktion der Mikrozirkulation sowie eine proinflammatorische Reaktion beobachtet, welche mit einer frühen Form des VHF in Verbindung gebracht wurde [373, 374].

Die genauen Zusammenhänge zwischen Vorhofflimmern und atrialer Ischämie sind noch nicht klar. Es ist jedoch bekannt, dass sich eine atriale Ischämie als Folge einer zu geringen Sauerstoffversorgung entwickeln kann [375]. Grund für eine solche Unterversorgung können ein ventrikulärer Infarkt, ein vaskuläres Remodeling oder aber ein erhöhter Sauerstoffbedarf aufgrund eines erhöhten Bluthochdrucks bzw. einer dauerhaft erhöhten Herzfrequenz sein [375-378].

Bei atrialer Ischämie kommt es – wie auch am Ventrikel - zu einem Verlust der Kontraktilität [379, 380]. Selbst kurzes VHF kann zu einer Dysfunktion der Kontraktion im Atrium führen [381], jedoch kann die kontraktile Funktion durch Perfusion meist wiederhergestellt werden [379, 382-384].

Während eines VHF ist der Sauerstoffbedarf des Gewebes deutlich erhöht [385]. Eine resultierende Sauerstoffunterversorgung im Atrium kann zu Remodelingprozessen führen, wobei Hypoxiemarker wie der Hypoxie induzierte Faktor α (HIF α) und angiogene Marker wie VEGF detektiert werden können [386-388]. Dabei erinnern diese Prozesse an strukturelle Änderungen, wie sie bei ventrikulärem Remodeling als Folge von chronischer Unterversorgung experimentell entdeckt wurden [382, 389].

Remodelingprozesse durch VHF beinhalten eine Änderung der Ultrastruktur [382, 389] sowie das Vorhandensein einer erhöhten Menge an extrazellulärer Matrix [389]. An diesen Prozessen könnten hSC einen wichtigen Anteil haben. So konnte bei der Oberflächenproteomanalyse die Expression von Matrix-Metalloproteasen (MMP) gefunden werden (s. Abb. 4.31), welche vor allem für den Abbau von extrazellulärer Matrix verantwortlich sind.

Bei atrialer Ischämie dedifferenzieren Myozyten in einen neonatalen Phänotyp [390, 391], ein Zustand, der als Hibernation bezeichnet wird und auch im Ventrikel bei Sauerstoffunterversorgung beobachtet werden konnte.

Es wird davon ausgegangen, dass der Effekt direkt mit der verringerten Energieversorgung zusammenhängt [383] und einen Versuch darstellt, den Sauerstoffbedarf zu reduzieren und eine Apoptose oder Nekrose der Zellen zu verhindern.

Bei Patienten mit VHF kommt es in den meisten Fällen zu einer Fibrose des Atriums [391, 392]. Hierbei konnte die Expression von α -SMA gefunden werden [391]. Dieser Marker wird neben Zellen der glatten Muskulatur auch bei Myofibroblasten [393] detektiert. Fibroblasten können durch Aktivierung zu Myofibroblasten differenzieren, wobei die Myofibroblasten einige morphologische Charakteristika von Zellen der glatten Muskulatur besitzen [394] und durch Sekretion von ECM in der Frühphase nach Verletzung und ECM-Remodeling durch MMP zur Wundheilung beitragen. Dabei gehen die Myofibroblasten in einem späteren Verlauf der Wundheilung in Apoptose über, was den Übergang von der Entzündungs- zur Proliferations- und Heilungsphase markiert.

Bei hSC konnten sowohl Zellen mit Myofibroblast ähnlichem Phänotyp (s. Abb. 4.2) als auch die Expression von α -SMA (s. Abb. 4.4 - 4.5) detektiert werden, was vermuten lässt, dass hSC durch Differenzierung zu Myofibroblasten an der frühen Phase der Wundheilung beteiligt sind. Weiterhin deutet die Expression von ECM-Molekülen wie Kollagen Typ 1 Alpha 1, Fibronectin 1, Laminin β 1 und Laminin γ 1 sowie von ECM-degradierenden MMP auf einen Einfluss der hSC bei der Modulation der ECM hin (s. Abb. 4.31). Insbesondere Kollagen I ist dabei im späteren Verlauf der Wundheilung für die mechanische Stabilität der Infarktnarbe von entscheidender Bedeutung [103, 105].

5.2.3 Stromale Zellen des Atriums

Stromale Zellen können aus verschiedenen Geweben gewonnen werden [395]. Bisher wurden vor allem die stromalen Zellen des Knochenmarks (BM-MSC) auf ihr regeneratives Potential hin untersucht [396]. Inzwischen geht man generell davon aus, dass die dabei beobachteten, positiven Auswirkungen auf die Wundheilung und das positive Remodeling hauptsächlich durch parakrine Effekte zustande kommen [397]. Insbesondere gibt es positive Einflüsse im Bereich der Angiogenese und Modulation der Immunantwort [126].

Stromale Zellen des Knochenmarks besitzen die Fähigkeit in Osteozyten, Chondrozyten oder Adipozyten zu differenzieren, wodurch bei einer Injektion der Zellen die Gefahr einer unerwünschten Differenzierung besteht [398, 399].

Aufgrund ihrer kardialen Herkunft sowie der Expression kardialer Marker wie GATA4 und cTnt im Vergleich zu MSC (s. Abb. 4.22) besteht dieses Risiko bei hSC nicht. Zusätzlich wurden bei der Transplantation von stromalen Zellen des Atriums eine verstärkte Angiogenese [400], eine erhöhte kardiale Wundheilung [159] sowie eine Differenzierung in Kardiomyozyten [401] beschrieben.

Im Vergleich zu BM-MSC ist relativ wenig über stromale Zellen des Atriums bekannt. Neuere Studien versuchen auf unterschiedliche Weise Stamm- bzw. Progenitorzellen des Atriums zu isolieren, wobei die erhaltenen Zellen neben EPDC auch andere Bezeichnungen durch die Autoren erhalten haben. So wurden kultivierte stromale Zellen aus humanen atrialen Biopsien z. B. als *cardiac stromal cells* (CStC) bezeichnet [333]. Diese Zellen zeigen die Expression der mesenchymalen Marker CD73 und CD90 in vergleichbarem Maß zu den in dieser Arbeit isolierten hSC (s. Abb. 4.21).

In weiteren Studien wurden aus atrialen Biopsien gewonnene Zellen mit einer hohen Expression von Aldehyd-Dehydrogenase als *cardiac atrial appendage stem cells* (CASC) betitelt [401, 402]. Diese Zellen unterschieden sich von BM-MSC in ihrem Differenzierungspotential und zeigten die Expression von kardialen Markern wie GATA4 und cTnt [402], welche auch bei hSC detektiert werden konnten.

Für CASC wurde nach Transplantation im MI-Modell des Schweins eine Differenzierung zu Kardiomyozyten mit einer resultierenden Verbesserung der Herzfunktion nachgewiesen [401]. Weiterhin wurden Zellen aus enzymatisch verdaulichem Epikard des Atriums als EPDC betitelt [403]. Ebenfalls wurden die aus Auswuchskulturen des atrialen Epikardiums gewonnenen Zellen als atriale EPDC bezeichnet [144, 159, 198, 404, 405].

Für diese Zellen konnte eine Expression von WT1 [198, 405], GATA4 [144], CD73 [405], cTnt [144, 405], CD44 [144, 198], CD105 [144, 198], CD90 [144, 198], jedoch nicht für CD31 [198] gezeigt werden. Die gleichen Marker konnten in dieser Arbeit bei hSC nachgewiesen werden (s. Abb. 4.3 – 4.5).

Im Vergleich zu enzymatischen Verfahren konnten bei Auswuchskulturen des Epikardiums nur wenige Zellen isoliert werden [198, 404], die zunächst einen epithelialen Phänotyp zeigten [144, 404]. Dieser änderte sich nach Passagierung zu einem mesenchymalen Phänotyp, der auch bei den durch enzymatische Verfahren isolierten EPDC [403] sowie bei den in dieser Arbeit gefundenen hSC nachgewiesen werden konnte.

Da bisher davon ausgegangen wurde, dass sich EPDC ausschließlich als Epikard auf der Außenseite des Atriums befinden, wurde bei den bisher beschriebenen Verfahren nur die epikardiale Zellschicht für die Zellisolierung verwendet.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die isolierten Zellen aus Epikard und Myokard morphologisch und molekular identisch sind. Diese Tatsache bedeutet eine enorme Erleichterung für zukünftige Experimente, da nun das gesamte Vorhofmyokard zur Gewinnung der Zellen eingesetzt werden kann und somit eine deutlich höhere Zellzahl als bisher zur Verfügung steht.

Die durch einen Infarkt induzierten apoptotischen Kardiomyozyten werden durch eingewanderte Immunzellen, insbesondere durch Makrophagen, mittels Phagozytose entfernt, so dass sich in der Folge eine Narbe bilden kann. Ein schneller Abbau der abgestorbenen Zellen verkürzt die Entzündungsphase und kann die Schädigung von umliegendem Gewebe durch die Ausschüttung von toxischen Metaboliten durch Immunzellen reduzieren. Frühere Untersuchungen an rEPDC konnten eine endozytotische Aktivität zeigen [146]. Analog wurde in dieser Arbeit das Endozytosepotential von hSC und als Vergleich das Endozytosepotential von MSC untersucht. Phagozytose von apoptotischen Zellen durch MSC konnte bereits in einem Arthritismodell gezeigt werden [318].

Die mikroskopische Analyse des Phagozytosepotentials der hSC zeigte eine effektive Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Nanopartikeln in das Zytosol (s. Abb. 4.19).

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich in Studien zur Endozytose von Nanopartikeln aus ¹⁹F-Perfluorkarbonen (PFC) mittels NMR (s. Abb. 4.20). Die beschriebene Endozytose von Nanopartikeln durch rEPDC [146] konnte somit ebenfalls für hSC gezeigt werden. Insgesamt unterschieden sich hSC in ihrer Endozytose-Kapazität nicht von hMSC, für welche bereits die Phagozytose apoptotischer Zellen beschrieben wurde [318]. Daraus lässt sich folgern, dass hSC zu einer beschleunigten Beseitigung von abgestorbenem Zellmaterial am Vorhof beitragen können.

Wie bereits oben ausgeführt wurden positive Auswirkungen durch parakrine Effekte, wie z. B. eine Modulation der Immunantwort und eine gesteigerte Angiogenese durch stromale Zellen berichtet [126, 397]. Aus diesem Grund wurde die Zytokinsekretion von MSC (Knochenmarksbiopsien) mit derjenigen von hSC verglichen (s. Abb. 4.28).

Hierbei konnte ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen festgestellt werden. So sezernierten im Vergleich zu hSC die hMSC praktisch kein IL-1 β . Die Sekretion von IL-6 durch MSC wurde bereits beschrieben [406, 407], im Vergleich zu hSC zeigte sich dabei jedoch eine signifikante ($P < 0,001$) starke Reduktion der Sekretion von IL-6 (s. Abb. 4.28 **B**). Des Weiteren sezernierten hMSC kein TNF- α ($< 2,5$ pg/ml). Im Gegensatz dazu zeigten hMSC die in der Literatur beschriebene Sekretion von TGF- β [408], ohne dass ein signifikanter Unterschied ($P > 0,05$) zu hSC bestand. Ebenso wie bei EPDC wurde die Sekretion von TGF- β durch MSC mit einer EMT in Verbindung gebracht. Dabei löste jedoch das von den MSC sekretierte TGF- β keine EMT der MSC, sondern der Zellen des umliegenden Gewebes aus [409].

BM-MSC modulieren eine Inflammation durch Hemmung der Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen, durch Reduktion der Aktivität von NK-Zellen sowie durch eine erhöhte Generierung von supprimierenden regulatorischen T-Zellen [410, 411], welche durch Sekretion der antiinflammatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 eine kardioprotektive Wirkung besitzen.

In Bezug auf die Sekretion von TGF- β zeigen die in dieser Arbeit untersuchten hMSC aus Knochenmarkbiopsien und die isolierten hSC eine hohe Übereinstimmung (s. Abb. 4.28 **C**), was bei hSC analog zu den Erkenntnissen bei BM-MSC eine kardioprotektive Wirkung vermuten lässt. Weiterhin können BM-MSC die Apoptose von neutrophilen Granulozyten beeinflussen [412], wodurch vermutlich die Freisetzung von ROS sowie eine sekundäre Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verhindert und eine Gewebeschädigung reduziert werden.

Die die Angiogenese fördernden Zytokine wie VEGF, bFGF, IL-6 [413], IGF [414] und HGF [415] sowie die für die Arteriogenese wichtigen Zytokine MCP-1, Angiopoietin-1 und PDGF [413] wurden bei BM-MSC detektiert. Bemerkenswert ist, dass bei den in dieser Arbeit isolierten hSC nicht nur die Sekretion von VEGF, IL-6 und MCP-1 gemessen wurde (s. Abb. 4.23), sondern auch die entsprechenden Rezeptoren wie EGFR, IGF1R, IGF2R (s. Abb. 4.31) sowie ein funktioneller IL-6R nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 4.24 - 4.25).

Die starke Sekretion von IL-6 unter basalen Bedingungen wird durch die Stimulation mit A_{2A}/A_{2B}-Rezeptoragonisten nicht signifikant verändert, was im Widerspruch zu Experimenten mit rEPDC steht [181]. Die Sekretion von IL-6 kann die Apoptose von Kardiomyozyten

verhindern und die angeborene Immunantwort supprimieren, wodurch die akute Immunantwort beeinflusst wird [184, 416]. Jedoch kommt es bei chronischer Erhöhung von IL-6 zu einer anhaltenden Entzündung sowie einer Fibrose des betroffenen Gewebes [417]. Allerdings entstehen EPDC im Ventrikel erst unmittelbar nach einem Infarkt (Tag 3-4) und wandern danach in das Myokard ein, wo es zur Sekretion von Zytokinen sowie einer Differenzierung der Zellen kommt.

Die Sekretion von Zytokinen durch BM-MSC scheint ebenfalls die Apoptose von Kardiomyozyten zu beeinflussen, wobei vor allem HGF, TGF- β , VEGF, IGF-1 und Sfrp2 von Bedeutung sind [418]. Dabei werden durch Bindung an die Rezeptoren der Zellen Signalwege aktiviert, welche entweder das Überleben der Zellen fördern oder pro-apoptischen Signalwegen entgegenwirken. Die dabei wichtigsten Signalwege mit überlebensfördernden Eigenschaften sind der MAP-Kinase-Weg, der PI3K-Akt-Signalweg sowie die SMAD- und STAT-Signalwege.

In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass bei hSC in Zellkultur eine Aktivierung von STAT3 bei Zugabe von IL-6 und IL-11 erfolgte, wobei sich eine dosisabhängige Aktivierung für beide Interleukine zeigte (s. Abb. 4.18). Tocilizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den IL-6R, welcher in der klinischen Behandlung von chronischen Entzündungen eingesetzt wird [419]. Tocilizumab konnte die Aktivierung von STAT3 durch IL-6 blockieren, was die Aktivierung von STAT3 über den IL-6R bei den hSC beweist (s. Abb. 4.18). Daher könnte die starke Sekretion von IL-6 durch hSC neben parakrinen Effekten zusätzlich autokrin einen positiven Effekt auf das Überleben und die Proliferation der hSC selbst besitzen. Dies könnte insofern eine wichtige Bedeutung haben, als dass die geringe Überlebensdauer von injizierten BM-MSC mit einer Limitierung des regenerativen Potentials einhergeht [420-422].

In Bezug auf die Proliferation und das Wachstum konnte bei hSC gezeigt werden, dass selbst in Anwesenheit von bFGF in der Zellkultur die Proliferation der atrialen hSC vergleichsweise gering ist. Die Verdopplungszeit von 47 ± 6 Stunden ist im Vergleich zu anderen Zelltypen wie MSC aus Ratten (26.7-40.7 h [423]) oder wie bei humanen epithelialen Zellen des Darms (24 h [424]) oder wie bei HeLa-Zellen (16.5 h [425]) deutlich höher.

Eine Verringerung der Proliferation bis zum Erliegen des Zellwachstums (s. Kapitel 4.1.3) ist ein häufig beobachtetes Phänomen primärer Zellen in Zellkultur. Dies wird durch die Hayflick-Grenze erklärt, da Zellen aufgrund der Telomerverkürzung bei Mitose nur eine bestimmte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen können [426].

Um Zellen langfristig in Kultur halten zu können, wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, eine Immortalisierung der Zellen durchzuführen. Hierbei sollte der Prozess der Telomerverkürzung durch Expression von Telomerase gestoppt oder der Zellzyklus durch Expression von CDK4 induziert werden. Da die Gene durch lentivirale Transduktion in die Zellen eingebracht werden, besteht die Gefahr einer Dedifferenzierung der Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte zwar mittels Immortalisierung durch hTERT eine über mehrere Monate stark wachsende Zelllinie (s. Abb. 4.16) aus einer einzelnen Zelle generiert werden, diese zeigte jedoch im Vergleich zu nicht immortalisierten hSC deutliche Unterschiede in ihrem Expressionsverhalten in Bezug auf kardiale Marker (s. Abb. 4.18), während die Expression von mesenchymalen Markern größtenteils konstant blieb (s. Abb. 4.17). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass es sich entweder um eine Dedifferenzierung der Zellen oder bei der immortalisierten Zelle um eine Subpopulation von hSC handelt, welche keine EPDC-spezifischen Marker exprimieren.

5.3 Sekretorisches Potential der hSC

Die Sekretion von parakrinen Faktoren hat in unterschiedlichen Stadien des Herzinfarktes und dessen Regeneration einen entscheidenden Einfluss, wie in den Kapiteln 1.2.1., 1.3.1. und 1.4.3. ausführlich beschrieben ist. Die nach einem Infarkt ausgelöste sterile Entzündung führt initial zur Rekrutierung von Immunzellen und damit zur Beseitigung von abgestorbenen Zellen und des Weiteren auch zur Sekretion von pro- oder antiinflammatorischen Signalmolekülen [97-99]. Therapeutisch wünschenswert ist es, eine überschießende Immunreaktion aufgrund der Schädigung des umliegenden Gewebes durch toxische Moleküle wie ROS und proteolytische Enzyme zu verhindern [100].

5.3.1 Die basale Zytokinsekretion

Bei EPDC aus infarzierten Rattenherzen konnte nachgewiesen werden, dass extrazelluläres ATP und NAD über das Ektoenzym CD73 zu Adenosin abgebaut wird, welches dann über eine Aktivierung von A_{2B}-Rezeptoren zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-11 und VEGF führt [181]. Weiterhin kann aufgrund der Migration der EPDC in das Myokard des Ventrikels nach Infarkt in Kombination mit ihrer Zytokinfreisetzung ein Einfluss auf die Immunantwort angenommen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung zur basalen Sekretion bei hSC zeigt die Freisetzung von IL-6, IL-11, IL-1 β , VEGF, MCP1, TGF- β und TNF- α durch hSC (s. Abb. 4.23), wobei besonders die hohe Menge an ausgeschüttetem IL-6 sowie die mit der Zeit zunehmende Zytokinakkumulation bemerkenswert ist (s. Abb. 4.20.). Die detektierten Zytokine sowie ihre Effekte sollen im Folgenden im Einzelnen diskutiert werden:

Bei IL-6 handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, welches eine kardioprotektive Wirkung besitzt und die Neovaskularisation fördert [184-187, 427, 428]. Dabei erfolgt die kardioprotektive Wirkung sowohl durch die verstärkte Attraktion von Immunzellen während der akuten Phase des Infarktes, durch seine positiven Effekte auf Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum der Zellen als auch durch eine Inhibierung der Apoptose von Kardiomyozyten [189, 429-431].

Seine Wirkung entfaltet IL-6 durch Interaktion mit dem Interleukin-Rezeptor (IL-6R), welcher aus der Liganden bindenden α -Kette (IL-6R α , CD126) sowie dem Signal vermittelnden GP130 (CD130) besteht [432]. Letzterer wird fast ubiquitär auf Zellen exprimiert [433]. Durch die Interaktion von IL-6 mit seinem Rezeptor wird eine Signalkaskade an Transkriptionsfaktoren über Januskinasen und *signal transducers and activators of transcription* (STATs) aktiviert [434, 435]. Neben IL-6 nutzen auch einige weitere Zytokine wie IL-11 oder Cardiotrophin-1 (CTF1) GP130 in ihrem Signalkomplex [436].

Die Sekretion von IL-6 kann durch Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IFN γ ausgelöst werden [437] und induziert die Aktivierung von Akut-Phase-Proteinen [438]. Allerdings muss die Sekretion von IL-6 im späteren Verlauf der Regeneration reduziert werden, da sonst eine chronische Inflammation mit Fibrose entstehen kann [417, 439]. Hierbei konnte im Atrium ein hoher Spiegel an IL-6 mit VHF in Verbindung gebracht werden [440, 441].

Im Ventrikel entstehen EPDC durch EMT erst nach Ischämie und differenzieren nach ihrer Migration ins Myokard, wodurch die Ausschüttung von IL-6 zeitlich begrenzt ist. Es ist anzunehmen, dass analog auch im Atrium im Fall einer atrialen Ischämie atriale EPDC durch Sekretion von IL-6 eine akute kardioprotektive Wirkung haben. Bei chronischen Erkrankungen könnte dies jedoch zu einer Verstärkung von atrialer Fibrose führen.

Diese ambivalente Rolle von IL-6 bei der akuten und chronischen Inflammation ist Gegenstand der Forschung in verschiedenen Krankheitsmodellen. Aufgrund der hohen Sekretion durch hSC (s. Abb. 4.16.) stellte sich die Frage, ob IL-6 auch autokrin auf die hSC wirken kann. Während eine deutliche Expression von mRNA für die α -Untereinheit des IL-11-Rezeptors (IL-11RA) detektiert werden konnte, waren die mRNA-Level von IL-11 und CTF1 sehr gering (s. Abb. 4.17.). Es ist bekannt, dass Kardiomyozyten sowohl IL-11 sekretieren als auch über den IL-11-Rezeptor von IL-11 aktiviert werden, was eine kardioprotektive Wirkung hat [442]. Für hSC konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass diese nicht nur IL-11RA-mRNA exprimieren (s. Abb. 4.17.), sondern auch durch IL-11 funktionell durch Phosphorylierung von STAT3 aktiviert werden können (s. Abb. 4.18.). Die Aktivierung von STAT3 erhöht die Menge an Metallothionein, welches durch die Reduzierung der ROS-Konzentration nach Infarkt eine kardioprotektive Wirkung besitzt [443]. Die Aktivierung von STAT3 bei hSC in Zellkultur konnte bei Zugabe sowohl von IL-6 als auch von IL-11 beobachtet werden, wobei sich eine dosis-abhängige Aktivierung für beide Interleukine zeigte (s. Abb. 4.18.).

IL-11, welches zur IL-6-Zytokinfamilie gehört, nutzt ebenso wie IL-6 GP130 für seinen Rezeptorkomplex [444]. Genauso wie IL-6 induziert es Akut-Phase-Proteine und trägt zu einer erhöhten Inflammation bei. Aus einer therapeutischen Verabreichung von IL-11 resultierte sowohl in einer verringerten Apoptose von Kardiomyozyten als auch in einer erhöhten Kapillardichte im Grenzbereich des Infarktes [445]. Allerdings wurden für IL-11 auch antiinflammatorische Wirkungsmechanismen durch Suppression von IL-1 β und TNF- α gezeigt [446].

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β wird vor allem von Makrophagen und Monozyten, endothelialen und epithelialen Zellen sowie Fibroblasten sekretiert [447-449] und hat ähnlich wie IL-6 einen Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Zellwachstum der Zellen [449]. Dabei wird die Bildung von pro-IL-1 β sowie die Sekretion von IL-1 β als Reaktion auf Stresssignale über Signalprozessierung des Inflammasoms induziert, was wiederum zu einer

erhöhten Expression von IL-6 führt [450]. Bei kardialen Fibroblasten konnte eine Inhibierung der Proliferation durch IL-1 β festgestellt werden [451]. Daher könnte die Ausschüttung von IL-1 β durch hSC (s. Abb. 4.23) eine Fibrose durch Regulation der Anzahl kardialer Fibroblasten verhindern.

Die Aktivierung von GP130/STAT3 durch Zytokine wie IL-6, IL-11 oder IL-1 β führt zu einer Stimulation von VEGF, was eine verbesserte Angiogenese zur Folge hat [188, 452, 453]. Eine gesteigerte Angiogenese trägt zu einer schnelleren Wundheilung bei und ist ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Injektion von EPDC in Infarktareale oder deren Außenbereiche [141].

Es ist bekannt, dass VEGF die Differenzierung verschiedener Zellen wie MSC zu Endothelzellen fördert [208, 454]. Obgleich bei den in dieser Arbeit untersuchten hSC eine Sekretion von VEGF detektiert werden konnte (s. Abb. 4.23), konnte keine Differenzierung der hSC zu Endothelzellen beobachtet werden (s. Abb. 4.7). Die Abwesenheit von CD31 steht im Einklang mit Untersuchungen an EPDC, bei welchen ebenfalls keine Expression von CD31 gefunden wurde [455].

Das antiinflammatorische Zytokin TGF- β wird bei einer Schädigung des Herzens in deutlich erhöhten Mengen freigesetzt [102]. Es wird von Immunzellen ausgeschüttet, vermittelt den Übergang zwischen Proliferations- und Heilungsphase und fördert die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [102, 103]. Ebenso wie bei MSC dient auch bei hSC TGF- β als Regulator für die Differenzierung zu SMC [144, 199]. In Kombination mit VEGF kann damit die Revaskularisierung des Gewebes beeinflusst werden. Darüber hinaus wird TGF- β eine entscheidende Rolle bei der EMT von proepikardialen Zellen zugeschrieben, was möglicherweise die Migration von EPDC in das Infarktareal verstärken kann [197, 456]. Weiterhin stimuliert TGF- β unter mechanischem Stress in Kombination mit bestimmten Matrixproteinen die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten [102, 103]. Andererseits ist eine Hypertrophie der Kardiomyozyten aufgrund der Angiotensin II-vermittelten Expression von TGF- β durch kardiale Fibroblasten beschrieben worden [347]. Angiotensin II entsteht durch enzymatische Spaltung aus Angiotensin I mit Hilfe des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) [457]. Die Expression von ACE konnte in dieser Arbeit bei hSC nachgewiesen werden, was auf eine regulatorische Funktion der hSC bei der Proliferation und Differenzierung der kardialen Fibroblasten hindeutet.

MCP-1 wird nach Infarkt vermehrt gebildet und erhöht die Chemotaxis und Infiltration von Ly6c^{high}-Monozyten, welche sich ihrerseits durch hohe Expression von TNF- α und Matrix-Metalloproteasen auszeichnen [109, 458]. Weiterhin induziert MCP-1 die Proliferation von glatten Muskelzellen und hat einen positiven Einfluss auf die Angiogenese [459]. Ebenfalls scheint MCP-1 positive Effekte auf die Gewebsheilung durch Modulation der Aktivität und des Phänotyps von Fibroblasten zu haben [460].

TNF- α ist an der Akut-Phase-Reaktion beteiligt und wird von verschiedenen Immunzellen, vor allem von Makrophagen, aber auch von Neutrophilen, Eosinophilen oder Mastzellen, gebildet [461, 462]. TNF- α stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und mesenchymalen Zellen und verbessert in geringen Mengen lokal die Phagozytose durch Makrophagen [463]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es durch Freisetzung von TNF- α zu einer erhöhten Expression des A_{2B}R kommt, wodurch in einem positiven *feedback*-Mechanismus die Effekte von Adenosin verstärkt werden [464]. Zusätzlich stimuliert TNF- α die Expression verschiedener Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TGF- β [465].

Bei kongestiver Herzinsuffizienz (CHF) wurden sowohl erhöhte Level von TNF- α als auch von IL-1 β und IL-6 gefunden [466]. Im Gegensatz zu IL-6 und IL-1 β konnte jedoch wenig bis keine TNF- α -Sekretion bei hSC beobachtet werden. Möglicherweise lässt sich dies durch die auf den hSC vorhandene CD73 erklären. Das durch die CD73 gebildete Adenosin wirkt über A₂-Rezeptoren hemmend auf die Expression von TNF- α [467]. Des Weiteren fungiert IL-6 als negativer *feedback*-Regulator für TNF- α [468], was bei der hohen Sekretion von IL-6 durch hSC zu einer starken Inhibierung der TNF- α -Expression führen könnte.

5.3.2 Die Adenosin vermittelte Sekretion von Zytokinen

Die Regulation der Zytokinsekretion durch Purin-Verbindungen könnte einen Einfluss auf die Regeneration nach Infarkt haben [218]. Das Nukleosid Adenosin wird hierbei extrazellulär durch eine Reihe von Ektoenzymen aus ATP und NAD gebildet. Während Nukleotide P2-Rezeptoren aktivieren, wodurch vor allem proinflammatorische Signalkaskaden ausgelöst werden, bindet Adenosin an P1-Rezeptoren, was je nach Rezeptorsubtyp entzündungshemmende oder -fördernde Signale zur Folge hat [276-280].

Kultivierte EPDC aus infarzierten Rattenherzen bauen extrazelluläres ATP und NAD, insbesondere durch die Aktivität von CD73, rasch zu Adenosin ab [181]. Dabei aktiviert das Adenosin vorzugsweise A_{2B}-Rezeptoren. Dies bewirkt einerseits die Freisetzung von weiteren intrazellulärem ATP und NAD, wodurch sowohl ein positiver *feedback*-Mechanismus, als auch eine Zytokinausschüttung, vor allem von IL-6, IL-10 und VEGF, erzeugt wird [181]. Analysen des extrazellulären Purinmetabolismus von rEPDC konnten zeigen, dass es sich bei CD73 um ein Schlüsselenzym bei der Generierung von extrazellulärem Adenosin handelt [181]. CD73 ist außerdem ein bekannter Marker für multipotente mesenchymale Zellen [469] und wurde auch bei hSC stark exprimiert gefunden (s. Abb. 4.3). Des Weiteren wurde die Expression von mRNA für den A_{2B}-Rezeptor (s. Abb. 4.26) und den A_{2A}-Rezeptor entdeckt (s. Abb. 4.26). Im Unterschied zu den Ergebnissen bei rEPDC liegt die Expression des A_{2B}-Rezeptors jedoch deutlich niedriger.

Im Unterschied zu den Ergebnissen bei rEPDC [181] zeigte eine Stimulation der hSC mit gleichen Konzentrationen des A_{2A}-Rezeptoragonisten CGS 21680 oder des A_{2B}-Rezeptoragonisten BAY 60-6583 keinen signifikanten Einfluss auf die Zytokinfreisetzung (s. Abb. 4.27). Um auszuschließen, dass die Konzentrationen von eingesetztem BAY 60-6583 oder CGS 21680 für die Aktivierung zu gering waren, wurden auch höhere Konzentrationen von BAY 60-6583 oder CGS 21680 eingesetzt. Außerdem wurden die hSC mit dem nicht-selektiven A_{2A}/A_{2B}-Rezeptoragonist 5'-N-ethylcarboxamidoadenosin (NECA)[470] stimuliert. Bei erhöhter Agonistenkonzentration konnte bei BAY 60-6583 eine gesteigerte Sekretion von IL-6, IL-11 und IL-1 β beobachtet werden (s. Abb. 4.29). Diese Ergebnisse könnten jedoch aufgrund der hohen Agonistenkonzentrationen auch durch unspezifische *off-target*-Effekte bedingt sein.

Die Aktivierung des A_{2B}-Rezeptors führt zur Sekretion des Angiogenese fördernden Zytokins VEGF [133], welches unter dem Einfluss von Adenosin steht [181, 471, 472]. Für hSC konnte im Unterschied zu rEPDC erst bei hohen Konzentrationen von BAY 60-6583 ein signifikanter Anstieg der Expression von VEGF detektiert werden (s. Abb. 4.29). Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass unter gleichen Versuchsbedingungen die basale Sekretion von VEGF und IL-6 bei hSC bereits höher als die stimulierte Sekretion dieser Zytokine bei rEPDC war. Es kann daher vermutet werden, dass sich die hSC bereits in einem stimulierten Zustand befanden und daher nur eine geringe Reaktion auf zusätzliche Stimulationen durch A_{2A}/A_{2B}-Rezeptoragonisten zeigten.

Für EPDC wird aufgrund ihrer Migration in das Myokard ein Einfluss der Zytokinsekretion im Infarktbereich vermutet. Da EPDC des Ventrikels erst durch eine Gewebsschädigung entstehen, liegt die Vermutung nahe, dass bei der initialen Aktivierung der EPDC auch extrazelluläres ATP von apoptotischen oder nekrotischen Zellen beteiligt ist. Im Atrium ist über eine derartige Aktivierung nichts beschrieben. Über die Mechanismen der Nukleotid-Freisetzung aus atrialen Zellen ist nur wenig bekannt (s. Kapitel 4.2). Analog zu den EPDC des Ventrikels könnte eine atriale Ischämie oder eine Gewebsschädigung durch Kathetherablation zu einer Aktivierung von atrialen EPDC führen. Bei länger anhaltenden VHF könnte ein gesteigerter Druck im Atrium [385] einen Auslöser für EMT darstellen. Mechanischer Stress konnte bereits als Auslöser für EMT bei Epithelzellen identifiziert werden [473].

5.4 Differenzierungspotential von hSC

Das Repertoire der Oberflächenproteinen einer Zelle gibt sowohl Auskunft über ihre Funktion als auch über ihren Differenzierungszustand und ihre Gewebezugehörigkeit. Beispielsweise wird bei fortschreitender Differenzierung einer Zelle die Expression embryonaler Marker oder Stammzellmarker eingestellt, jedoch die Expression von gewebespezifischen Markern erhöht. Mithilfe einer Analyse des Oberflächenproteoms können daher sowohl funktionelle Eigenschaften einer Zellpopulation ermittelt als auch eine Aussage über das Differenzierungspotential der Zelle getroffen werden.

5.4.1 Markeranalyse der hSC

Während in verschiedensten Publikationen eine mögliche Differenzierung zu glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Myofibroblasten gezeigt werden konnte, ist die Differenzierung von ventrikulären EPDC zu Kardiomyozyten umstritten [7, 137, 139, 142, 144] [145].

Bei der Analyse der hSC konnten die in der Literatur für EPDC beschriebenen Marker WT1 und Tbx18 sowohl auf mRNA-Ebene mittels qPCR als auch auf Proteinebene anhand von Immunfluoreszenzanalyse eindeutig identifiziert werden, wobei als Grundlage die Protokolle zur Analyse von Ratten-EPDC dienten [139, 146]. Weiterhin zeigten die hSC bei der Analyse

mittels Durchflusszytometrie die Expression der mesenchymalen Stamm- bzw. Progenitorzellmarker CD73 (> 90 %) und CD90 (~ 60 %), welche in der Literatur bei reaktivierten EPDC bekannt sind [142, 144, 146].

Zellen mit einer starken Expression von CD73 – und damit einer CD73-vermittelten Adenosinbildung – führt zu einer deutlichen Hemmung der Entzündung, wie in Kapitel 1.4.1 dieser Arbeit im Detail beschrieben ist. Neuere Erkenntnisse zeigen weiterhin einen Einfluss von CD73 auf die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-11 und VEGF [181].

Von wichtiger Bedeutung für das regenerative Potential der hSC und EPDC ist die Expression kardialer Markergene und Markerenzyme. Bei BM-MSK oder iPSC fehlt diese kardiale Zugehörigkeit, was das Risiko einer Differenzierung in ungewollte Zelltypen wie Adipozyten, Osteoblasten oder hematopoetische Zellen birgt [398, 474, 475]. So ist die Expression kardialer Marker und die daraus resultierende kardiale Zugehörigkeit ein wichtiges Kriterium für die zukünftige Verwendbarkeit von hSC und EPDC bei der Regeneration des Herzens.

Im Gegensatz zu MSC zeigten die hSC die Expression des frühen kardialen Markers GATA4 sowie des späten kardialen Markers kardiales Troponin T (cTnT) auf mRNA-Ebene (s. Abb. 4.4) und Proteinebene (s. Abb. 4.5), wobei cTnT nur bei wenigen Zellen auf Proteinebene gefunden werden konnte. Da ebenfalls die Expression der Stamm- bzw. Progenitorzellmarker CD105, CD44 und c-Kit bei einem Teil der Zellen gefunden wurde, lässt dies vermuten, dass es sich bei hSC um einen Zelltyp handelt, der sich in einem frühen Stadium der kardialen Differenzierung befindet.

Die Anwesenheit des für Kardiomyozyten typische cTnT lässt eine mögliche Differenzierung der Zellen zu Kardiomyozyten vermuten. Im Gegensatz dazu konnte keine Expression des Endothelmarkers CD31 auf Proteinebene beobachtet werden (s. Abb. 4.3 und Abb. 4.5), was eine Differenzierung der hSC zu Endothelzellen ohne einen zusätzlichen Auslöser unwahrscheinlich macht. Dies ist bereits für EPDC bekannt [133, 199], welche ebenfalls nicht ohne zusätzliche Wachstumsfaktoren zu Endothelzellen differenzieren.

Ein Wachstumsfaktor, der einen Einfluss auf die Differenzierung zu Endothelzellen hat, ist VEGF [14]. Insbesondere da hSC auch die VEGF-Rezeptoren Neuropilin 1 (NRP1) und VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor*, KDR, Flk1) exprimieren (s. Abb. 4.31), liegt die Vermutung nahe, dass VEGF eine Differenzierung zu Endothelzellen auch bei hSC bewirken kann. Dass die hSC in Zellkultur nicht spontan zu Endothelzellen differenzieren, könnte an der Expression von TGF- β liegen.

Dieser Wachstumsfaktor wird ebenfalls von hSC sekretiert (s. Abb. 4.23) und ist dafür bekannt, EMT bei EPDC zu stimulieren [197, 198] und die Differenzierung von EPDC zu Zellen der glatten Muskulatur zu fördern [144, 199]. Diesbezüglich wurde festgestellt, dass das als Marker für EMT und glatte Muskulatur verwendete α -SMA sowohl auf mRNA-Ebene (s. Abb. 4.4) als auch von ~ 40 % der hSC auf Proteinebene (s. Abb. 4.5) exprimiert wird. Möglicherweise akkumuliert daher bei den hSC in Zellkultur das sekretierte TGF- β die Wirkung von VEGF und verhindert die Differenzierung zu Endothelzellen.

Die Daten der Immunfluoreszenz deuten darauf hin, dass ein Teil der Zellen eine teilweise Differenzierung hin zu Myofibroblasten durchgemacht hat. Eine Differenzierung von EPDC zu Zellen der glatten Muskulatur ist in der Literatur gut beschrieben, wobei die vorliegende Differenzierung der hSC ähnlich wie bei EPDC [199] möglicherweise durch autokrine Sekretion von TGF- β verursacht wird. Interessant ist dabei jedoch, dass die Differenzierung der EPDC zu SMC mit fortschreitender Zeit in Kultur nicht signifikant voranschreitet (s. Abb. 4.9). Wie bereits oben beschrieben, besitzen die hSC spezifische Marker wie WT1 und Tbx18, welche in der Literatur für die Identifizierung von EPDC genutzt werden [30, 139, 149, 150].

Über eine Oberflächenproteomanalyse wurden hSC mit rEPDC verglichen. Dabei wurden Oberflächenproteine identifiziert, welche eine Rolle bei der Differenzierung zu kardialen Zellen spielen und für zukünftige Analysen von Bedeutung sein können. Für die Analyse wurden extrazelluläre Proteindomänen biotinyliert und die Proteine selektiv isoliert. Erhaltene Proteine wurden mittels Flüssigkeitschromatografie und gekoppelter Massenspektrometrie mit Nano-Elektrospray-Ionisation (ESI) getrennt und die detektierten Peptidfragmente mit Datenbanken abgeglichen, wie in Kapitel 3.15 dieser Arbeit im Detail erläutert ist.

Ein Vergleich von hSC mit rEPDC zeigte eine große Übereinstimmung der Proteine zwischen den Spezies. So konnte zunächst dargestellt werden, dass zwischen den 239 identifizierten Proteinen bei hSC und den 396 identifizierten Proteinen bei rEPDC insgesamt 149 übereinstimmen (s. Abb. 4.24 A). Die geringere Anzahl an identifizierten Proteinen bei hSC kann dadurch erklärt werden, dass für eine positive Identifizierung eines Proteins mindestens zwei der drei analysierten Proben dieses Protein nachweislich enthalten mussten.

Im Vergleich zu rEPDC zeigte sich für hSC eine deutlich höhere Anzahl an Proteinen, welche lediglich in einer der drei Proben enthalten war und daher nicht als positive Identifizierung definiert werden konnte. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass bei den rEPDC die Tiere

aufgrund ihrer Herkunft aus einem Auszuchtstamm (Wistar) genetisch deutlich ähnlicher sind als dies bei den Spendern der humanen Biopsien der Fall ist.

Die 149 der bei beiden Spezies vorkommenden Proteine wurden aufgrund ihrer Funktionalität in verschiedene Gruppen und Untergruppen eingeteilt (s. Abb. 4.24 **B+C**). Die einzelnen identifizierten Proteine wurden dann über ihre bekannte Funktionalität oder ihre Assoziation mit pathologischen Prozessen in einem KEGG-Diagramm dargestellt (s. Abb. 5.1).

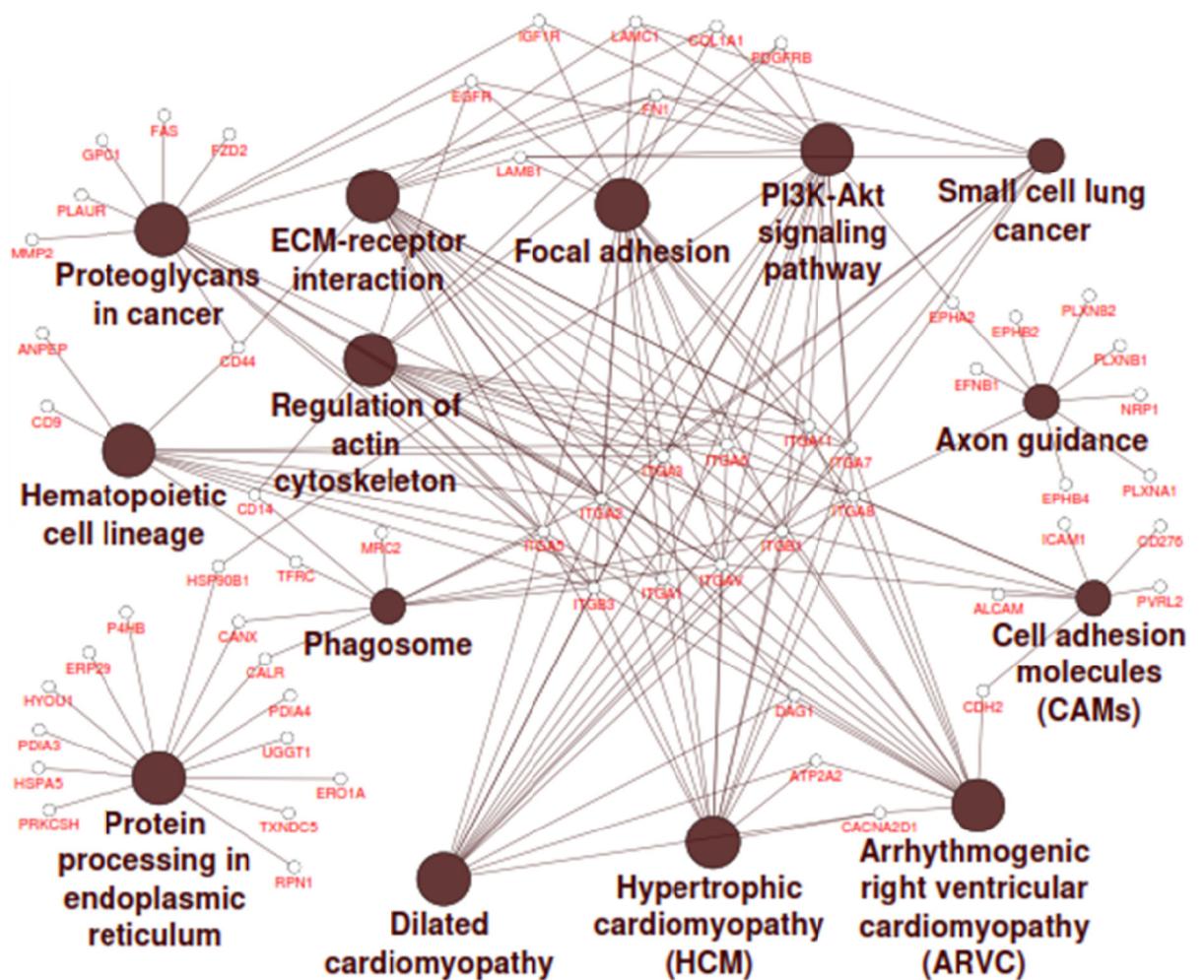


Abb. 5.1: Cluster-Darstellung der Signalwege ausgewählter identifizierter Oberflächenproteinen von hSC und rEPDC

Die bei hSC und rEPDC gefundenen Oberflächenproteine (kleine weiße Kreise) wurden mittels ClueGo analysiert und signifikant ($P < 0,01$) angereicherten KEGG-Interaktionswegen (braune Kreise) zugeordnet. Kleine Kreise entsprechen dabei Ontologien mit < 11 , große Kreise bedeuten Ontologien mit ≥ 11 assoziierten Proteinen.

5.4.2 Mögliche funktionelle Bedeutung ausgewählter Oberflächenproteine

Von den bei der Oberflächenproteomanalyse identifizierten Proteinen sollen die Funktion und die möglicherweise resultierenden Einflüsse auf das kardioregenerative Potential der Zellen an ausgewählten Proteinen im Folgenden exemplarisch erläutert werden.

Neuropilin 1 (NRP1) dient als Rezeptor für verschiedene Semaphorine und VEGF [476]. Es hat als Korezeptor für VEGF eine Bedeutung für die Angiogenese und die Neovaskularisation, wobei es ebenfalls eine Rolle bei der Tumorentwicklung spielt [477, 478]. Während der Embryonalentwicklung des Herzens und des Nervensystems sind Signale durch Interaktion von VEGF und NRP1 notwendig für die Angiogenese [476].

Die Expression von NRP1 könnte auf endotheliale Eigenschaften von hSC und rEPDC hinweisen, da NRP1 ansonsten vor allem auf Endothelzellen nachgewiesen wurde [477]. Eine mögliche Interaktion mit durch die hSC und rEPDC sekretiertem VEGF könnte dabei einen vielversprechenden zukünftigen Forschungsaspekt darstellen. Interessant dabei ist auch, dass neben NRP1 auch der VEGF-Rezeptor VEGFR-2 (*kinase insert domain receptor*, KDR, Flk1) gefunden wurde [146].

Der Nachweis der Expression des homing cell adhesion molecule (HCAM, CD44) steht z. T. im Widerspruch zu den durchflusszytometrischen Daten der Charakterisierung, bei welcher die Expression von CD44 bei hSC nur bei wenigen Zellen gezeigt werden konnte (s. Abb. 4.3.A). Zum einen macht die Oberflächenproteomanalyse keine Aussage zur Menge des isolierten Proteins, zum anderen konnten mit dem bei der Durchflusszytometrie verwendeten Antikörper auch bei hMSC nur eine geringe Anzahl positiver Zellen ermittelt werden, was im Widerspruch zur Literatur steht [479, 480]. Daher besteht die Möglichkeit, dass die Bindungsstärke des Antikörpers bei der durchflusszytometrischen Untersuchung gering und der tatsächliche Anteil an CD44-positiven hSC deutlich höher war.

Als Teil des Rezeptors für TGF- β besitzt Endoglin (CD105) eine entscheidende Rolle bei durch TGF- β ausgelösten Prozessen wie Angiogenese und EMT sowie der Embryonalentwicklung des Herzens [51]. Dabei konnte Endoglin sowohl auf endothelialen Zellen als auch auf Fibroblasten gefunden werden [481].

Die durch TGF- β /NRP1 aktivierten Signalwege sind an Mechanismen wie kardialer Fibrose beteiligt, weshalb sie einen wichtigen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen [482].

Ebenso wie bei CD44 wurde auch die Expression von CD105 bei der Oberflächenproteinanalyse gefunden, konnte jedoch bei der durchflusszytometrischen Analyse der hSC nur bei wenigen Zellen detektiert werden. Da bei der durchflusszytometrischen Untersuchung CD105 ebenso wie CD44 für hMSC nur wenige positive Zellen aufzeigte und die Expression von CD105 als Kriterium für MSC gilt [479, 480], ist dies ebenso wie bei CD44 ein Hinweis darauf, dass tatsächlich mehr als der detektierte Anteil an Zellen eine CD105-Expression besitzen.

Die Expression der vier Ephrinrezeptoren *Ephrin type-A receptor 2* (EphA2), *Ephrin type-A receptor 4* (EphA4), *Ephrin type-B receptor 2* (EphB2) und *Ephrin type-B receptor 4* (EphB4) wurde bei der Oberflächenproteomanalyse nachgewiesen. Für letztere Rezeptoren konnte eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese während der Embryonalentwicklung identifiziert werden [483-485]. Ebenfalls wurde für EphA2 eine Beteiligung bei der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen nachgewiesen [486].

Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind vor allem für den Abbau von extrazellulärer Matrix (ECM) verantwortlich und haben ebenfalls einen Einfluss auf Migration, Differenzierung und Proliferation von Zellen. Der Abbau von ECM erfolgt durch katalytische Spaltung von Proteinen wie Kollagen, Fibronectin und Laminin über eine Zink-Bindungsstelle. Dies geschieht sowohl für die Homeostase im Normalzustand, insbesondere jedoch bei *remodeling*-Prozessen des Gewebes. Die MMP14 sowie das *matrix-remodeling-associated protein 5* (MXRA5) und *matrix-remodeling-associated protein 8* (MXRA8) wurden bei der Oberflächenproteomanalyse bei rEPDC und hSC gefunden. Dies ist insofern interessant, als dass für MMP14 bereits eine Interaktion mit CD44 beschrieben wurde, welche eine verbesserte Migration von vaskulären SMC zur Folge hatte [487]. Eine durch TGF- β induzierte Expression von MXRA5 konnte als antiinflammatorisch und antifibrotisch bei chronischer Nierenerkrankung identifiziert werden [488]. Über MXRA8 ist vergleichsweise wenig bekannt, jedoch konnte seine verstärkte Expression in VEGF-C-behandelten Kardiomyozyten nach Infarkt beobachtet werden, was auf einen Einfluss beim Überleben der Zellen hindeutet [489]. Insgesamt zeigt die Expression von MMP eine Beteiligung der hSC und rEPDC bei Remodeling-Prozessen durch den Abbau von ECM.

Der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) kann zusätzlich zu EGF auch durch TGF- α aktiviert werden und reguliert durch Signaltransduktion über (ERK)/MAPK, PI3K/Akt und JNK Proliferation, Überleben, Differenzierung und Migration von Zellen sowie inflammatorische Prozesse und die Matrix-Homeostase [490]. Dabei konnte EGFR als notwendig für eine korrekte Embryonalentwicklung des Herzens identifiziert werden [491].

Ebenso wie EGFR ist der platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) an der Regulation von Proliferation, Überleben und Differenzierung von Zellen beteiligt, wobei die beiden Subtypen PDGFR α und PDGFR β unterschieden werden [492, 493]. PDGFR α , der ein wichtiger Faktor für die Organogenese und die Entwicklung von spezialisierten mesenchymalen Zellen ist, konnte bereits bei rEPDC identifiziert werden [146, 494]. Für PDGFR β konnte bei Expression auf Kardiomyozyten ein positiver Effekt bei der stressinduzierten kardialen Angiogenese festgestellt werden [495].

Transmembranproteine der neurogenic locus notch homolog protein (Notch)-Familie sind an einer Reihe von wichtigen Prozessen der Embryogenese, wie beispielsweise der Entwicklung des Gefäßsystems oder der Ausbildung der Körperachsen, beteiligt [496, 497]. Von den vier bekannten Notch-Rezeptoren konnte Notch2 bei rEPDC und hSC gefunden werden. Dieses wurde als wichtig für die Proliferation von SMC während der Herzentwicklung identifiziert, wobei Mutationen von Notch2 schwerwiegende Krankheiten verursachen können [498, 499]. In Bezug auf die Differenzierung zu SMC konnte für Notch-Signalwege eine Interaktion mit dem TGF- β -Signalweg nachgewiesen werden, wodurch sie einen wesentlichen Beitrag bei der Differenzierung von SMC aus Stammzellen leisten [500].

5.5 Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die untersuchten hSC weitestgehend mit den in der Literatur als CStC [333], CASCs [402] oder atriale EPDC [136, 144, 198, 403-405] bezeichneten Zellen übereinstimmen, was auf einen gemeinsamen Zelltyp hindeutet.

Weiterhin zeigte sich aufgrund der übereinstimmenden identifizierten Proteine bei der Oberflächenproteomanalyse ein ähnlicher molekularer Phänotyp, wodurch ein gemeinsamer, spezieübergreifender, entwicklungsbiologischer Ursprung von hSC und ventrikulären EPDC vermutet werden kann.

Mit der Analyse des Oberflächenproteoms wurde eine Vielzahl von Proteinen identifiziert, die in Proliferation, Zellüberleben, Differenzierung und Migration involviert sind. Vor allem die Angiogenese und die Bildung von SMC sind wichtige Faktoren der Wundheilung nach Infarkt. Eine Angiogenese und positive Einflüsse auf Remodeling-Prozesse sowie eine Regulation der Immunantwort haben positive Auswirkungen bei pathologischen Prozessen des Atriums. Es ist besonders herauszustellen, dass einige der identifizierten Proteine bisher vor allem auf Immunzellen oder kardialen Fibroblasten oder Kardiomyozyten nachgewiesen wurden.

Die Identifizierung von frühen und späten kardialen Markern bei hSC deutet darauf hin, dass diese Zellen ihre embryonale Signatur behalten haben und befähigt sind, an reparativen kardialen Mechanismen bei adäquater Stimulation mitzuwirken. In Kombination mit der Identifikation von verschiedenen Oberflächenrezeptoren ergeben sich interessante Ansatzpunkte für die zukünftige Erforschung der Bedeutung dieser multipotenten Zellen bei verschiedenen kardialen und pathologischen Prozessen.

6 Literaturverzeichnis

1. Manasek FJ. Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium. *J Embryol Exp Morphol* 1969;22:333-48.
2. Ho E, Shimada Y. Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 1978;66:579-85.
3. Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec* 1981;201:157-68.
4. Hiruma T, Hirakow R. Epicardial formation in embryonic chick heart: computer-aided reconstruction, scanning, and transmission electron microscopic studies. *Am J Anat* 1989;184:129-38.
5. Creazzo TL, Godt RE, Leatherbury L, Conway SJ, Kirby ML. Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 1998;60:267-86.
6. Hyer J, Johansen M, Prasad A, et al. Induction of Purkinje fiber differentiation by coronary arterialization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13214-8.
7. Gittenberger-de Groot AC, Winter EM, Bartelings MM, Goumans MJ, DeRuiter MC, Poelmann RE. The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation* 2012;84:41-53.
8. Viragh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kalman F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl)* 1993;188:381-93.
9. Manner J, Perez-Pomares JM, Macias D, Munoz-Chapuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 2001;169:89-103.
10. Nahirney PC, Mikawa T, Fischman DA. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn* 2003;227:511-23.
11. Schlueter J, Brand T. Origin and fates of the proepicardium., *Aswan Heart Centre Science & Practice Series: Vol. 2011 2, 11 Edn* 2011.
12. Pombal MA, Carmona R, Megias M, Ruiz A, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Epicardial development in lamprey supports an evolutionary origin of the vertebrate epicardium from an ancestral pronephric external glomerulus. *Evol Dev* 2008;10:210-6.
13. Mahtab EA, Wijffels MC, Van den Akker NM, et al. Cardiac malformations and myocardial abnormalities in podoplanin knockout mouse embryos: Correlation with abnormal epicardial development. *Dev Dyn* 2008;237:847-57.
14. Perez-Pomares JM, Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Munoz-Chapuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 2002;46:1005-13.
15. Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Wessels A. Epicardial-like cells on the distal arterial end of the cardiac outflow tract do not derive from the proepicardium but are derivatives of the cephalic pericardium. *Dev Dyn* 2003;227:56-68.

16. Redkar A, Montgomery M, Litvin J. Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development* 2001;128:2269-79.
17. Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH, van den Hoff MJ. The heart-forming fields: one or multiple? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2007;362:1257-65.
18. Saga Y, Kitajima S, Miyagawa-Tomita S. *Mesp1* expression is the earliest sign of cardiovascular development. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10:345-52.
19. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008;454:109-13.
20. Kruithof BP, van WB, Somi S, et al. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol* 2006;295:507-22.
21. Rodgers LS, Lalani S, Runyan RB, Camenisch TD. Differential growth and multicellular villi direct proepicardial translocation to the developing mouse heart. *Dev Dyn* 2008;237:145-52.
22. Komiyama M, Ito K, Shimada Y. Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* 1987;176:183-9.
23. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res* 1998;82:1043-52.
24. Lie-Venema H, Van den Akker NM, Bax NA, et al. Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development. *ScientificWorldJournal* 2007;7:1777-98.
25. Manner J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* 1999;255:212-26.
26. Morabito CJ, Dettman RW, Kattan J, Collier JM, Bristow J. Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol* 2001;234:204-15.
27. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 2010;225:631-7.
28. Perez-Pomares JM, de la Pompa JL. Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circ Res* 2011;109:1429-42.
29. Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;276:43-57.
30. Schlueter J, Manner J, Brand T. BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol* 2006;295:546-58.
31. Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:9504-8.
32. Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 1996;174:221-32.

33. Dettman RW, Denetclaw W, Jr., Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 1998;193:169-81.
34. Perez-Pomares JM, Macias D, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Immunolocalization of the vascular endothelial growth factor receptor-2 in the subepicardial mesenchyme of hamster embryos: identification of the coronary vessel precursors. *Histochem J* 1998;30:627-34.
35. Li WE, Waldo K, Linask KL, et al. An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery development. *Development* 2002;129:2031-42.
36. Kikuchi K, Holdway JE, Major RJ, et al. Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Dev Cell* 2011;20:397-404.
37. Brade T, Kumar S, Cunningham TJ, et al. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2. *Development* 2011;138:139-48.
38. Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Bergwerff M, Mentink MM, Poelmann RE. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. *Circ Res* 2000;87:969-71.
39. Bax NA, Bleyl SB, Gallini R, et al. Cardiac malformations in Pdgfralpha mutant embryos are associated with increased expression of WT1 and Nkx2.5 in the second heart field. *Dev Dyn* 2010;239:2307-17.
40. Pennisi DJ, Ballard VL, Mikawa T. Epicardium is required for the full rate of myocyte proliferation and levels of expression of myocyte mitogenic factors FGF2 and its receptor, FGFR-1, but not for transmural myocardial patterning in the embryonic chick heart. *Dev Dyn* 2003;228:161-72.
41. Lavine KJ, Yu K, White AC, et al. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* 2005;8:85-95.
42. Mellgren AM, Smith CL, Olsen GS, et al. Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ Res* 2008;103:1393-401.
43. von GA, Zhou B, Honor LB, Ma Q, Petryk A, Pu WT. WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through beta-catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev Biol* 2011;356:421-31.
44. Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Peault BM, Huysmans HA. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol (Berl)* 1989;180:437-41.
45. Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Bokenkamp R, Hogers B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 1993;73:559-68.
46. Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Poelmann RE. Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol (Berl)* 1999;199:367-78.

47. Van den Akker NM, Winkel LC, Nisancioglu MH, et al. PDGF-B signaling is important for murine cardiac development: its role in developing atrioventricular valves, coronaries, and cardiac innervation. *Dev Dyn* 2008;237:494-503.
48. Del MG, Casanova JC, Guadix JA, et al. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res* 2011;108:824-36.
49. Mikawa T. Retroviral targeting of FGF and FGFR in cardiomyocytes and coronary vascular cells during heart development. *Ann N Y Acad Sci* 1995;752:506-16.
50. Mima T, Ueno H, Fischman DA, Williams LT, Mikawa T. Fibroblast growth factor receptor is required for in vivo cardiac myocyte proliferation at early embryonic stages of heart development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:467-71.
51. Chen T, Chang TC, Kang JO, et al. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol* 2002;250:198-207.
52. Merki E, Zamora M, Raya A, et al. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:18455-60.
53. Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, et al. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics* 2004;18:129-40.
54. Klinke R., Bauman R., Gay R., Rothenburger A. *Physiologie.*, 6. Auflage Edn Thieme, 2010.
55. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third universal definition of myocardial infarction. *Glob Heart* 2012;7:275-95.
56. Meier P, Schirmer SH, Lansky AJ, Timmis A, Pitt B, Seiler C. The collateral circulation of the heart. *BMC Med* 2013;11:143.
57. Statistisches Bundesamt. *Gesundheit - Krankheitskosten.* Wiesbaden. 2010.
58. Statistisches Bundesamt. *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2010.* pp. 1. Wiesbaden. 2011.
59. World Health Organisation (WHO). *Fact Sheet No 310: The top 10 causes of death.* 2013.
60. Boateng S, Sanborn T. Acute myocardial infarction. *Dis Mon* 2013;59:83-96.
61. Welch TD, Yang EH, Reeder GS, Gersh BJ. Modern management of acute myocardial infarction. *Curr Probl Cardiol* 2012;37:237-310.
62. Lopez-Sendon J, Lopez dS. *Acute Heart Failure in the Setting of Acute Coronary Syndromes.* Acute Heart Failure Springer Verlag, 2008.
63. Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, et al. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1446-53.
64. Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2008;118:2057-62.
65. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res* 2009;81:474-81.

66. Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:361-9.
67. Katz LA, Swain JA, Portman MA, Balaban RS. Relation between phosphate metabolites and oxygen consumption of heart in vivo. *Am J Physiol* 1989;256:H265-H274.
68. Scheuer J. Myocardial metabolism in cardiac hypoxia. *Am J Cardiol* 1967;19:385-92.
69. Braasch W, Gudbjarnason S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. *Circ Res* 1968;23:429-38.
70. Kubler W, Spieckermann PG. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1970;1:351-77.
71. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE. Total ischemia in dog hearts, in vitro. 1. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs. severe ischemia in vivo. *Circ Res* 1981;49:892-900.
72. Mochizuki S, Neely JR. Control of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1979;11:221-36.
73. Rovetto MJ, Lamberton WF, Neely JR. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res* 1975;37:742-51.
74. Jennings RB, Reimer KA. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1981;102:241-55.
75. Smith GL, Donoso P, Bauer CJ, Eisner DA. Relationship between intracellular pH and metabolite concentrations during metabolic inhibition in isolated ferret heart. *J Physiol* 1993;472:11-22.
76. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991;68:1250-8.
77. Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London RE, Cala PM. Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol* 1990;259:C940-C948.
78. Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Inserte J, Rodriguez-Sinovas A, Piper HM. Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc Res* 2012;94:168-80.
79. Singh RB, Chohan PK, Dhalla NS, Netticadan T. The sarcoplasmic reticulum proteins are targets for calpain action in the ischemic-reperfused heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:101-10.
80. Trumbeckaite S, Neuhof C, Zierz S, Gellerich FN. Calpain inhibitor (BSF 409425) diminishes ischemia/reperfusion-induced damage of rabbit heart mitochondria. *Biochem Pharmacol* 2003;65:911-6.
81. Tsuji T, Ohga Y, Yoshikawa Y, et al. Rat cardiac contractile dysfunction induced by Ca²⁺ overload: possible link to the proteolysis of alpha-fodrin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H1286-H1294.
82. Yoshida K, Yamasaki Y, Kawashima S. Calpain activity alters in rat myocardial subfractions after ischemia or reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182:215-20.

83. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-94.
84. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest* 2013;123:92-100.
85. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther* 2012;133:230-55.
86. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2009;104:181-8.
87. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010;72:19-44.
88. Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 2001;6:279-90.
89. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-56.
90. Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-8.
91. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10:826-37.
92. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011;35:445-55.
93. Mann DL. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. *Circ Res* 2011;108:1133-45.
94. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012;94:276-83.
95. Sen CK, Packer L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-20.
96. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2011;123:594-604.
97. Takahashi M. Role of the inflammasome in myocardial infarction. *Trends Cardiovasc Med* 2011;21:37-41.
98. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, et al. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001;103:2181-7.
99. Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res* 2008;58:88-111.
100. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004;61:481-97.

101. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, et al. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *J Immunol* 2000;165:2798-808.
102. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-beta signaling in cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2011;51:600-6.
103. Chen W, Frangogiannis NG. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim Biophys Acta* 2013;1833:945-53.
104. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001;12:2730-41.
105. Daskalopoulos EP, Janssen BJ, Blankesteyn WM. Myofibroblasts in the infarct area: concepts and challenges. *Microsc Microanal* 2012;18:35-49.
106. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol* 1995;147:325-38.
107. Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 1989;13:1637-52.
108. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res* 2000;48:89-100.
109. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007;204:3037-47.
110. van der Laan AM, Piek JJ, van RN. Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat Rev Cardiol* 2009;6:515-23.
111. Lambert JM, Lopez EF, Lindsey ML. Macrophage roles following myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2008;130:147-58.
112. Zhao T, Zhao W, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction. *Microvasc Res* 2010;80:188-94.
113. Zhao W, Lu L, Chen SS, Sun Y. Temporal and spatial characteristics of apoptosis in the infarcted rat heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:605-11.
114. Lerman RH, Apstein CS, Kagan HM, et al. Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ Res* 1983;53:378-88.
115. Holmes JW, Borg TK, Covell JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:223-53.
116. Koshy SK, Reddy HK, Shukla HH. Collagen cross-linking: new dimension to cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2003;57:594-8.
117. Sun Y, Weber KT. Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res* 2000;46:250-6.
118. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002;298:2188-90.
119. Smits AM, van VP, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevendans PA. The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med* 2005;9:25-36.

120. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009;324:98-102.
121. Kajstura J, Urbanek K, Perl S, et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res* 2010;107:305-15.
122. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 2009;113:155-60.
123. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2012;126:551-68.
124. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195-201.
125. Song K, Nam YJ, Luo X, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature* 2012;485:599-604.
126. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-5.
127. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2277-86.
128. Liu X, Dauwe D, Patel A, Janssens S. Role of stem and progenitor cells in postmyocardial infarction patients. *Minerva Cardioangiol* 2009;57:219-31.
129. Reffelmann T, Kloner RA. Intracoronary blood- or bone marrow-derived cell transplantation in patients with ischemic heart disease. *Regen Med* 2009;4:709-19.
130. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:907-21.
131. Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 2008;453:322-9.
132. Barnett P, van den Hoff MJ. Cardiac regeneration: different cells same goal. *Med Biol Eng Comput* 2011;49:723-32.
133. Zhou B, Honor LB, He H, et al. Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest* 2011;121:1894-904.
134. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85:1373-416.
135. Limana F, Bertolami C, Mangoni A, et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48:609-18.
136. Winter EM, Gittenberger-de Groot AC. Epicardium-derived cells in cardiogenesis and cardiac regeneration. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:692-703.

137. Smart N, Bollini S, Dube KN, et al. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 2011;474:640-4.
138. Smart N, Dube KN, Riley PR. Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation. *Vascul Pharmacol* 2013;58:164-73.
139. van WB, Gunst QD, Moorman AF, van den Hoff MJ. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS One* 2012;7:e44692.
140. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 2006;127:607-19.
141. Gittenberger-de Groot AC, Winter EM, Poelmann RE. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. *J Cell Mol Med* 2010;14:1056-60.
142. Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007;101:1255-65.
143. Chong JJ. Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians. *Heart Lung Circ* 2012;21:532-42.
144. van TJ, Atsma DE, Winter EM, et al. Epicardial cells of human adults can undergo an epithelial-to-mesenchymal transition and obtain characteristics of smooth muscle cells in vitro. *Stem Cells* 2007;25:271-8.
145. Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* 2009;458:E8-E9.
146. Ding Z, Temme S, Quast C, et al. Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. *Stem Cells Transl Med* 2016;5:639-50.
147. Bollini S, Vieira JM, Howard S, et al. Re-activated adult epicardial progenitor cells are a heterogeneous population molecularly distinct from their embryonic counterparts. *Stem Cells Dev* 2014;23:1719-30.
148. Limana F, Capogrossi MC, Germani A. The epicardium in cardiac repair: from the stem cell view. *Pharmacol Ther* 2011;129:82-96.
149. Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:54-9.
150. Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res* 2001;303:173-86.
151. Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 1999;126:1845-57.
152. Krause A, Zacharias W, Camarata T, et al. Tbx5 and Tbx4 transcription factors interact with a new chicken PDZ-LIM protein in limb and heart development. *Dev Biol* 2004;273:106-20.
153. Camarata T, Bimber B, Kulisz A, Chew TL, Yeung J, Simon HG. LMP4 regulates Tbx5 protein subcellular localization and activity. *J Cell Biol* 2006;174:339-48.

154. Bimber B, Dettman RW, Simon HG. Differential regulation of Tbx5 protein expression and sub-cellular localization during heart development. *Dev Biol* 2007;302:230-42.
155. Smart N, Riley PR. Derivation of epicardium-derived progenitor cells (EPDCs) from adult epicardium. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009;Chapter 2:Unit2C.
156. Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:12573-8.
157. Aoyagi T, Matsui T. The Cardiomyocyte as a Source of Cytokines in Cardiac Injury. *J Cell Sci Ther* 2011;2012.
158. Winter EM, van Oorschot AA, Hogers B, et al. A new direction for cardiac regeneration therapy: application of synergistically acting epicardium-derived cells and cardiomyocyte progenitor cells. *Circ Heart Fail* 2009;2:643-53.
159. Winter EM, Grauss RW, Hogers B, et al. Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* 2007;116:917-27.
160. Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* 1999;21:444-8.
161. Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* 1994;8:1007-18.
162. Szebenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 1999;185:45-106.
163. Okada-Ban M, Thiery JP, Jouanneau J. Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:263-7.
164. Sugi Y, Sasse J, Lough J. Inhibition of precardiac mesoderm cell proliferation by antisense oligodeoxynucleotide complementary to fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *Dev Biol* 1993;157:28-37.
165. Sugi Y, Lough J. Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. *Dev Biol* 1995;168:567-74.
166. Solloway MJ, Harvey RP. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc Res* 2003;58:264-77.
167. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res* 2003;57:8-19.
168. Jiang ZS, Padua RR, Ju H, et al. Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H1071-H1080.
169. Sheikh F, Sontag DP, Fandrich RR, Kardami E, Cattini PA. Overexpression of FGF-2 increases cardiac myocyte viability after injury in isolated mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1039-H1050.
170. Pellioux C, Foletti A, Peduto G, et al. Dilated cardiomyopathy and impaired cardiac hypertrophic response to angiotensin II in mice lacking FGF-2. *J Clin Invest* 2001;108:1843-51.

171. de Boer RA, Pinto YM, van Veldhuisen DJ. The imbalance between oxygen demand and supply as a potential mechanism in the pathophysiology of heart failure: the role of microvascular growth and abnormalities. *Microcirculation* 2003;10:113-26.
172. Hilfiker-Kleiner D, Limbourg A, Drexler H. STAT3-mediated activation of myocardial capillary growth. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:152-7.
173. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev* 2003;8:253-8.
174. Diaz-Sandoval LJ, Losordo DW. Gene therapy for cardiovascular angiogenesis. *Expert Opin Biol Ther* 2003;3:599-616.
175. Waltenberger J. Modulation of growth factor action: implications for the treatment of cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96:4083-94.
176. Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999;103:1231-6.
177. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.
178. Giordano FJ, Gerber HP, Williams SP, et al. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5780-5.
179. Levy AP, Levy NS, Loscalzo J, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res* 1995;76:758-66.
180. Dor Y, Keshet E. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 1997;7:289-94.
181. Hesse J, Leberling S, Boden E, et al. CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction. *FASEB J* 2017;31:3040-53.
182. Rattazzi M, Puato M, Faggin E, Bertipaglia B, Zambon A, Pauletto P. C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits or passive bystanders? *J Hypertens* 2003;21:1787-803.
183. Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, et al. Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:391-8.
184. Hirota H, Chen J, Betz UA, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* 1999;97:189-98.
185. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. Cytokines and their receptors in cardiovascular diseases--role of gp130 signalling pathway in cardiac myocyte growth and maintenance. *Int J Exp Pathol* 2000;81:1-16.
186. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res* 2004;95:187-95.

187. Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu MG, et al. Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12929-34.
188. Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, et al. Cardiac-specific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart. *J Biol Chem* 2002;277:6676-81.
189. Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, et al. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest* 2005;85:1210-23.
190. Hirota H, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4862-6.
191. Kaneko K, Kanda T, Yokoyama T, et al. Expression of interleukin-6 in the ventricles and coronary arteries of patients with myocardial infarction. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1997;97:3-12.
192. Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, Du Y, Janicki JS, Brower GL. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats. *Hypertension* 2010;56:225-31.
193. Mann DL. Tumor necrosis factor and viral myocarditis: the fine line between innate and inappropriate immune responses in the heart. *Circulation* 2001;103:626-9.
194. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2005;95:3C-8C.
195. Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996;98:2854-65.
196. Patten M, Kramer E, Bunemann J, et al. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflugers Arch* 2001;442:920-7.
197. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 1994;127:2021-36.
198. Bax NA, van Oorschot AA, Maas S, et al. In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGFbeta-signaling and WT1. *Basic Res Cardiol* 2011;106:829-47.
199. Grieskamp T, Rudat C, Ludtke TH, Norden J, Kispert A. Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circ Res* 2011;108:813-23.
200. Torella D, Rota M, Nurzynska D, et al. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 2004;94:514-24.
201. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res* 2005;97:663-73.
202. Huang YL, Qiu RF, Mai WY, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B* 2012;13:20-8.

203. Xin M, Olson EN, Bassel-Duby R. Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013;14:529-41.
204. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293:H1883-H1891.
205. Smith CL, Baek ST, Sung CY, Tallquist MD. Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circ Res* 2011;108:e15-e26.
206. Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development* 1999;126:2053-62.
207. Lee CH, Shah B, Moioli EK, Mao JJ. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest* 2015;125:3992.
208. Liu D, Zhang X, Li X, Zhang Z, Guo G. Differentiation of the Human Marrow Mesenchymal Stem Cells into Vascular Endothelium-like Cells in vitro., IFMBE Proceedings, Volume 19 Edn. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
209. Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008;454:104-8.
210. Jongbloed MR, Vicente-Steijn R, Douglas YL, et al. Expression of Id2 in the second heart field and cardiac defects in Id2 knock-out mice. *Dev Dyn* 2011;240:2561-77.
211. Smart N, Rossdeutsch A, Riley PR. Thymosin beta4 and angiogenesis: modes of action and therapeutic potential. *Angiogenesis* 2007;10:229-41.
212. Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1112:171-88.
213. Banerjee I, Zhang J, Moore-Morris T, et al. Thymosin beta 4 is dispensable for murine cardiac development and function. *Circ Res* 2012;110:456-64.
214. Munoz-Chapuli R, Macias D, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Perez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:1070-82.
215. Zangi L, Lui KO, von GA, et al. Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol* 2013;31:898-907.
216. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med* 2012;367:2322-33.
217. Hasko G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol* 2013;4:85.
218. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L., 5. Auflage Edn Spektrum Akademischer Verlag, 2003.
219. Borg N. Die Rolle der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) bei der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt in der Maus. 2013.

220. Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci* 2009;32:19-29.
221. Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* 2012;34:218-25.
222. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011;11:201-12.
223. Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, la SA. Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2015;21:184-92.
224. Kim UH, Kim MK, Kim JS, Han MK, Park BH, Kim HR. Purification and characterization of NAD glycohydrolase from rabbit erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1993;305:147-52.
225. Terada M, Fujiki H, Marks PA, Sugimura T. Induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells by nicotinamide and related compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:6411-4.
226. Yang H, Yang T, Baur JA, et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell* 2007;130:1095-107.
227. Vitiello L, Gorini S, Rosano G, la SA. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 2012;120:511-8.
228. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J Biol Chem* 2000;275:31061-8.
229. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 2011;17:1391-401.
230. Lazarowski ER. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* 2012;8:359-73.
231. Chekeni FB, Elliott MR, Sandilos JK, et al. Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 2010;467:863-7.
232. Eltzschig HK, Eckle T, Mager A, et al. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res* 2006;99:1100-8.
233. Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem* 2007;282:31733-43.
234. Sohl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228-32.
235. Sabirov RZ, Okada Y. The maxi-anion channel: a classical channel playing novel roles through an unidentified molecular entity. *J Physiol Sci* 2009;59:3-21.
236. Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol Chem* 2010;285:17406-16.

237. Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* 2004;4:793-803.
238. Kukulski F, Levesque SA, Seigny J. Impact of ectoenzymes on p2 and p1 receptor signaling. *Adv Pharmacol* 2011;61:263-99.
239. Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, et al. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* 2005;1:193-204.
240. Robson SC, Seigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006;2:409-30.
241. Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal* 2012;8:437-502.
242. Schicker K, Hussl S, Chandaka GK, et al. A membrane network of receptors and enzymes for adenine nucleotides and nucleosides. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:325-34.
243. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* 1998;161:95-109.
244. Strater N. Ecto-5'-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinergic Signal* 2006;2:343-50.
245. Heuts DP, Weissenborn MJ, Olkhov RV, et al. Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem* 2012;13:2384-91.
246. Knofel T, Strater N. X-ray structure of the Escherichia coli periplasmic 5'-nucleotidase containing a dimetal catalytic site. *Nat Struct Biol* 1999;6:448-53.
247. Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 1992;285 (Pt 2):345-65.
248. Hunsucker SA, Mitchell BS, Sychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther* 2005;107:1-30.
249. Garavaglia S, Bruzzone S, Cassani C, et al. The high-resolution crystal structure of periplasmic Haemophilus influenzae NAD nucleotidase reveals a novel enzymatic function of human CD73 related to NAD metabolism. *Biochem J* 2012;441:131-41.
250. Schutz W, Schrader J, Gerlach E. Different sites of adenosine formation in the heart. *Am J Physiol* 1981;240:H963-H970.
251. Eckle T, Fullbier L, Wehrmann M, et al. Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury. *J Immunol* 2007;178:8127-37.
252. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, et al. Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* 2004;95:814-21.
253. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 2013;19:355-67.
254. Zerneck A, Bidzhekov K, Ozuyaman B, et al. CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation. *Circulation* 2006;113:2120-7.
255. Hart ML, Henn M, Kohler D, et al. Role of extracellular nucleotide phosphohydrolysis in intestinal ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2008;22:2784-97.

256. Reutershan J, Vollmer I, Stark S, Wagner R, Ngamsri KC, Eltzschig HK. Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* 2009;23:473-82.
257. Li RW, Yang C, Sit AS, Lin SY, Ho EY, Leung GP. Physiological and pharmacological roles of vascular nucleoside transporters. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012;59:10-5.
258. Young JD, Yao SY, Baldwin JM, Cass CE, Baldwin SA. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol Aspects Med* 2013;34:529-47.
259. Yao SY, Ng AM, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Nucleobase transport by human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1). *J Biol Chem* 2011;286:32552-62.
260. Eckle T, Hughes K, Ehrentraut H, et al. Crosstalk between the equilibrative nucleoside transporter ENT2 and alveolar Adora2b adenosine receptors dampens acute lung injury. *FASEB J* 2013;27:3078-89.
261. Rose JB, Naydenova Z, Bang A, et al. Absence of equilibrative nucleoside transporter 1 in ENT1 knockout mice leads to altered nucleoside levels following hypoxic challenge. *Life Sci* 2011;89:621-30.
262. Aran JM, Colomer D, Matutes E, Vives-Corrons JL, Franco R. Presence of adenosine deaminase on the surface of mononuclear blood cells: immunochemical localization using light and electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 1991;39:1001-8.
263. Jarvis MF, Khakh BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 2009;56:208-15.
264. Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch* 2006;452:552-62.
265. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 2012;485:207-12.
266. Di VF, Chiozzi P, Ferrari D, et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood* 2001;97:587-600.
267. Jacob F, Perez NC, Bachert C, Van CK. Purinergic signaling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signal* 2013;9:285-306.
268. Chen JF, Eltzschig HK, Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets--what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* 2013;12:265-86.
269. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 2001;53:527-52.
270. Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev* 2011;63:1-34.
271. Cheong SL, Federico S, Venkatesan G, et al. The A3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches. *Med Res Rev* 2013;33:235-335.

272. Klinger M, Freissmuth M, Nanoff C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell Signal* 2002;14:99-108.
273. Linden J. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:775-87.
274. Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001;52:25-39.
275. Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS. Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Mol Pharmacol* 1999;56:705-13.
276. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:247-64.
277. Yang JN, Tiselius C, Dare E, Johansson B, Valen G, Fredholm BB. Sex differences in mouse heart rate and body temperature and in their regulation by adenosine A1 receptors. *Acta Physiol (Oxf)* 2007;190:63-75.
278. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* 1990;85:1150-7.
279. Cronstein BN, Levin RI, Philips M, Hirschhorn R, Abramson SB, Weissmann G. Neutrophil adherence to endothelium is enhanced via adenosine A1 receptors and inhibited via adenosine A2 receptors. *J Immunol* 1992;148:2201-6.
280. Salmon JE, Cronstein BN. Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. *J Immunol* 1990;145:2235-40.
281. Milne GR, Palmer TM. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor. *ScientificWorldJournal* 2011;11:320-39.
282. Hasko G, Kuhel DG, Chen JF, et al. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J* 2000;14:2065-74.
283. Kreckler LM, Wan TC, Ge ZD, Auchampach JA. Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:172-80.
284. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A2A adenosine receptor induction inhibits IFN-gamma production in murine CD4+ T cells. *J Immunol* 2005;174:1073-80.
285. Panther E, Idzko M, Herouy Y, et al. Expression and function of adenosine receptors in human dendritic cells. *FASEB J* 2001;15:1963-70.
286. Panther E, Corinti S, Idzko M, et al. Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* 2003;101:3985-90.
287. Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Huls S, Burghoff S, Schrader J. Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and T_H17 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301:C530-C539.

288. Csoka B, Nemeth ZH, Virag L, et al. A2A adenosine receptors and C/EBPbeta are crucially required for IL-10 production by macrophages exposed to Escherichia coli. *Blood* 2007;110:2685-95.
289. Link AA, Kino T, Worth JA, et al. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. *J Immunol* 2000;164:436-42.
290. Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, Wilson CN. Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol* 2009;215-69.
291. Glover DK, Riou LM, Ruiz M, et al. Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1851-H1858.
292. Lasley RD, Jahania MS, Mentzer RM, Jr. Beneficial effects of adenosine A(2a) agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H1660-H1666.
293. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, et al. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* 2006;114:2056-64.
294. Rork TH, Wallace KL, Kennedy DP, Marshall MA, Lankford AR, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H1825-H1833.
295. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 2007;14:1315-23.
296. Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Adv Pharmacol* 2011;61:115-44.
297. Chen H, Yang D, Carroll SH, Eltzschig HK, Ravid K. Activation of the macrophage A2b adenosine receptor regulates tumor necrosis factor-alpha levels following vascular injury. *Exp Hematol* 2009;37:533-8.
298. Koeppen M, Harter PN, Bonney S, et al. Adora2b signaling on bone marrow derived cells dampens myocardial ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2012;116:1245-57.
299. Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, et al. Adenosine augments IL-10 production by macrophages through an A2B receptor-mediated posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 2005;175:8260-70.
300. Feoktistov I, Goldstein AE, Biaggioni I. Role of p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated protein kinase kinase in adenosine A2B receptor-mediated interleukin-8 production in human mast cells. *Mol Pharmacol* 1999;55:726-34.
301. Sitaraman SV, Merlin D, Wang L, et al. Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* 2001;107:861-9.
302. Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, et al. Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* 2006;114:1923-32.
303. Simonis G, Wiedemann S, Joachim D, Weinbrenner C, Marquetant R, Strasser RH. Stimulation of adenosine A2b receptors blocks apoptosis in the non-infarcted myocardium even when administered after the onset of infarction. *Mol Cell Biochem* 2009;328:119-26.

304. Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, et al. Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor. *J Immunol* 2003;171:338-45.
305. Martin L, Pingle SC, Hallam DM, Rybak LP, Ramkumar V. Activation of the adenosine A3 receptor in RAW 264.7 cells inhibits lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α release by reducing calcium-dependent activation of nuclear factor- κ B and extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;316:71-8.
306. Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF- α expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996;156:3435-42.
307. Meisel R, Brockers S, Heseler K, et al. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* 2011;25:648-54.
308. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
309. Floss DM, Klocker T, Schroder J, et al. Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor beta1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases. *Mol Biol Cell* 2016;27:2301-16.
310. Poschmann G, Grzendowski M, Stefanski A, Bruns E, Meyer HE, Stuhler K. Redox proteomics reveal stress responsive proteins linking peroxiredoxin-1 status in glioma to chemosensitivity and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 2015;1854:624-31.
311. Krogh A, Larsson B, von HG, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305:567-80.
312. Petersen TN, Brunak S, von HG, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 2011;8:785-6.
313. Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 2008;9:392.
314. Rossini A, Zacheo A, Mocini D, et al. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:683-93.
315. Bani D, Nistri S. New insights into the morphogenic role of stromal cells and their relevance for regenerative medicine. lessons from the heart. *J Cell Mol Med* 2014;18:363-70.
316. Goetz SC, Brown DD, Conlon FL. TBX5 is required for embryonic cardiac cell cycle progression. *Development* 2006;133:2575-84.
317. Greulich F, Farin HF, Schuster-Gossler K, Kispert A. Tbx18 function in epicardial development. *Cardiovasc Res* 2012;96:476-83.
318. Tso GH, Law HK, Tu W, Chan GC, Lau YL. Phagocytosis of apoptotic cells modulates mesenchymal stem cells osteogenic differentiation to enhance IL-17 and RANKL expression on CD4+ T cells. *Stem Cells* 2010;28:939-54.
319. Flogel U, Ding Z, Hardung H, et al. In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging. *Circulation* 2008;118:140-8.
320. Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Res Ther* 2016;7:82.

321. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
322. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 1997;15:142-5.
323. Statistisches Bundesamt. *Gesundheit - Todesursachen in Deutschland 2015*. 2015.
324. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell* 2013;12:689-98.
325. Zamilpa R, Navarro MM, Flores I, Griffey S. Stem cell mechanisms during left ventricular remodeling post-myocardial infarction: Repair and regeneration. *World J Cardiol* 2014;6:610-20.
326. Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res* 2011;2011:207326.
327. Yao Y, Huang J, Geng Y, et al. Paracrine action of mesenchymal stem cells revealed by single cell gene profiling in infarcted murine hearts. *PLoS One* 2015;10:e0129164.
328. Carmona R, Guadix JA, Cano E, et al. The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development. *J Cell Mol Med* 2010;14:2066-72.
329. Smits AM, Riley PR. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol* 2014;2:84-100.
330. Doppler SA, Carvalho C, Lahm H, et al. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. *J Thorac Dis* 2017;9:S36-S51.
331. Zhou B, Pu WT. Isolation and characterization of embryonic and adult epicardium and epicardium-derived cells. *Methods Mol Biol* 2012;843:155-68.
332. Masters M, Riley PR. The epicardium signals the way towards heart regeneration. *Stem Cell Res* 2014;13:683-92.
333. Rossini A, Frati C, Lagrasta C, et al. Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin. *Cardiovasc Res* 2011;89:650-60.
334. Risebro CA, Vieira JM, Klotz L, Riley PR. Characterisation of the human embryonic and foetal epicardium during heart development. *Development* 2015;142:3630-6.
335. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ Res* 2016;118:400-9.
336. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios* 1980;28:41-61.
337. Bonner F, Borg N, Burghoff S, Schrader J. Resident cardiac immune cells and expression of the ectonucleotidase enzymes CD39 and CD73 after ischemic injury. *PLoS One* 2012;7:e34730.
338. Tallquist MD, Molkentin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:484-91.
339. Babuin L, Jaffe AS. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. *CMAJ* 2005;173:1191-202.

340. Chiavegato A, Bollini S, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells are rejected after transplantation in the myocardium of normal, ischemic, immuno-suppressed or immuno-deficient rat. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:746-59.
341. Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003;5:877-89.
342. Eghbali M, Weber KT. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem* 1990;96:1-14.
343. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 1997;276:75-81.
344. Camelliti P, Devlin GP, Matthews KG, Kohl P, Green CR. Spatially and temporally distinct expression of fibroblast connexins after sheep ventricular infarction. *Cardiovasc Res* 2004;62:415-25.
345. Kohl P. Heterogeneous cell coupling in the heart: an electrophysiological role for fibroblasts. *Circ Res* 2003;93:381-3.
346. Gaudesius G, Miragoli M, Thomas SP, Rohr S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res* 2003;93:421-8.
347. Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998;40:352-63.
348. Sano M, Fukuda K, Kodama H, et al. Interleukin-6 family of cytokines mediate angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in rodent cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2000;275:29717-23.
349. Strutz F, Okada H, Lo CW, et al. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995;130:393-405.
350. Chang HY, Chi JT, Dudoit S, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:12877-82.
351. Muller AM, Hermanns MI, Skrzynski C, Nesslinger M, Muller KM, Kirkpatrick CJ. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. *Exp Mol Pathol* 2002;72:221-9.
352. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990;75:2417-26.
353. Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* 2007;15:100-8.
354. Gray D. *Chamberlain's Symptoms and Signs in Clinical Medicine: An Introduction to Medical Diagnosis.*, 13th Edition Edn. London: Hodder Arnold, 2010.
355. Mahida S, Sacher F, Derval N, et al. Science Linking Pulmonary Veins and Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2015;4:40-3.
356. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;1:62-73.
357. Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011;91:265-325.

358. Guo Y, Lip GY, Apostolakis S. Inflammation in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:2263-70.
359. Jalife J, Kaur K. Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med* 2015;25:475-84.
360. Krahn AD, Manfreda J, Tate RB, Mathewson FA, Cuddy TE. The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *Am J Med* 1995;98:476-84.
361. Kannel WB, Benjamin EJ. Status of the epidemiology of atrial fibrillation. *Med Clin North Am* 2008;92:17-40, ix.
362. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 1998;82:2N-9N.
363. Schmitt J, Duray G, Gersh BJ, Hohnloser SH. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction: a systematic review of the incidence, clinical features and prognostic implications. *Eur Heart J* 2009;30:1038-45.
364. Goldberg RJ, Seeley D, Becker RC, et al. Impact of atrial fibrillation on the in-hospital and long-term survival of patients with acute myocardial infarction: a community-wide perspective. *Am Heart J* 1990;119:996-1001.
365. Lehto M, Snapinn S, Dickstein K, Swedberg K, Nieminen MS. Prognostic risk of atrial fibrillation in acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction: the OPTIMAAL experience. *Eur Heart J* 2005;26:350-6.
366. Madias JE, Patel DC, Singh D. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction: a prospective study based on data from a consecutive series of patients admitted to the coronary care unit. *Clin Cardiol* 1996;19:180-6.
367. Berton G, Cordiano R, Cucchini F, Cavuto F, Pellegrinet M, Palatini P. Atrial fibrillation during acute myocardial infarction: association with all-cause mortality and sudden death after 7-year of follow-up. *Int J Clin Pract* 2009;63:712-21.
368. Shakir DK, Arafa SO. Right atrial infarction, atrial arrhythmia and inferior myocardial infarction form a missed triad: a case report and review of the literature. *Can J Cardiol* 2007;23:995-7.
369. Lazar EJ, Goldberger J, Peled H, Sherman M, Frishman WH. Atrial infarction: diagnosis and management. *Am Heart J* 1988;116:1058-63.
370. Verma A, Macle L, Cox J, Skanes AC. Canadian Cardiovascular Society atrial fibrillation guidelines 2010: catheter ablation for atrial fibrillation/atrial flutter. *Can J Cardiol* 2011;27:60-6.
371. Pardo MJ, Scanavacca M, Sosa E, et al. Atrial coronary arteries in areas involved in atrial fibrillation catheter ablation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:600-5.
372. Yano A, Igawa O, Adachi M, et al. Left atrial branches of coronary arteries; clinical implications related to linear catheter ablation for atrial fibrillation. *J Interv Card Electrophysiol* 2009;25:141-4.
373. Lim HE, Choi CU, Na JO, et al. Effects of iatrogenic myocardial injury on coronary microvascular function in patients undergoing radiofrequency catheter ablation of atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6:318-26.

374. Ma J, Cheng G, Xu G, Weng S, Lu X. Effect of radiofrequency catheter ablation on endothelial function and oxidative stress. *Acta Cardiol* 2006;61:339-42.
375. Opacic D, van Bragt KA, Nasrallah HM, Schotten U, Verheule S. Atrial metabolism and tissue perfusion as determinants of electrical and structural remodelling in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2016;109:527-41.
376. Sakata K, Kurihara H, Iwamori K, et al. Clinical and prognostic significance of atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1997;80:1522-7.
377. Pacchia CF, Dossall DJ, Ranjan R, DiBella E. Alterations in atrial perfusion during atrial fibrillation. *Exp Physiol* 2014;99:1267-72.
378. van Bragt KA, Nasrallah HM, Kuiper M, Luiken JJ, Schotten U, Verheule S. Atrial supply-demand balance in healthy adult pigs: coronary blood flow, oxygen extraction, and lactate production during acute atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2014;101:9-19.
379. Arai AE, Pantely GA, Anselone CG, Bristow J, Bristow JD. Active downregulation of myocardial energy requirements during prolonged moderate ischemia in swine. *Circ Res* 1991;69:1458-69.
380. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allessie M. Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* 2003;107:1433-9.
381. Daoud EG, Marcovitz P, Knight BP, et al. Short-term effect of atrial fibrillation on atrial contractile function in humans. *Circulation* 1999;99:3024-7.
382. Ausma J, Wijffels M, Thone F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation* 1997;96:3157-63.
383. Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res* 2001;52:14-24.
384. Dispersyn GD, Ausma J, Thone F, et al. Cardiomyocyte remodelling during myocardial hibernation and atrial fibrillation: prelude to apoptosis. *Cardiovasc Res* 1999;43:947-57.
385. White CW, Kerber RE, Weiss HR, Marcus ML. The effects of atrial fibrillation on atrial pressure-volume and flow relationships. *Circ Res* 1982;51:205-15.
386. Gramley F, Lorenzen J, Jedamzik B, et al. Atrial fibrillation is associated with cardiac hypoxia. *Cardiovasc Pathol* 2010;19:102-11.
387. Xu Y, Sharma D, Du F, Liu Y. The role of Toll-like receptor 2 and hypoxia-induced transcription factor-1alpha in the atrial structural remodeling of non-valvular atrial fibrillation. *Int J Cardiol* 2013;168:2940-1.
388. Ogi H, Nakano Y, Niida S, et al. Is structural remodeling of fibrillated atria the consequence of tissue hypoxia? *Circ J* 2010;74:1815-21.
389. Ausma J, Litjens N, Lenders MH, et al. Time course of atrial fibrillation-induced cellular structural remodeling in atria of the goat. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:2083-94.
390. Ausma J, Borgers M. Dedifferentiation of atrial cardiomyocytes: from in vivo to in vitro. *Cardiovasc Res* 2002;55:9-12.

391. Rucker-Martin C, Pecker F, Godreau D, Hatem SN. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro. *Cardiovasc Res* 2002;55:38-52.
392. Aime-Sempe C, Folliguet T, Rucker-Martin C, et al. Myocardial cell death in fibrillating and dilated human right atria. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1577-86.
393. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990;63:21-9.
394. Eyden B. The myofibroblast: a study of normal, reactive and neoplastic tissues, with an emphasis on ultrastructure. part 2 - tumours and tumour-like lesions. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2005;37:231-96.
395. da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006;119:2204-13.
396. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:14022-7.
397. Copland IB. Mesenchymal stromal cells for cardiovascular disease. *J Cardiovasc Dis Res* 2011;2:3-13.
398. Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007;53:121-7.
399. Breitbach M, Bostani T, Roell W, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007;110:1362-9.
400. Fanton Y, Houbrechts C, Willems L, et al. Cardiac atrial appendage stem cells promote angiogenesis in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 2016;97:235-44.
401. Fanton Y, Robic B, Rummens JL, et al. Cardiac atrial appendage stem cells engraft and differentiate into cardiomyocytes in vivo: A new tool for cardiac repair after MI. *Int J Cardiol* 2015;201:10-9.
402. Koninckx R, Daniels A, Windmolders S, et al. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovasc Res* 2013;97:413-23.
403. Moerkamp AT, Lodder K, van HT, et al. Human fetal and adult epicardial-derived cells: a novel model to study their activation. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:174.
404. Clunie-O'Connor C, Smits AM, Antoniadis C, et al. The Derivation of Primary Human Epicardium-Derived Cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2015;35:2C-12.
405. Synnergren J, Drowley L, Plowright AT, et al. Comparative transcriptomic analysis identifies genes differentially expressed in human epicardial progenitors and hiPSC-derived cardiac progenitors. *Physiol Genomics* 2016;48:771-84.
406. Park CW, Kim KS, Bae S, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells* 2009;2:59-68.
407. van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20:1186-96.

408. Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK. Hypoxia-induced secretion of TGF-beta1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant* 2013;22:1869-82.
409. Mele V, Muraro MG, Calabrese D, et al. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF-beta. *Int J Cancer* 2014;134:2583-94.
410. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-22.
411. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007;110:3499-506.
412. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008;26:151-62.
413. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94:678-85.
414. Cheng SL, Zhang SF, Mohan S, et al. Regulation of insulin-like growth factors I and II and their binding proteins in human bone marrow stromal cells by dexamethasone. *J Cell Biochem* 1998;71:449-58.
415. Weimar IS, Miranda N, Muller EJ, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol* 1998;26:885-94.
416. Huang M, Yang D, Xiang M, Wang J. Role of interleukin-6 in regulation of immune responses to remodeling after myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2015;20:25-38.
417. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* 2015;74:62-8.
418. Mirosou M, Zhang Z, Deb A, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1643-8.
419. Venkiteswaran A. Tocilizumab. *MAbs* 2009;1:432-8.
420. Hoffmann J, Glassford AJ, Doyle TC, Robbins RC, Schrepfer S, Pelletier MP. Angiogenic effects despite limited cell survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under ischemia. *Thorac Cardiovasc Surg* 2010;58:136-42.
421. Everaert BR, Bergwerf I, De VN, et al. Multimodal in vivo imaging reveals limited allograft survival, intrapulmonary cell trapping and minimal evidence for ischemia-directed BMSC homing. *BMC Biotechnol* 2012;12:93.
422. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2014;5:148.
423. Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 2008;36:1176-85.

424. LIPKIN M, SHERLOCK P, BELL BM. Generation time of epithelial cells in the human colon. *Nature* 1962;195:175-7.
425. Kumei Y, Nakajima T, Sato A, Kamata N, Enomoto S. Reduction of G1 phase duration and enhancement of c-myc gene expression in HeLa cells at hypergravity. *J Cell Sci* 1989;93 (Pt 2):221-6.
426. Hayflick L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 1965;37:614-36.
427. Negoro S, Kunisada K, Tone E, et al. Activation of JAK/STAT pathway transduces cytoprotective signal in rat acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2000;47:797-805.
428. Yamauchi-Takahara K. Gp130-mediated pathway and left ventricular remodeling. *J Card Fail* 2002;8:S374-S378.
429. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 2003;24:25-9.
430. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797-819.
431. Fischer P, Hilfiker-Kleiner D. Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *Br J Pharmacol* 2008;153 Suppl 1:S414-S427.
432. Taga T, Hibi M, Hirata Y, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 1989;58:573-81.
433. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo. *J Immunol* 1992;148:4066-71.
434. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2):297-314.
435. Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990;63:1149-57.
436. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.
437. van Miert AS. Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. *Vet Q* 1995;17:41-50.
438. Le JM, Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest* 1989;61:588-602.
439. Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 2006;26:226-34.
440. Marcus GM, Whooley MA, Glidden DV, Pawlikowska L, Zaroff JG, Olgin JE. Interleukin-6 and atrial fibrillation in patients with coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Am Heart J* 2008;155:303-9.

441. Amdur RL, Mukherjee M, Go A, et al. Interleukin-6 Is a Risk Factor for Atrial Fibrillation in Chronic Kidney Disease: Findings from the CRIC Study. *PLoS One* 2016;11:e0148189.
442. Kimura R, Maeda M, Arita A, et al. Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine. *Cytokine* 2007;38:107-15.
443. Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, et al. STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res* 2005;65:428-35.
444. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
445. Obana M, Maeda M, Takeda K, et al. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation* 2010;121:684-91.
446. Trepicchio WL, Wang L, Bozza M, Dorner AJ. IL-11 regulates macrophage effector function through the inhibition of nuclear factor-kappaB. *J Immunol* 1997;159:5661-70.
447. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. *Blood* 2009;113:2324-35.
448. Warner SJ, Auger KR, Libby P. Human interleukin 1 induces interleukin 1 gene expression in human vascular smooth muscle cells. *J Exp Med* 1987;165:1316-31.
449. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci Signal* 2010;3:cm1.
450. Di VF. The therapeutic potential of modifying inflammasomes and NOD-like receptors. *Pharmacol Rev* 2013;65:872-905.
451. Koudssi F, Lopez JE, Villegas S, Long CS. Cardiac fibroblasts arrest at the G1/S restriction point in response to interleukin (IL)-1beta. Evidence for IL-1beta-induced hypophosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 1998;273:25796-803.
452. Funamoto M, Fujio Y, Kunisada K, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2000;275:10561-6.
453. Ristimaki A, Narko K, Enholm B, Joukov V, Alitalo K. Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *J Biol Chem* 1998;273:8413-8.
454. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004;22:377-84.
455. Bax NA, van Oorschot AA, Maas S, et al. In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGFbeta-signaling and WT1. *Basic Res Cardiol* 2011;106:829-47.
456. Olivey HE, Mundell NA, Austin AF, Barnett JV. Transforming growth factor-beta stimulates epithelial-mesenchymal transformation in the proepicardium. *Dev Dyn* 2006;235:50-9.
457. Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:769-73.

458. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005;96:881-9.
459. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, et al. Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 2000;96:34-40.
460. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 1996;271:17779-84.
461. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 2003;10:45-65.
462. Olszewski MB, Groot AJ, Dastych J, Knol EF. TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis. *J Immunol* 2007;178:5701-9.
463. Djeu JY, Blanchard DK, Richards AL, Friedman H. Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 1988;141:4047-52.
464. Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:2-8.
465. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989;170:1627-33.
466. Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:964-71.
467. Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 1998;82:47-56.
468. Aderka D, Le JM, Vilcek J. IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *J Immunol* 1989;143:3517-23.
469. Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
470. Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma. *J Clin Invest* 1995;96:1979-86.
471. Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, et al. Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells. *J Immunol* 2008;180:7212-20.
472. Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circ Res* 2003;92:485-92.
473. Gjorevski N, Boghaert E, Nelson CM. Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition by Transmission of Mechanical Stress through Epithelial Tissues. *Cancer Microenviron* 2012;5:29-38.

474. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
475. Batalov I, Feinberg AW. Differentiation of Cardiomyocytes from Human Pluripotent Stem Cells Using Monolayer Culture. *Biomark Insights* 2015;10:71-6.
476. Gu C, Rodriguez ER, Reimert DV, et al. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* 2003;5:45-57.
477. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 1998;92:735-45.
478. Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J* 2000;14:2532-9.
479. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2014;32:1408-19.
480. Ramos L, Sanchez-Abarca LI, Muntion S, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal* 2016;14:2.
481. Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem* 2007;102:1375-88.
482. Frantz S, Hu K, Adamek A, et al. Transforming growth factor beta inhibition increases mortality and left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2008;103:485-92.
483. Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, et al. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 1999;13:295-306.
484. Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 1999;4:403-14.
485. Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998;93:741-53.
486. Funk SD, Yurdagul A, Jr., Albert P, et al. EphA2 activation promotes the endothelial cell inflammatory response: a potential role in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:686-95.
487. Yan D, Liu X, Hua L, et al. MMP-14 promotes VSMC migration via up-regulating CD44 expression in cardiac allograft vasculopathy. *Pathol Res Pract* 2016;212:1119-25.
488. Poveda J, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, et al. MXRA5 is a TGF-beta1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J Cell Mol Med* 2017;21:154-64.
489. Zhao T, Zhao W, Meng W, et al. VEGF-C/VEGFR-3 pathway promotes myocyte hypertrophy and survival in the infarcted myocardium. *Am J Transl Res* 2015;7:697-709.
490. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:195-217.

491. Barrick CJ, Roberts RB, Rojas M, et al. Reduced EGFR causes abnormal valvular differentiation leading to calcific aortic stenosis and left ventricular hypertrophy in C57BL/6J but not 129S1/SvImJ mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H65-H75.
492. Williams LT. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science* 1989;243:1564-70.
493. Heldin CH, Westermark B. Platelet-derived growth factor: three isoforms and two receptor types. *Trends Genet* 1989;5:108-11.
494. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development* 2003;130:4769-84.
495. Chintalgattu V, Ai D, Langley RR, et al. Cardiomyocyte PDGFR-beta signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. *J Clin Invest* 2010;120:472-84.
496. Grego-Bessa J, Luna-Zurita L, Del MG, et al. Notch signaling is essential for ventricular chamber development. *Dev Cell* 2007;12:415-29.
497. Kume T. Ligand-dependent Notch signaling in vascular formation. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:210-22.
498. Varadkar P, Kraman M, Despres D, Ma G, Lozier J, McCright B. Notch2 is required for the proliferation of cardiac neural crest-derived smooth muscle cells. *Dev Dyn* 2008;237:1144-52.
499. McCright B, Gao X, Shen L, et al. Defects in development of the kidney, heart and eye vasculature in mice homozygous for a hypomorphic Notch2 mutation. *Development* 2001;128:491-502.
500. Kurpinski K, Lam H, Chu J, et al. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells* 2010;28:734-42.

Anhang

I. Plasmidkarten

Abb. I.1.: Plasmidkarte von pLenti-GII-CMV-GFP-2A-Puro (Applied Biological Materials (ABM) Inc.)

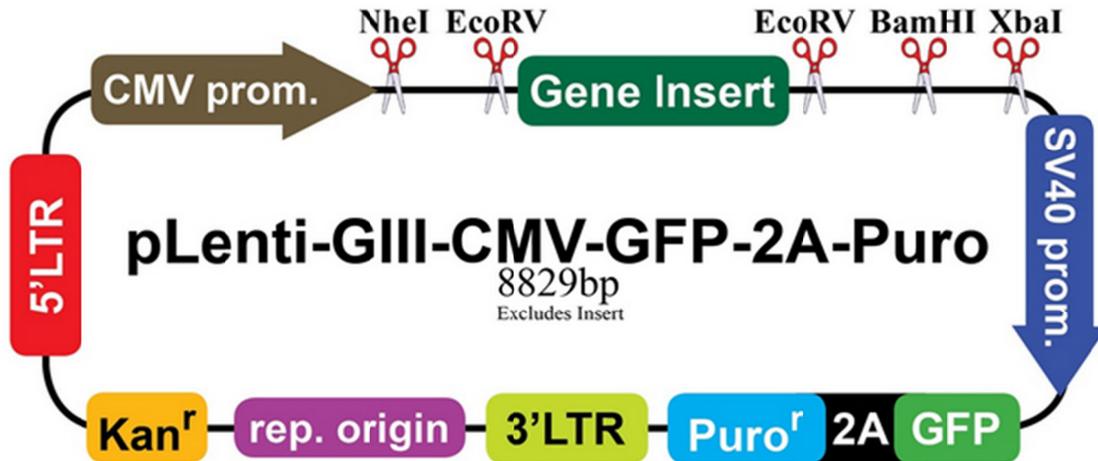


Abb. I.2: Plasmidkarte von pBABE-hygro-hTERT (Addgene#1773)

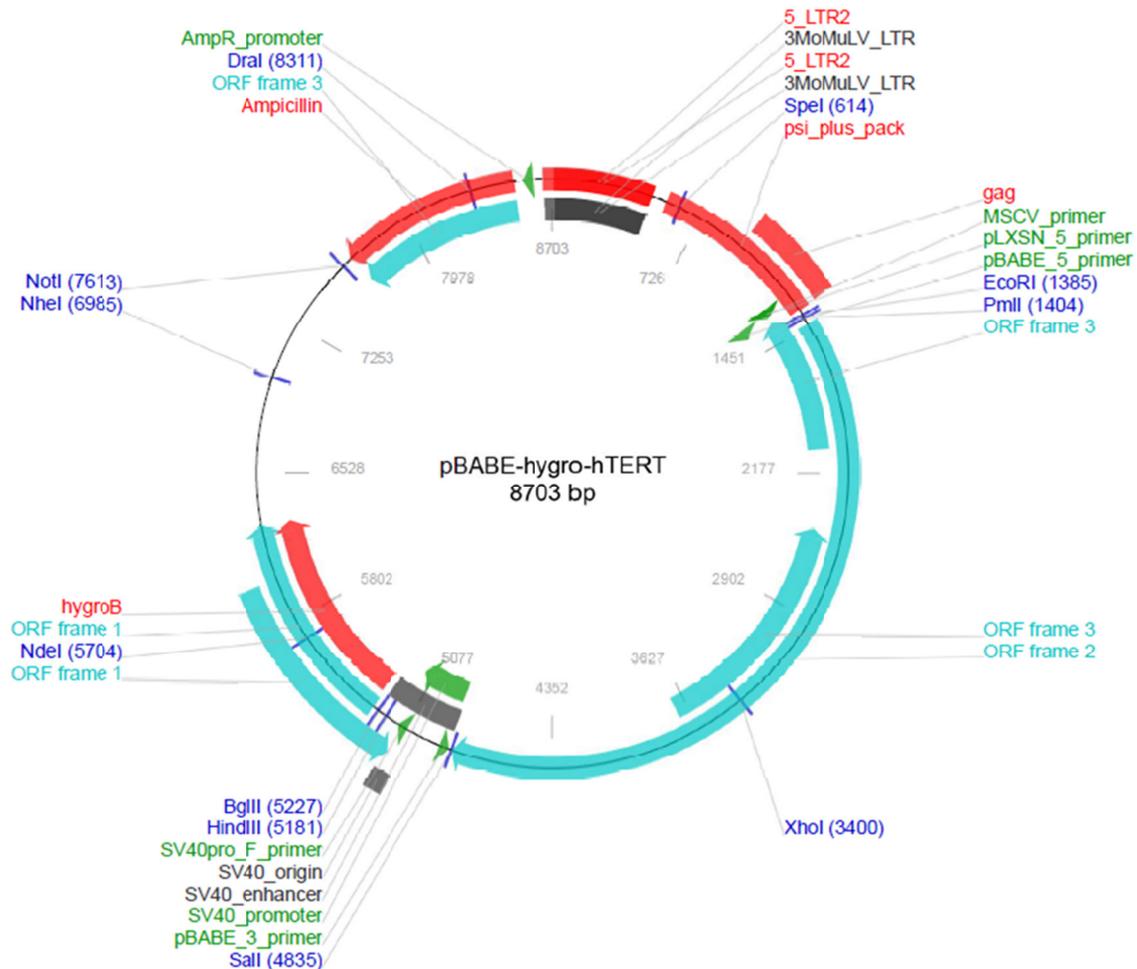


Abb. I.3: Plasmidkarte von pMD2.G (Addgene#12259)

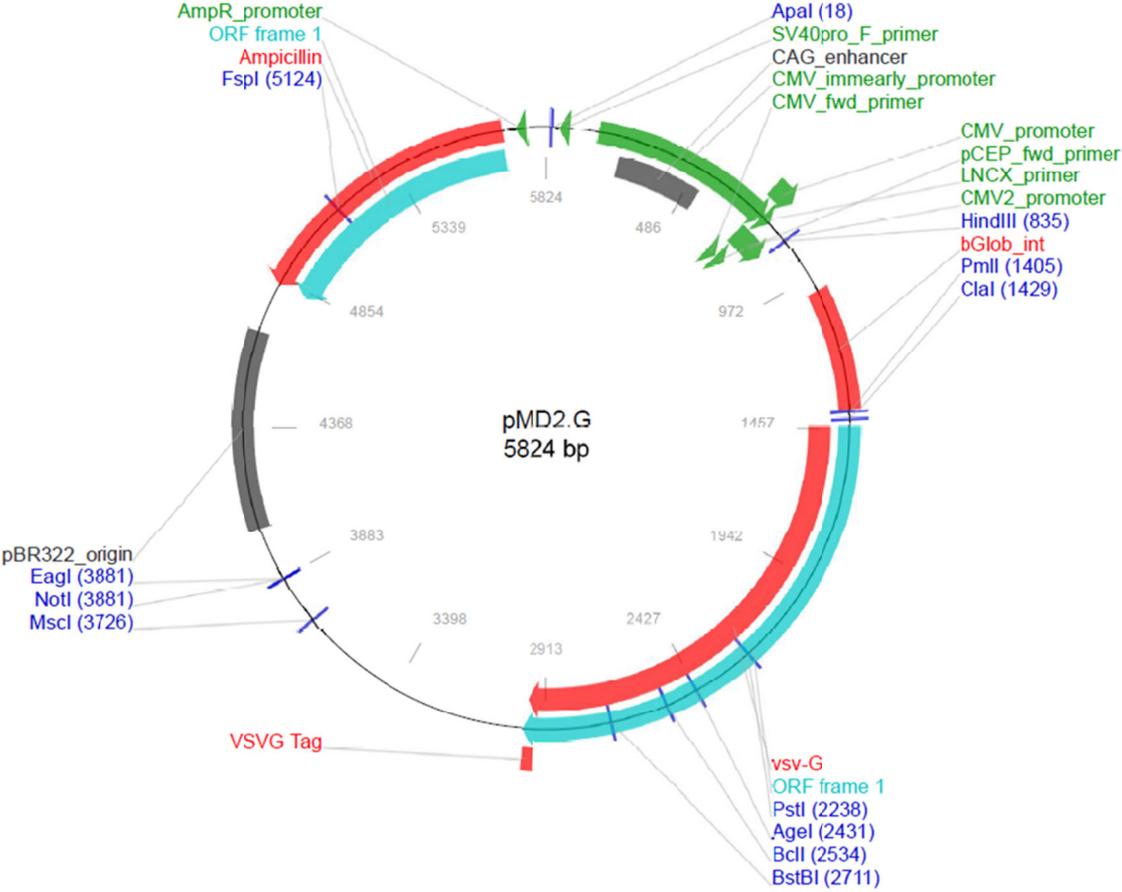
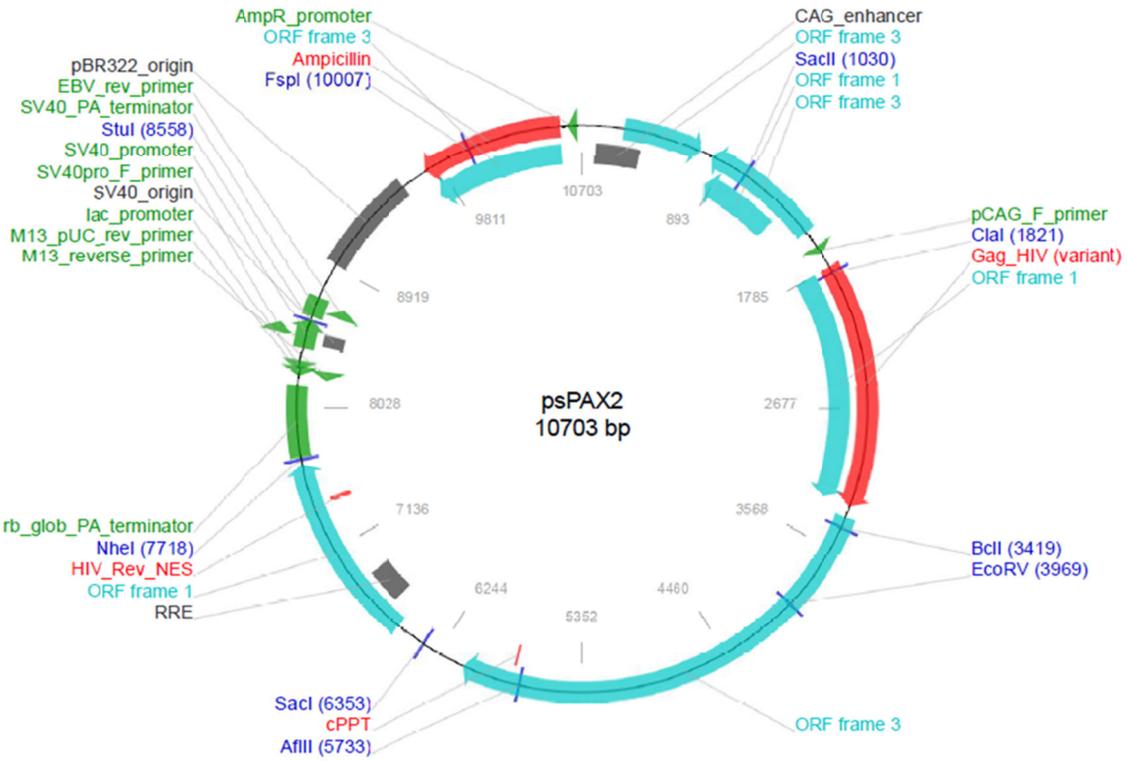


Abb. I.4: Plasmidkarte von psPAX2 (Addgene#12260)



II. Anonymisierte Patientendaten

Biopsie- nummer	OP-Datum	Geschlecht	Alter	Operation	Vorhof	Infarkt (+ / -)	Bypass (+ / -)	Bluthochdruck (+ / -)	Diabetes (+ / -)	BMI	Comorbiditäten
1	18.12.2103	m	57	ACB	re	-	-	-	+	25	Hyperlipidämie
2	28.01.2014	m	60	AKE	re	-	-	+	-	27	AV Block, Asthma
3	25.02.2014	w	76	AKE+ 4fach Bypass	re	+	-	+	-	25	Hyperlipidämie
4	12.03.2014	m	78	AKE	re	-	-	+	-	23	Hyperlipidämie
5	14.03.2014	m	78	AKE + ACB	re	-	-	+	-	30	Hyperlipidämie
6	04.04.2014	m	81	AKE, TKR, PFO- Verschluß, VHF MK+TK	li	-	-	-	+	31	pulmonale Hypertonie
7	15.04.2014	m	62	Annuloplastik	li	-	-	-	-	27	Hyperlipidämie
8/9	22.04.2014	m	64	HTX	li/re	-	-	-	-	25	Hyperlipidämie
10	01.07.2014	w	67	MKR + Bypass	li	-	-	-	-	21	Hyperlipidämie
11	07.07.2014	m	39	AKE	re	-	-	-	-	23	-
12	15.07.2014	m	62	HTX	li			+		28	Hyperlipidämie
13	18.07.2014	m	71	Bypass	re	-	-	+	-	31	Hyperlipidämie
14	24.08.2014	m	55	HTX	re	+	-	+	-	22	VHF
15	06.01.2015	m	70	AKE+ACB	re	-	-	+	+	25	Hyperlipidämie, COPD
16	08.01.2015	m	75	AKE	re	-	-	+	+	29	Hyperlipidämie
17	15.01.2015	w	57	AKE	re	-	-	+	+	43	Hyperlipidämie
18	27.01.2015	m	75	AKE	re	-	-	+	-	35	-
19	03.02.2015	m	84	AKE	re	-	-	+	-	25	pulmonale Hypertonie, Ektasie der Aorta asc.
20	12.02.2015	m	77	AKE	re	+	-	-	-	24	Koronarsklerose
21	18.02.2015	w	69	ACB	re	-	-	+	-	31	Hyperlipidämie
22	23.02.2015	w	74	AKE	re	-	-	+	-	32	Adipositas
23	26.03.2015	m	71	AKE	li	-	-	+	-	32	Vorhofflimmern
24	13.05.2015	m	63	HTX		-	-	+	-	31	Vorhofflimmern
25	17.05.2015	w	47	HTX		-	-	+	-	28	-
26	10.06.2015	w	71	AKE, subvalvuläre Myektomie	re	-	-	+	-	27	HOCM
27	24.06.2015	m	73	MIC-MKR+TKR	re	-	-	-	-	27	Chronisches Vorhofflimmern, Massive Dilatation des rechten Vorhofes, reduzierte RV-Funktion
28	10.07.2015	m	51	AKE, Vorhofablation	re	-	-	+	+	40	Chron. VHF, Adipositas per magna
29	13.08.2015	m	76	AKE		-	-	+	+	23	Koronare Dreifäßerkrankung mit systolisch global mittelgradig reduzierter LV Funktion und Hypokinesie inferior
30	20.08.2015	m	65								
31/32	20.08.2015	m	56	HTX	li	-	-	+	-	32	Chron. VHF, Hyperthreose, Adipositas
33	16.09.2015	w	70	AKE, MKR		-	-	+	-	23	Ektasie der Aorta asc., Paroxysmales Vorhofflimmern
34	01.10.2015	m	45	AKE, MKE		-	-	-	-	25	Z.n. Nierentransplantation mit ImmunsuppressionDoppelklappenendokarditis (Mitral- und Aortenklappe)
35	23.10.2015	m	68	ACVB	re	-	+	+	+	36	Hyperlipoproteinämie
36	24.10.2015	m	61	HTX		-	-	+	-	33	ICM
37	02.11.2015	m	68								
38	10.12.2015	w	75	MIC-MKR+TKR	re	-	-	-	-	25	Hochgradige Trikuspidalklappeninsuffizienz, Arrhythmia absoluta bei Vorhofflimmern
39/40	31.12.2015	m	55	HTX	li	-	-	+	-	27	Kardiomyopathie und Aorteninsuffizienz III*
41	14.01.2016	m	74	AKR mit Ektasie der Aorta ascendens		-	-	+	-	21	Hochgradige Aortenklappeninsuffizienz, Aorta ascendens Aneurysma
42	15.01.2016	m	66	AKE	re	-	+	+	-	30	Hypothyreose, Adipositas
43	01.02.2016	m	71	AKE, MKE, Exklusion li Vorhofohr	li	-	-	-	-	30	Intermittierende Absolute Arrhythmie bei Vorhofflimmern

III. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bedanken bei:

- Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Möglichkeit an diesem außerordentlich interessanten Thema bei hervorragenden Arbeitsbedingungen zu arbeiten und das Institut auf Kongressen zu repräsentieren. Einen besonderen Dank möchte ich für die gute fachliche Anregung und Unterstützung ausdrücken, wodurch mich fachlich und persönlich weiterentwickeln konnte.
- Prof. William Martin für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Dissertation.
- Herrn Friedrich-Wilhelm Hempel für die Finanzierung dieser Arbeit über die Christiane und Claudia Hempel-Stiftung für Stammzellforschung
- Dr. Daniela Friebe für die fachliche Unterstützung, produktive experimentelle Kooperation sowie die hervorragende Anleitung während der ersten Zeit meiner Doktorarbeit.
- Dr. Julia Hesse für die fachliche Unterstützung sowie kritisches Lesen meiner Dissertation und der konstruktiven Anmerkungen.
- Prof. Dr. Artur Lichtenberg und Prof. Dr. Payam Akhyari vom Institut für Kardiovaskuläre Chirurgie für die Organisation, Entnahme und Bereitstellung der humanen atrialen Biopsien.
- Dr. med. Zhaoping Ding und Dr. Dr. med. André Heinen für die Anleitung bei dem Erlernen von Herzinfarkt-Operationen bei Ratten.
- Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Benutzung der Geräte und Materialien des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II sowie bei Dr. Doreen Floss für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Analyse der Sekretion von hEPDC.
- Dr. Gereon Poschmann aus dem Molecular Proteomics Laboratory für die Analyse und Dr. Sebastian Temme für die Identifikation der Oberflächenproteine von hEPDC und rEPDC.
- PD Dr. Rüdiger Sorg und Marc Kuballa für die Bereitstellung der humanen MSC.
- Prof. em. Dr. Brigitte Royer-Pokora und Prof. Dr. Dagmar Wieczorek für die Benutzung der S2-Anlage des Instituts für Humangenetik sowie bei Dr. Artur Brandt für die Anleitung bei der lentiviralen Immortalisierung.
- Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für molekulare Kardiologie für die große Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Meiner Tante Gaby für das kritische Lesen meiner Dissertation.
- Meiner Familie für die großartige und liebevolle Unterstützung, auf welche ich während meines Studiums und der Promotion jederzeit vertrauen konnte.

IV. Eidesstattliche Erklärung

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

Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner Hochschule eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Ort, Datum)

(Unterschrift, Timo Daniel Schmidt)