

Aus dem Institut für Molekulare Kardiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

**Charakterisierung von epikardialen mesenchymalen
Zellen (EPDC) der Ratte nach Myokardinfarkt**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kathrin Regnery

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung

Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit und assoziierte Folgeerkrankungen sind weltweit die häufigsten Todesursachen. Etwa eine Milliarde Herzmuskelzellen gehen im Rahmen eines Herzinfarktes zugrunde. Als Folge kommt es zu einer sterilen Entzündungsreaktion, in deren Verlauf das nekrotische Gewebe durch eine bindegewebige Narbe ersetzt wird. Nach einem Myokardinfarkt findet außerdem im Epikard, der mesothelialen äußeren Schicht des Herzens, eine Aktivierung und Umwandlung in mesenchymale EPDC (*epicardium-derived cells*) statt. Diese spielen in der Embryonalentwicklung, aber auch in der Myokardregeneration von Zebrafisch und neonataler Maus eine wichtige Rolle. Sie können ähnlich wie Stammzellen in verschiedene Gewebe differenzieren und ihre Umgebung durch parakrine Signale beeinflussen. Es besteht die Hoffnung, dass mit einer geeigneten pharmakologischen Aktivierung der EPDC positive Effekte auf den Heilungsprozess nach Herzinfarkt auch in adulten Organismen erzielt werden können. Ideal wäre eine regenerative Zelltherapie durch Schaffung von vollwertigem vaskularisiertem und kontraktilen Ersatzgewebe mittels epikardialer Zellen. EPDC sind jedoch erst rudimentär erforscht.

In der vorliegenden Arbeit wurden EPDC aus infarzierten Herzen von Ratten isoliert und hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und der Wachstumsgeschwindigkeit, ihres chemotaktischen Potentials, ihrer möglichen Rolle im purinergen System sowie kardialer Vorprägung und des kardiomyogenen Transdifferenzierungspotentials unter Einfluss von bioaktiven Substanzen untersucht. Epikardiale Zellen zeigten in Kultur eine ähnliche Morphologie wie EPDC, die von anderen Arbeitsgruppen mit abweichenden Methoden isoliert wurden und glichen auch fetalen EPDC und EPDC aus nichtinfarzierten Herzen. Außerdem gab es bezüglich des Wachstumsmusters Parallelen zu anderen multipotenten mesenchymalen Populationen (sphärenartiges Wachstum und mögliche *myotubules*). Im Boyden-Kammer-Assay zeigten EPDC sowohl eine ungerichtete migratorische als auch chemotaktische Aktivität. Letzteres, wenn ATP oder FCS als chemoattraktive Lockstoffe eingesetzt wurden. Dabei war FCS ein starker, ATP hingegen nur ein schwacher Stimulus. Bezüglich des purinergen Signalsystems exprimierten EPDC CD39 und CD73, sodass epikardiale Zellen vermutlich zum Nukleotidabbau von ATP zu Adenosin befähigt sind. Da Adenosin insbesondere antiinflammatorisch wirkt, könnten EPDC eine entzündungsmodulierende Funktion ausüben. EPDC könnten auch selbst Ziel purinerner Signalgebung sein, da sie A_{2A} - und A_{2B} -Adenosinrezeptoren exprimieren. Damit zeigen EPDC insbesondere Parallelen zu dem Expressionsprofil kardialer Fibroblasten. Die Adenosinrezeptoren könnten ein Ansatzpunkt für eine mögliche pharmakologische Modulation der EPDC während des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt sein. Hinsichtlich kardialer Marker fand sich eine stabile Expression von *Troponin T* und *GATA4* auch unter Variation des Kulturmediums sowie nach einer längeren Kulturzeit. Dies ist ein starkes Indiz für ein kardiomyogenes Potential der Zellen, welches durch

geeignete therapeutische Manipulation genutzt werden könnte. Um die Möglichkeit einer Differenzierung von EPDC in Kardiomyozyten zu prüfen, wurden Differenzierungsexperimente unter Verwendung von 5-Azacytidin, Aktivin A, BMP4, FGF-2, IWP-2 und CHIR99021 durchgeführt. Unter keiner der gewählten Bedingungen ergaben sich morphologisch und auf Expressionsebene signifikante Unterschiede im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Dies schließt jedoch nicht aus, dass bei weiterer Optimierung der Versuchsbedingungen oder Einsatz anderer Wirkstoffe eine Differenzierung der EPDC in Kardiomyozyten dennoch erfolgreich sein könnte.

Summary

Coronary heart disease and associated conditions are one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. Therapeutic options are presently limited to endovascular widening of blocked coronary arteries and pharmacological optimization of pump function. Unfortunately, the availability of hearts for transplantation is limited. Ischaemic myocardial cell death triggers an inflammatory response which leads to clearance of necrotic cells and replacement of lost muscle with scar tissue. Moreover, after myocardial infarction, mesothelial epicardial cells from the outer layer of the heart are activated and transformed into mesenchymal EPDC (*epicardium-derived cells*). EPDC play a crucial role in embryonic cardiac development as well as in myocardial regeneration in zebrafish and neonatal mice. Similar to stem cells, EPDC give rise to various cardiac cells and provide instructive paracrine signals guiding cardiac development. It is hypothesized that pharmacological activation of EPDC by small molecules might elicit beneficial effects on myocardial healing also in adults. Ideal would be a stem cell based regenerative therapy finally leading towards newly formed vascularized and contractile myocardium. Until now, however, this goal has not been accomplished since only little is known about the biology of EPDC.

Aim of this thesis was to characterize cultured EPDC, isolated from the infarcted rat heart, regarding *in vitro* growth rate, chemotaxis, potential role in purinergic signaling, cardiomyogenic commitment and capability to differentiate into cardiomyocytes after treatment with bioactive molecules. We found that EPDC morphology was similar to what has been reported by others using different isolation procedures or different origin such as fetal EPDC and EPDC from non-ischaemic hearts. EPDC resembled other multipotent mesenchymal cell populations (growing in spheres and myotubules). Using a Boyden chamber assay, EPDC showed a non-directional migration as well as chemotaxis towards ATP and FCS. While ATP was only a weak stimulus, FCS had a strong effect on EPDC chemotactic migration. As to purinergic signaling, EPDC expressed CD39- and CD73 at the gene level, suggesting they are capable to degrade ATP to adenosine. Since adenosine is well known to exert an anti-inflammatory effect, EPDC can be expected to modulate inflammation after myocardial infarction. Aside of their active role in purine metabolism, EPDC are target of adenosine since they express A_{2A} - and A_{2B} -adenosine receptors. In this regard EPDC resemble cardiac fibroblasts. Interestingly, analysis of cardiac marker genes revealed that EPDC expressed *Troponin T* and *GATA4*, even after long-term cell culture. This suggests that EPDC show cardiogenic potential, which might be exploited by stimulation with small molecules. It was therefore tested whether 5-Azacytidin, Aktivin A, BMP4, FGF-2, IWP-2 and CHIR99021 have the ability to differentiate cultured EPDC into the cardiomyocytic lineage. However, none of the tested small molecules induced major phenotypic changes regarding

morphology and transcript levels of cardiac markers. This does not rule out the possibility that improved conditions may lead to cardiomyogenic transformation of EPDC.

Abkürzungsverzeichnis

A₁R	A ₁ -Rezeptor
A_{2A}R	A _{2A} -Rezeptor
A_{2B}R	A _{2B} -Rezeptor
A₃R	A ₃ -Rezeptor
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ADP	Adenosindiphosphat
ADSC	adipose-derived stem cells
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	bone morphogenetic protein
BMSC	bone marrow stromal cells
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CPC	cardiac progenitor cells/cardiovascular progenitor cells
C_T	cycle threshold
cTnT/Tnnt2	cardiac troponin T
d	Tag(e)
DNA	deoxyribonucleic acid
E-NTPDase	Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase
EKG	Elektrokardiogramm
EMT	Epithelial-mesenchymale-Transformation
EPDC	epicardium/epicardially derived cells
ESC	embryonal stem cells
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
Fc	fragment crystallisable
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FSTL1	Follistatin-like 1
g	Gramm, aber auch Erdschwerebeschleunigung
GSK3b	Glykogen-Synthase-Kinase 3b
h	Stunde(n)
hESC	human embryonal stem cells
HSC	hematopoietic stem cells
I/R	Ischämie/Reperfusion
I.E.	Internationale Einheiten
iPSC	induced pluripotent stem cells
Isl-1	Isl-1
KHK	Koronare Herzkrankheit
MACS	magnetic cell sorting

MHC	Myosin Heavy Chain
min	Minute(n)
miRNAs	micro messenger ribonucleic acid
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSC	mesenchymal stem cells
n.d.	not detected
NAD⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NTC	non-template control
p.c.	post conceptionem
P₁	1. Passage
P₂	2. Passage
P_d	population doubling time
PE	Phycoerythrin
PEO	proepikariales Organ
PTCA	perkutane transluminale Angioplastie
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	ribonucleic acid
Sca-1	stem cell antigen 1
SMC	smooth muscle cells
Tbp	TATA-box binding protein
TRITC	Tetramethylrhodamin
UCBSC	umbilical cord blood-derived stem cells
WT-1	Wilms' tumor protein 1

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Inhaltsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Der Herzinfarkt.....	1
1.1.1 Pathophysiologie des Herzinfarktes: Defektheilung nach steriler Entzündung ..	1
1.1.2 Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit: Ein globales Problem.....	2
1.1.3 Therapieansätze bei Myokardinfarkt.....	2
1.1.4 Die Rolle des purinergen Signalsystems während der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt.....	3
1.1.5 Zellmigration und Wundheilung.....	5
1.2 Zellbasierte regenerative Therapiemöglichkeiten bei Myokardinfarkt	6
1.2.1 Prinzip und Grundannahmen der kardialen Stammzelltherapie.....	6
1.2.2 Stammzellarten für die Herzregeneration nach Myokardinfarkt	7
1.2.3 Epikardiale Stammzellen.....	10
1.3 Ziele dieser Arbeit.....	17
2 Material	18
2.1 Geräte.....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Chemikalien & Antikörper	20
2.4 Kits und Assays.....	22
2.5 Sonden, Primer und TaqMan-Assays	22
2.6 Lösungen, Puffer, Zellkulturmedien.....	24
2.7 Software.....	26
3 Methoden	27
3.1 Isolation primärer EPDC nach kardialer Ischämie	27
3.1.1 Art und Herkunft der Tiere für die Organentnahme	27
3.1.2 Kardiale Infarzierung mittels Ischämie/-Reperfusionstechnik.....	27
3.1.3 Isolation primärer EPDC nach Organentnahme	27
3.2 Zellkultur.....	28
3.2.1 Aussaat nach der Isolation.....	28
3.2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen.....	28
3.2.3 Zellpassage und Neuaussaat	29
3.3 Magnetische Zellseparation von Immunzellen und EPDC.....	29
3.4 Bestimmung der Generationszeit.....	32
3.5 Migrationsassay	33
3.6 Transdifferenzierungsexperimente	35
3.6.1 5-Azacytidin induzierte kardiogene Differenzierung	35

3.6.2	Transdifferenzierungsexperimente mit Aktivin A, BMP4, FGF-2, Wnt-Inhibitoren und Wnt-Aktivatoren	36
3.7	Expressionsanalysen mittels quantitativer <i>Real-Time PCR</i>	38
3.7.1	Prinzip der qPCR	38
3.7.2	Herkunft der Proben für die qPCR	39
3.7.3	RNA-Isolation	39
3.7.4	Reverse Transkription.....	40
3.7.5	Real-time PCR.....	40
3.7.6	Relative Quantifizierung mit der ΔC_T - und $2^{-\Delta \Delta C_T}$ (Livak)-Methode	41
3.8	Statistische Datenanalyse	42
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Morphologie und Wachstumsmuster epikardialer Zellen nach Myokardinfarkt.....	43
4.2	Populationsverdopplungszeit und Wachstumsverhalten nach Myokardinfarkt.....	45
4.3	Migratorische Kapazität von EPDC	47
4.4	Basales Expressionsprofil von EPDC	49
4.4.1	Expression ausgewählter Enzyme und Rezeptoren des purinergen Signalsystems	49
4.4.2	Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine.....	50
4.5	Transdifferenzierungspotenzial von EPDC	53
4.5.1	Einfluss von 5-Azacytidin auf die kardiomyogene Differenzierung von EPDC..	53
4.5.2	Einfluss von Aktivin A, BMP4, FGF-2 sowie eines Wnt-Aktivatoren und -Inhibitors auf die kardiomyogene Differenzierung von EPDC.....	54
5	Diskussion.....	57
5.1	Wachstumsverhalten und Kulturmorphologie.....	57
5.1.1	EPDC zeigen typische Wachstumsmuster und ähneln morphologisch mesenchymalen Stammzellen sowie kardialen Vorläuferzellen.....	57
5.1.2	EPDC zeigen nach Myokardinfarkt eine gesteigerte Proliferationskapazität....	60
5.2	Migratorisches Potenzial kultivierter EPDC	63
5.2.1	Optimierung der Boyden-Kammer-Methode für EPDC.....	63
5.2.2	EPDC besitzen migratorische Fähigkeiten	64
5.3	EPDC als aktive Teilnehmer im purinergen Signalsystem nach Myokardinfarkt.....	66
5.4	Kardiomyogene Prägung von EPDC	70
5.4.1	EPDC exprimieren basal kardiomyogene Marker	70
5.4.2	Die Transkripte kardialer Markergene stammen nicht aus einer Kontamination der EPDC mit Kardiomyozyten.....	71
5.5	Das Transdifferenzierungspotenzial von EPDC bleibt ungeklärt.....	72
5.5.1	5-Azacytidin induziert nicht die Differenzierung von EPDC in Kardiomyozyten	72
5.5.2	Rekapitulation der Embryonalentwicklung durch bioaktive Moleküle.....	74
5.6	Resümee und Ausblick	77
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Abbildungsverzeichnis.....	98
8	Tabellenverzeichnis	99
	Danksagung.....	100

1 Einleitung

1.1 Der Herzinfarkt

1.1.1 Pathophysiologie des Herzinfarktes: Defektheilung nach steriler Entzündung

Der Herzmuskel arbeitet kontinuierlich und ist auf eine bedarfsgerechte Versorgung mit Energieträgern und Sauerstoff aus dem Blut angewiesen [1]. Das Gefäßsystem des Herzens besteht aus zwei Hauptgefäßen, der rechten und der linken Koronararterie. Diese entspringen der Aorta, der großen Körperschlagader. Die Koronargefäße wiederum verzweigen sich in kleinere Arterien und schließlich Kapillaren; sie sind letztlich aber funktionelle Endarterien, sodass zwischen den großen Ästen kaum Verbindungen (Anastomosen) bestehen [2]. Verschießt sich ein Gefäß, so wird der Blutfluss zum zugehörigen Teil des Herzmuskels unterbrochen und die Muskulatur geht zugrunde.

Im Laufe des Lebens entstehen degenerative Veränderungen an den Gefäßwänden. Dabei kommt es zur Ablagerung von Lipiden, Entzündungszellen und extrazellulärer Matrix in den inneren Schichten der Gefäßwand, die zu einer chronischen lokalen Entzündungsreaktion führen (Plaquebildung, Atherosklerose) [3]. Allein durch die Plauebildung wird der Gefäßdurchmesser und damit der Blutfluss bereits verringert (Stenose). Die Atherosklerose der Koronarien kann so zu einer relativen oder absoluten Minderdurchblutung (Ischämie) des Herzmuskelgewebes (Myokard) führen. Die relative Minderdurchblutung ergibt sich aus der atherosklerotischen Verengung der Gefäße, die absolute Minderdurchblutung durch den akuten Verschluss eines Koronarsegmentes [4]. Dieser entsteht meist durch die Ruptur der fibrösen Kappe eines Plaques, wodurch die darunterliegenden Gewebekomponenten in Kontakt mit dem vorbeiströmenden Blut kommen [3]. Durch die erodierte Oberfläche des Plaques wird die Bildung eines Gerinnsels (Thrombus) an der rupturierten Läsion gefördert [3]. Es kommt zum akuten Gefäßverschluss auf dem Boden der chronischen Stenosierung. Durch die eingeschränkte Ausprägung der Anastomosen wird das Myokard im Bereich des Versorgungsgebietes des betroffenen Gefäßes minderdurchblutet.

Die Ischämietoleranz des Herzens ist im Vergleich zu anderen Organen und Geweben gering. Das Absterben von Herzmuskelzellen (Nekrose) beginnt bereits nach 20 Minuten [5]. Dieser Zelltod myokardialer Zellen aufgrund einer ischämischen Minderdurchblutung wird als Myokardinfarkt bezeichnet [6]. Etwa eine Milliarde oder mehr Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) gehen bei einem akuten Myokardinfarkt zugrunde [5, 7]. Das Absterben der Herzmuskelzellen kann nur durch eine rasche Wiedereröffnung des Gefäßes in seinem Ausmaß begrenzt werden. Die Wie-

dereröffnung wird am häufigsten mittels Ballondilatation (PTCA, perkutane transluminale Angioplastie) und Einsetzen eines Metallgitterröhrchens (Stent) erreicht [8]. So kann ein Teil der betroffenen Zellen vor dem Zelltod gerettet werden.

Im Bereich der Nekrose zeigt sich nach dem Akutereignis eine sterile Entzündungsreaktion, bei der Immunzellen das abgestorbene Gewebe beseitigen [9] und das nekrotische Gewebe von einer überwiegend bindegewebigen (fibrösen) Narbe ersetzt wird [10]. Diese stabilisiert zwar das Organgefüge und verhindert ein Einreißen der Herzkammern am Ort der Ischämie, ist jedoch weder zur Kontraktion noch zur elektrischen Kopplung mit dem verbliebenen Muskelgewebe fähig [11]. Folgen sind eine Herzinsuffizienz durch eine verschlechterte Pumpfunktion und maligne Herzrhythmusstörungen [12, 13]. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es durch Überlastung der übrigen Kardiomyozyten zu weiterem diffusem fibrösem Gewebeumbau (engl. *remodelling*) im gesamten Organ [14]. Dies führt zu einer Gefügedilatation und die Pumpfunktion verschlechtert sich zunehmend [12, 13]. Auch ohne akuten Infarkt ist die Herzinsuffizienz das Endstadium vieler chronischer Herzkrankheiten [15]. Alle Erkrankungen, die auf eine Minderdurchblutung der Herzkranzgefäße zurückzuführen sind, werden unter dem Oberbegriff der ischämischen oder koronaren Herzkrankheit (KHK) zusammengefasst [16].

1.1.2 Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit: Ein globales Problem

KHK, insbesondere ausgeprägt als akuter Herzinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz, ist die häufigsten Ursache für Mortalität und Morbidität weltweit [17]. In Deutschland betrug die Lebenszeitprävalenz in einer Kalkulation von 2013 9,3% in der Gruppe der 40-79-Jährigen [18]. Die KHK bleibt trotz verbesserter Therapieansätze eine enorme Belastung, sowohl für das Individuum als auch in ökonomischer Hinsicht. Die direkten und indirekten Kosten der koronaren Herzkrankheit sind dementsprechend hoch [19]. So kostet z.B. die Therapie eines 65-jährigen Patienten mit einer symptomatischen KHK über 15–20 Jahre zwischen 20.000 und 25.000 Euro [19]. Jeder fünfte Sterbefall ist laut dem statistischen Bundesamt auch in Deutschland durch die Folgen einer koronaren Herzkrankheit bedingt [20]. Trotz guter Fortschritte in der Akuttherapie lag die Letalität nach einem akuten Herzinfarkt innerhalb von 28 Tagen nach dem Ereignis im Jahr 2003 laut MONICA/KORA-Herzinfarktregister Augsburg immer noch bei fast 42 % [20]. Außerdem hat das verbesserte Überleben paradoxerweise zu einer Steigerung der Patienten mit Herzinsuffizienz geführt [21], eine Erkrankung, für die es kein Heilmittel gibt [22] und die ähnlich häufig und rasch wie Tumorerkrankungen tödlich verläuft [23].

1.1.3 Therapieansätze bei Myokardinfarkt

Bislang gibt es im Stadium der terminalen Herzinsuffizienz als Folge der KHK nur eingeschränkte Behandlungsmöglichkeiten. Symptomatisch soll der Einsatz von Medikamenten die Herzar-

beit verbessern. Eine Herztransplantation ist zum heutigen Zeitpunkt die einzige kausale Behandlung [24, 25]. Der hohen Prävalenz steht jedoch nur eine geringe Anzahl an Spenderorganen gegenüber. Auch ist eine Transplantation mit vielen Risiken und Einschränkungen der Lebensqualität verbunden. Eine lebenslange Behandlung mit immunsuppressiven Substanzen und die damit einhergehende erhöhte Anfälligkeit für Infektions- und Tumorerkrankungen sind ein hoher Preis [26, 27] und eine Abstoßungsreaktion auf das fremde Organ ist jederzeit möglich. Die höchste Prävalenz liegt außerdem in der Gruppe der Älteren, sodass eine Transplantation aufgrund der OP-Risiken sowie der Begleiterkrankungen oft unmöglich ist. Infolge der sozioökonomischen Belastung durch die ischämische Herzkrankheit wird intensiv nach neuen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Eine Therapiemöglichkeit könnte die pharmakologische Optimierung der Heilungsvorgänge sein. Da diese einer sterilen Entzündungsreaktion mit narbig-reparativem Abschluss entsprechen, ist die Aufklärung der genauen Signalkaskaden und der beteiligten Zellgruppen für die Entwicklung neuer Therapieansätze essentiell [28]. Wichtige Teilaspekte von Entzündung und Wundheilung sind bestimmte Signalwege wie das purinerge System, aber auch Fähigkeiten einzelner Zellpopulationen in der entzündlichen Umgebung wie Migration, Phagozytose und Zellteilung. Für die Entwicklung von Wirkstoffen, die in diese Vorgänge optimierend eingreifen und so die Schwere des Defektzustandes mildern können, ist eine weitere Aufklärung dieser pathophysiologischen Abläufe notwendig. Alternativ gibt es Forschungsansätze zur Differenzierung von Stamm- oder Vorläuferzellen in Zellen eines Ersatzgewebes. Insbesondere in Bezug auf den letzten Punkt wird die große Hoffnung gehegt, dass das nekrotische Areal durch neues, voll funktionsfähiges Myokardgewebe ersetzt werden könnte [29].

1.1.4 Die Rolle des purinergen Signalsystems während der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt

Da die Reaktion des Organismus auf einen Herzinfarkt einer sterilen Entzündung entspricht, geht man davon aus, dass eine effiziente kardiale Regeneration nicht nur den Ersatz von verlorenen Kardiomyozyten und die Neubildung von Gefäßen, sondern auch eine angemessene Modulation der inflammatorischen Antwort erfordert [30]. Eine überschießende oder verlängerte Immunantwort kann zu einer Einschränkung der Herzfunktion führen [31]. Folglich spielt die Erforschung und perspektivisch die therapeutische Beeinflussung der Entzündungsvorgänge eine wichtige Rolle zur Verbesserung der Herzinfarktfolgen [28, 31, 32]. So könnten ein maladaptives *remodelling* und damit eine zunehmende Herzinsuffizienz verhindert werden [33].

Von zentraler Bedeutung für die Entzündungsreaktion ist das purinerge Signalsystem [34]. Purinerge Verbindungen werden in Form von Nukleosiden und Nukleotiden passiv aus toten Zellen freigesetzt [35, 36] und aktiv aus Immun- und anderen Zellen sezerniert [36, 37]. Sie werden über Enzyme modifiziert oder abgebaut. Die Zwischen- oder Endprodukte können eine Reihe

von Rezeptoren aktivieren und so verschiedene Stoffwechselwege anstoßen. Insgesamt ist der purinerge Stoffwechsel- und Signalweg ein komplexes System und umfasst eine Vielzahl von Kanälen, Transportern, Enzymen und Rezeptoren [28]. Sind Nukleotide wie ATP, ADP, AMP und NAD^+ im Extrazellulärraum vorhanden, dienen sie unter anderem als chemotaktische Lockstoffe [35]. Sofern die Verbindungen selbst nicht als Signalmolekül aktiv sind oder in die Zellen aufgenommen werden, erfolgt ein Abbau der Nukleotide durch membranständige Enzyme. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl kardiale Immun- [28] als auch Endothelzellen [38] und glatte Muskelzellen (engl. *smooth muscle cells*, SMC) [39] Enzyme zum Abbau purinerner Verbindungen besitzen. So wird z.B. extrazelluläres ATP rasch durch Ektonukleotidasen abgebaut [40, 41] (schematische Darstellung in Abbildung 1.1): Die Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase 1) wird auf der Zelloberfläche exprimiert und entspricht dem Oberflächenmerkmal CD39. Sie hydrolysiert extrazelluläres ATP zu AMP [40, 42]. Das Nukleotid-Monophosphat AMP kann wiederum durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 zu Adenosin dephosphoryliert werden [42].

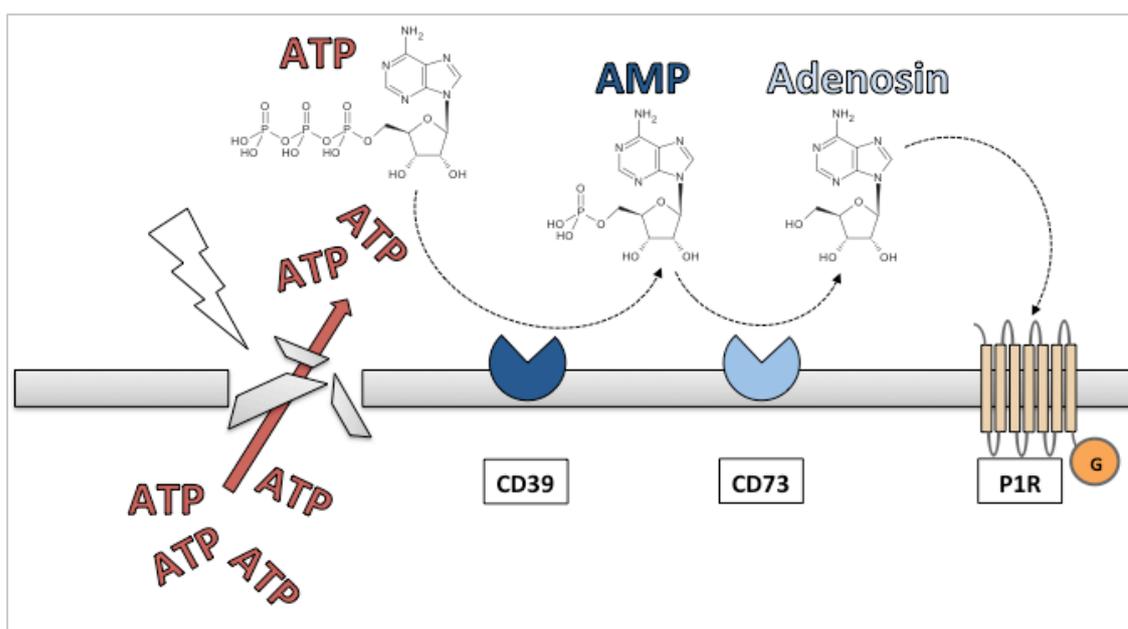


Abbildung 1.1: Abbau von ATP im purinergen Signalsystem. Schematisch dargestellt sind die Substrate, Ektoenzyme und Rezeptoren, die in dieser Arbeit untersucht wurden. ATP wird nach Zellschädigung in den extrazellulären Raum freigesetzt. Dort erfolgt der Abbau u.a. durch die E-NTPDase 1 (CD39) zu AMP. AMP wird durch die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 zu Adenosin dephosphoryliert. Adenosin kann über G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren als Signalmolekül wirken. P1-Rezeptoren (P1R) sind die spezifischen G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren A_1R , $A_{2A}R$, $A_{2B}R$, A_3R . Modifiziert nach [28, 43].

CD73 spielt hier eine zentrale Rolle, da das von diesem Enzym gebildete Adenosin immunmodulatorisch, insbesondere häufig entzündungshemmend (antiinflammatorisch) wirkt [28, 34, 44, 45]. Adenosin bindet im Extrazellulärraum auto- oder parakrin an zellmembranständige, G-

Protein-gekoppelte Rezeptoren. Es gibt vier Unterformen des G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptors: A₁R, A_{2A}R, A_{2B}R und A₃R [46, 47].

Die Aktivierung der Rezeptoren hat Einfluss auf die Aktivität der Adenylatcyclase, die abhängig vom Rezeptortyp aktiviert oder inhibiert wird und damit intrazelluläre Signalwege reguliert. Der A₁-Rezeptor A₁R hat in vielen Geweben proinflammatorische Effekte [48]. Der A_{2A}-Rezeptor (A_{2A}R) sorgt z.B. nach Aktivierung auf Endothelzellen durch Adenosin für eine Vasodilatation. Er wird außerdem auf den meisten Immunzellen exprimiert; seine Aktivierung hat häufig entzündungshemmende Effekte [49]. So konnte z.B. der experimentelle Einsatz von A_{2A}R-Agonisten im Herzinfarktmodell die Infarktgröße reduzieren [48, 50-52]. Der A_{2B}-Rezeptor (A_{2B}R) und der A₃-Rezeptor (A₃R) können sowohl anti- als auch proinflammatorische Effekte haben [48, 53]. Welche Zellen an der purinergen Signalgebung während der Entzündungsvorgänge nach Herzinfarkt beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.1.5 Zellmigration und Wundheilung

Migration, also die Fähigkeit sich von der Ursprungsstellung zu einem anderen Ort im Gewebe zu begeben, beherrschen nur bestimmte Zellen in adulten Säugetieren. Migration spielt eine zentrale Rolle in einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge [54], z.B. bei der Bildung neuer Gewebe oder Organe in der Embryogenese und bei der Tumorbildung. Zellarten, die normalerweise über keine migratorischen Fähigkeiten verfügen weil sie im Gewebsverband verankert sind und die nötigen Umbauvorgänge des Zytoskelettes nicht beherrschen, können durch Änderung ihres Phänotyps diese Fähigkeit sekundär erlangen. Eine besondere Form der Migration ist die Chemotaxis. Der Begriff bezeichnet die gerichtete Wanderung von Zellen entlang eines Lockstoffgradienten, im Falle der Wundheilung zum Entzündungsort [55, 56]. Während der Wundheilung nach Herzinfarkt ist der Ortswechsel von Zellen im Sinne von Migration und Chemotaxis unerlässlich [54]. So initiiert die chemotaktische Anlockung von Immunzellen und Bindegewebsvorläufern zum Ort der Gewebsschädigung den Beginn der Reparaturvorgänge. Außerdem ist Zellmigration entscheidend für technologische Anwendungen wie *tissue engineering*, z.B. im Rahmen der Besiedlung von Biomaterialien [54]. In diesem Sinne sind migratorische Fähigkeiten von Zellen und deren mögliche Beeinflussbarkeit ein breites Forschungsgebiet für mögliche Therapieansätze zur verbesserten Wundheilung nach Herzinfarkt.

1.2 Zellbasierte regenerative Therapiemöglichkeiten bei Myokardinfarkt

1.2.1 Prinzip und Grundannahmen der kardialen Stammzelltherapie

Obwohl das Säugetierherz unfähig ist, sich über die frühen postnatalen Stadien hinaus adäquat zu regenerieren [57], haben moderne klinische Interventionen bewirkt, dass weniger Patienten an ihrem Myokardinfarkt versterben [20]. Dies führt jedoch auch dazu, dass immer mehr Patienten mit einer Infarkt Narbe leben, welche die kardiale Funktion beeinträchtigt und schließlich zu fortschreitender Herzinsuffizienz führt [58]. Im Gegensatz zu vielen anderen Herzerkrankungen wie Arrhythmien und Klappenerkrankungen gibt es für das infarzierte Herz und die chronische Herzinsuffizienz keine kausale Heilungsmöglichkeit [59] außer der Herztransplantation [60]. Der Einsatz dieser Therapie ist durch die Knappheit der Spenderorgane und die Komplikationen der immunsuppressiven Therapie oder Organabstoßung begrenzt [61]. Die chronische Herzinsuffizienz, die häufig nach einem Myokardinfarkt auftritt, ist daher tödlicher als die meisten Tumorerkrankungen [23, 62]. Aus diesem Grund wird intensiv auch an zellbasierten Therapien für die Herzmuskelregeneration geforscht [30]. Das primäre Ziel der regenerativen Medizin ist die vollständige strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des geschädigten Organs [63]. Myokardiale Reparatur erfordert dabei nicht nur den Ersatz von Kardiomyozyten, sondern auch Gefäße zu ihrer Versorgung, also die Neubildung von verschiedenen Gewebearten [63], sowie eine angemessene Modulation der inflammatorischen Antwort [30]. Zelltherapie verspricht verlorene Muskelzellen zu ersetzen (Myogenese) und überlebende Zellen zu reperfundieren (Angiogenese) [64]. Der Einsatz von Vorläufer- oder Stammzellen könnte diese Anforderungen erfüllen. Eine Stammzelle ist definiert als relativ undifferenzierte, proliferative Zelle, die eine Reihe von differenzierten Nachkommen hervorbringt und sich gleichzeitig klonal und selbsterneuernd teilt [65]. Bislang ist nicht eindeutig geklärt, welche Zellpopulation am besten für regenerative Therapievorhaben geeignet ist. Prinzipiell gibt es zwei Gruppen von Stammzellen: Pluripotente Zellen, die alle Zelltypen des Organismus hervorbringen können und gewebsspezifische Stammzellen, die häufig bereits vorgeprägt sind und in erster Linie Zellen des Gewebes hervorbringen, das ihrer natürlichen Umgebung im Organismus entspricht [63, 66].

Eine geeignete Mischung an Wachstumsfaktoren oder anderen bioaktiven Molekülen könnte *in vitro* durch Aktivierung eines entsprechenden Expressionsprofils eine Reifung (Differenzierung) oder Umwandlung (Transdifferenzierung) der Stamm- und Vorläuferzellen in funktionsfähige Kardiomyozyten induzieren. Anschließend könnten sie transplantiert werden, müssen sich dann aber elektrisch und mechanisch in das Herz integrieren [29]. Autologe Zellen, bei denen Entnahme und Transplantation im selben Organismus erfolgen, werden bei zellbasierten Therapien bevorzugt, da sie im Empfänger keine Abstoßungsreaktionen provozieren und die Einnahme immunsuppressiver Medikamente überflüssig machen [67, 68].

Alternativ wird eine Umwandlung ortsansässiger Zellen in Kardiomyozyten angestrebt, die dann *in vivo*, unter Umgehung der Zellkultur, kontraktiles Gewebe bereitstellen [69-71].

Bei der Suche nach geeigneten Zellen, die sich nach Induktion in kontraktionsfähige Kardiomyozyten umwandeln, gab es bereits unzählige Ansätze mit allenfalls mäßigem Erfolg. Vielen Zellgruppen wurde nachgesagt, dass sie unter bestimmten Bedingungen kardiomyozytenähnliche Zellen *in vivo* oder *in vitro* bilden können. Der Großteil der klinischen Studien mit autologen Zelltypen, insbesondere denen des Knochenmarkes, zeigte jedoch ein moderates bis enttäuschendes Ergebnis [72]. Es gibt bislang keinen Konsens, ob die *in vitro* vordifferenzierten Zellen *in vivo* überhaupt effizient zu neuen Herzmuskelzellen beitragen können [30]. Die verbesserte Herzfunktion wurde häufig eher parakrinen Nebeneffekten zugeschrieben, da die transplantierten Zellen auf lange Sicht nur selten in dem Organ persistierten, in welches die Transplantation erfolgte [67, 73, 74].

1.2.2 Stammzellarten für die Herzregeneration nach Myokardinfarkt

Embryonale Stammzellen (*embryonal/embryonic stem cells*, ESC, wenn menschlichen Ursprungs auch *human embryonal/embryonic stem cells*, hESC) sind pluripotent und haben somit das größte Differenzierungspotential im Vergleich zu anderen Zellen, da sie in alle Zellarten des adulten Organismus differenzieren können [75]. Bezüglich der Kardiomyogenese wurde gezeigt, dass sie *in vitro* bei Zusatz von Serum spontan in kontraktile Kardiomyozyten differenzierten, allerdings nur in geringer Anzahl [76]. Die Induktion mit dem DNA-demethylierenden Agens 5-Azacytidin [77, 78] sowie Differenzierungsprotokolle mit BMP4 (engl. *bone morphogenetic protein*) und Aktivin A konnten die Konversionsraten deutlich steigern [78-81]. Auch eine Manipulation des Wnt-Signalweges mit aktivierenden und hemmenden Substanzen war für eine kardiale Differenzierung der ESC förderlich [82]. Die Immunogenität des Gewebes limitiert jedoch den Einsatz der ESC, da es sich um Zellen eines fremden (allogenen) Organismus handelt und sie eine Abstoßungsreaktion hervorrufen können [83]. Die Bildung von Teratomen durch die Tendenz zur überschießenden Proliferation [5, 84] und die begrenzte Verfügbarkeit aufgrund von ethischen Bedenken sind weitere kritische Punkte bei der Entwicklung von Therapien mit ESC [85].

Mittels Reprogrammierung von patienteneigenen Bindegewebszellen durch die Übertragung definierter Transkriptionsfaktoren können *in vitro* pluripotente, ESC-ähnliche Stammzellen erzeugt werden, die in viele verschiedene Gewebetypen differenzieren können (*induced pluripotent stem cells*, iPSC) [86-89]. Die Anwendung von Differenzierungsprotokollen, die ursprünglich für die Umwandlung von ESC in Kardiomyozyten verwendet wurden, wie z.B. die Stimulation mit Agonisten und Antagonisten des Wnt-Signalweges, waren auch bei iPSC erfolgreich [82]. Immer häufiger versucht man jedoch den pluripotenten Zustand bei der Reprogrammierung von

Zellen zu umgehen. Denn der pluripotente Status ist risikobehaftet, z.B. entstehen während der Reprogrammierung chromosomale Veränderungen, die denen von Tumorzellen ähneln [90]. Durch die unbeschränkten Differenzierungsmöglichkeiten besteht bei pluripotenten Zellpopulationen außerdem letztlich immer das Risiko der Teratomentstehung [91]. Ein alternativer Ansatz ist die direkte Umwandlung adulter somatischer Zellen in einen gewünschten Zelltyp (engl. *direct lineage reprogramming*) [92-94]. So zeigten z.B. eine geringe Anzahl kardialer Fibroblasten sowohl *in vitro* [93] als auch *in vivo* [95] nach retroviraler Überstellung der Transkriptionsfaktoren *GATA4*, *MEF2C* und *Tbx5* einen kardiomyozytenähnlichen Phänotyp, der zum Teil jedoch noch deutliche Unreifezeichen aufwies [93]. Die Zugabe weiterer modifizierender Transkriptionsfaktoren konnte die kardiomyogene Differenzierung von Fibroblasten verschiedenster Herkunft deutlich verbessern [96].

Eine weitere interessante Technik ist die Transdifferenzierung somatischer Zellen mittels MicroRNAs (miRNAs). Dabei handelt es sich um kurze regulatorische RNAs, welche die Repression oder Degradation von DNA-Transkripten regulieren [97, 98]. Dadurch können die Genexpression und damit biologische Prozesse wie Stammzeleigenschaften und Differenzierung beeinflusst werden [98, 99]. Mittels der miRNA-Technik konnten Jayawardena et al. bei kardialen Fibroblasten *in vitro* ebenfalls einen kardiomyozytenähnlichen Phänotyp induzieren [92]. Die Effizienz war jedoch gering und die generierten Zellen hatten auch hier einen unreifen, eher neonatalen Phänotyp.

Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen sind iPSC, Zellen aus *direct lineage reprogramming* und andere adulte Stamm- oder Vorläuferzellen ethisch unbedenklich und relativ leicht zu gewinnen. Sie ermöglichen eine autologe Zelltransplantation, sodass eine Abstoßungsreaktion nicht provoziert wird und eine Immunsuppression folglich nicht notwendig ist [67, 68]. Weitere Kandidaten finden sich im Knochenmark, welches naturgemäß unreife Vorläuferzellen enthält. Neben den hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC), welche die zellulären Blutbestandteile bilden, lassen sich aus dem Knochenmark auch bindegewebige Stützzellen in Form von *mesenchymal stem cells* isolieren [100, 101] (*MSC*, inkonsistent auch *bone marrow stromal cells* (*BMSC*), *mesenchymal stromal cells*, *multipotent mesenchymal stromal cells*). Sie sind eine heterogene Zellpopulation, da sie primär nur durch ihre Plastikadhärenz aus Knochenmarksstanzen isoliert wurden [102]. Sie können *in vitro* nach standardisierten Protokollen in bestimmten Zellkulturmedien in Skelettmuskel-, Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenzieren [103]. Durch Inkubation mit Substanzen wie 5-Azacytidin, BMPs, und *fibroblast growth factor 2* (FGF-2) wurden auch kardiomyozytenähnliche Zellen generiert [64, 104-107]. Nach Transplantation dieser transdifferenzierten Zellen ins infarzierte Nagerherz wurde ein reduziertes *remodelling* und eine verbesserte Herzfunktion beobachtet [64, 105, 106, 108-110]. Es ist jedoch

unklar, inwiefern die verbesserte Herzfunktion tatsächlich durch Zellregeneration verursacht wurde. Mittlerweile glaubt man, dass die Erfolge eher auf parakrinen Effekten wie Förderung der Neovaskularisation, Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Aktivierung endogener kardialer Stammzellen beruhen und nicht auf dem Ersatz von Herzmuskelzellen durch die transplantierten MSC [111, 112]. Zellen, die viele Eigenschaften mit den MSC des Knochenmarks teilen, wurden mittlerweile auch in anderen Organen entdeckt [113], z.B. *adipose-derived stem cells* (ADSC) im Fettgewebe. Sie differenzieren teilweise nach ähnlichen Protokollen wie MSC des Knochenmarks in kardiomyozytenähnliche Zellen [114].

Lange Zeit wurde vermutet, dass physiologisch postnatal kaum noch eine Neubildung von Kardiomyozyten erfolgt. Größenwachstum während der Kindheit sollte in dem „postmitotischen“ Organ nach dem frühen Säuglingsalter allein durch Hypertrophie erfolgen [115]. Interessanterweise konnten verschiedene Arbeitsgruppen in den vergangenen Jahren zeigen, dass auch im adulten Organismus kontinuierlich eine Neubildung von Herzmuskelzellen stattfindet [116-120]. In erster Linie dient dies zum Erhalt der Gewebemöostase, aber auch im Sinne eines ineffektiven Reparaturmechanismus mit einer erhöhten Teilungsrate nach Myokardinfarkt [120, 121]. Die postulierte Effektivität schwankt je nach eingesetzter Methodik, liegt jedoch in den meisten Studien bei einer niedrigen jährlichen Teilungsrate von <1 % [122].

Die endogenen Zellen, welche im Herzen von Säugetieren Teilungs- und Regenerationsfähigkeit haben, werden unter dem Oberbegriff der kardiovaskulären Vorläuferzellen zusammengefasst (CPC, engl. *cardiac progenitor cells* oder *cardiovascular progenitor cells*,) [120, 123, 124]. Sie wurden bei verschiedenen Säugetieren nachgewiesen, unter anderem beim Menschen und bei Ratten [120, 124]. CPC können unter bestimmten Bedingungen *in vivo* und *in vitro* Herzmuskelzellen oder zumindest kardiomyozytenähnliche Zellen bilden [125-129]. CPC wurden anhand verschiedener Oberflächenmarker wie *c-kit* und *Sca-1* oder der Expression kardialer Transkriptionsfaktoren wie *Islet-1 (Isl-1)*, *NKx2.5* oder *MEF2C* identifiziert, benannt und in Subpopulationen unterteilt. Sie sind in der Lage *in vitro* Kardiomyozyten in geringer Anzahl zu bilden oder nach Transplantation ins Herz die Pumpfunktion zu verbessern [61, 112, 113, 116, 118 119]. Zudem zeigte sich an CPC, dass u.a. 5-Azacytidin - ähnlich wie bei ESC, iPSC und MSC - als Induktor der Kardiomyogenese fungieren kann [118]. In den letzten Jahren rückten außerdem zunehmend *cardiosphere-derived cells* als potenzielle CPC-Kandidaten für die Herzregeneration in den Fokus der Forschung [127, 130]. Sie können verschiedene Zellen der kardiovaskulären Linie hervorbringen, nachdem sie *in vitro* sphärische Kolonien gebildet haben (engl. *cardiospheres*, Übersichtsartikel [127]).

Die Arbeit mit CPC hat einige entscheidende Vorteile. Sie sind autolog, sodass eine Immunreaktion auf neues Gewebe nicht zu erwarten und eine entsprechende Medikation nicht notwendig

ist. Günstig ist auch, dass sich die Zellen bereits vor Ort befinden, sodass auf eine Implantation ggf. verzichtet werden könnte. Außerdem wird eine Vorprägung in Richtung einer kardiomyozytären Linie angenommen (engl. *commitment*) [63] und eine Differenzierung in „falsches Gewebe“, wie etwa bei den ESC oder Teratombildung muss nicht befürchtet werden [66, 131]. Obwohl sich die ersten Arbeiten mit CPC vielversprechend zeigen, sind die Eigenschaften der Zellen und der Grad der Überlappung der verschiedenen Gruppen größtenteils noch unerforscht [67].

1.2.3 Epikardiale Stammzellen

Das Epikard während der Herzentwicklung

Das Epikard ist die äußerste Gewebeschicht des Herzens. Es bedeckt den Herzmuskel und bildet das innere Blatt des Herzbeutels. Lange Zeit wurde angenommen, dass es die einzige Funktion dieser Mesothelzellen sei, die reibungsreduzierte Bewegung des Herzens im Herzbeutel zu ermöglichen. Erst seit wenigen Jahren ist bekannt, dass diese unscheinbare Gleitschicht entwicklungsgeschichtlich, und möglicherweise auch im adulten Organismus, umfänglichere Aufgaben hat (die nachfolgend geschilderte kardiale Organogenese und die Beteiligung der epikardialen Zellen ist zur besseren Nachvollziehbarkeit der anatomischen Verhältnisse in Abbildung 1.2 schematisch dargestellt). Den Anfang nimmt die Herzentwicklung im Mesoderm, dem mittleren der drei Keimblätter des Embryos, im Bereich der sogenannten kardiogenen Zone. Durch Spaltbildung innerhalb des Mesoderms um die kardiogene Zone entsteht hier eine primäre Herzbeutelhöhle (Perikardhöhle) [132]. Aus der Splanchnopleura, dem primitiven Mesothel der Brusthöhle, bildet sich die kardiale Platte ((**1**) in Abbildung 1.2). Durch Wölbung des Embryos nähern sich deren Schenkel einander an ((**2**) in Abbildung 1.2) und durch Fusion entsteht der Herzschlauch im Sinne eines zweischichtigen Rohres ((**3**) in Abbildung 1.2) [133]. Er besteht aus Vorläufern des Endokards und des Myokards, dazwischen liegt die noch azelluläre Herzgallerte. Die räumliche Unterteilung des Herzschlauches beginnt mit Bildung der Herzschleife, die später in die Trennung des Herzens in Ventrikel und Vorhöfe münden wird [134]. Im Bereich der venösen Einstrombahn des Herzens entsteht das Proepikard [135] ((**4**) in Abbildung 1.2). Diese als „blumenkohlartig“ beschriebene Struktur bildet z.T. Gewebsbrücken zur Herzoberfläche [136], teils aber auch frei flottierende Zellklumpen [137-140] um die primitive Perikardhöhle zu durchqueren und die Oberfläche des Herzens zu erreichen. Die fingerförmigen Ausläufer, die bei einigen Spezies beobachtet werden, haben die Bezeichnung „proepikardiales Organ“ (PEO) erhalten, auch wenn die Abgrenzung dieser Struktur nach neuern Überlegungen nicht mehr regelhaft getätigt wird [141, 142].

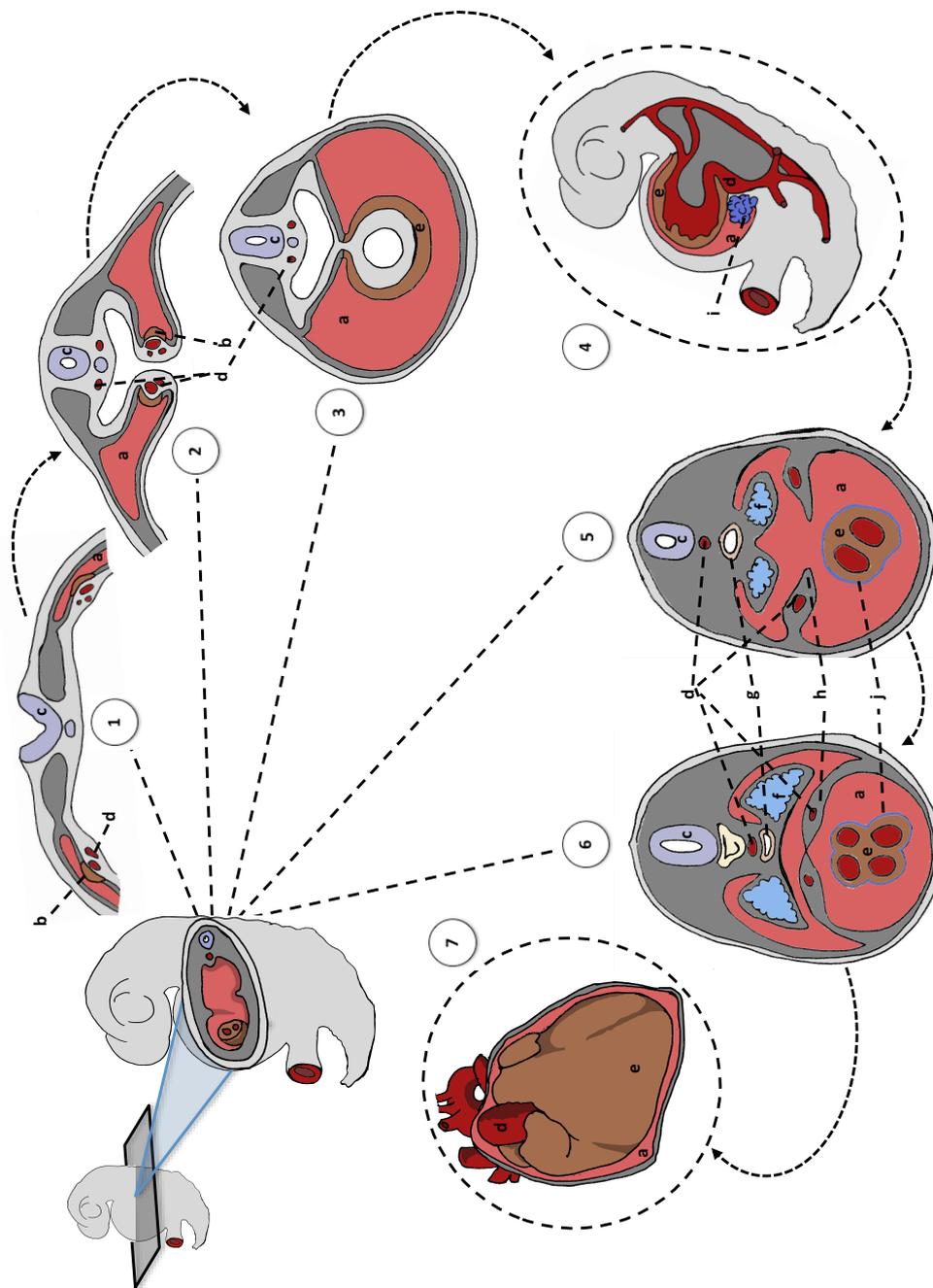


Abbildung 1.2: Embryonale Herz- und Epikardentwicklung. (1): Im Mesoderm bildet sich zunächst in der Splanchnopleura die kardiogene Platte. (2) & (3): Durch Annäherung und Verschmelzung entsteht der Herzschlauch, der sich zunächst nur in Endokard und Myokard untergliedert. (4): Im Bereich der venösen Einflussbahn des Herzens bildet sich das Proepikard, welches sich der Herzoberfläche nähert. (5) & (6): Die Perikardhöhle wird durch mesotheliale Duplikaturen von der Pleurahöhle getrennt. Die proepikardialen Zellen überziehen die Herzoberfläche und bilden so das Epikard. Das Herz wird durch Schleifenbildung und Herzklappen in Vorhöfe und Ventrikel unterteilt. (7): Abgeschlossene Herzanlage.

a: Perikardhöhle bzw. -Anlage, b: Herzplatten, c: Neuralrinne bzw. Neuralrohr/Rückenmark, d: Blutgefäßanlagen, e: Myokard, f: Lungenanlagen, g: Darmanlagen, h: (Splanchno-)Pleuraduplikaturen, i: Proepikard, j: Epikard. (1)-(3), (5)-(6) schematische Transversalschnitte, (4) schematische Sagittalschnitt, (7) Frontalaufsicht. Modifiziert nach [134, 141, 143-145].

Wenn die kardiale Oberfläche erreicht wird, überziehen die proepikardialen Zellen diese durch Proliferation und seitliche Migration [140, 146]. Bei diesem Überzug handelt es sich um einen Vorläufer des mesothelialen viszeralen Blattes des Perikards, welches fortan als Epikard bezeichnet wird und aus unverhorntem Plattenepithel besteht (ab **(5)** in Abbildung 1.2) [134]. Ein Teil der Zellen durchläuft einen Prozess, der als epithelial-mesenchymale-Transformation (EMT) bezeichnet wird [147-149]. Dabei dedifferenzieren die Zellen teilweise, lösen sich aus dem epithelialen Zellverband und erlangen erweiterte Fähigkeiten zur Proliferation und Migration im Sinne mesenchymaler Zellen. Sie wandern in das subepikardiale Bindegewebe (subepikardialer Raum) und ins Myokard ein und werden als EPDC (engl. *epicardium/epicardially derived cells*) bezeichnet (siehe Abbildung 1.3 zur topographischen Übersicht) [142, 148-153]. Der Begriff EPDC wird jedoch zunehmend auch für alle mesenchymalen Zellen des Subepikards verwendet [154].

Epikardiale Zellen, die diese Art der Aktivierung erfahren, exprimieren während der Embryonalentwicklung typische Marker wie *WT-1*, *RALDH2*, *Tbx18*, *Gata5*, *Slug*, und *Tcf21* (*Epicardin/Capsulin/pod1*) [142, 155-161]. Insbesondere *WT-1* (engl. *wilms' tumor protein 1*) wird in der Literatur häufig verwendet, um epikardiale Zellen und ihre Abkömmlinge zu identifizieren, da es vom Proepikard, dem Epikard und den EPDC exprimiert wird [158]. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor, der in Mesothelien wie dem Epikard, aber auch z.B. in der Niere des Embryos detektiert werden kann [158, 162].

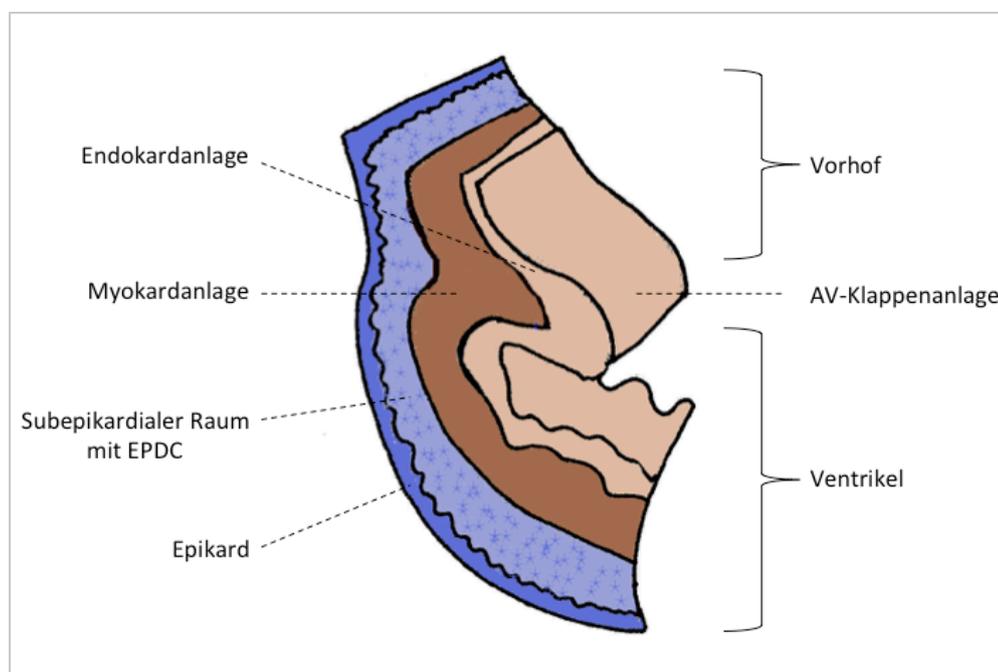


Abbildung 1.3: Topographie epikardialer Zellen. Frontaler Schnitt durch die Herzwand während der Embryonalentwicklung. Nach EMT können EPDC aus dem Epikard, der äußersten Schicht des Herzens, zunächst in den subepikardialen Raum auswandern. Später bilden Sie auch Gewebe in den anderen Schichten, z.B. in Form von Stützgewebe in den Herzklappen und Gefäßen und fraglich auch Myokard- und Endothelzellen. Nicht maßstabsgerecht. Modifiziert nach [144].

Nach der Einwanderung in den subepikardialen Raum und das Myokard teilen sich die EPDC weiter und differenzieren schließlich in verschiedene Zelltypen. Sie können Fibroblasten des Interstitiums und der Adventitia bilden [156, 157] sowie glatte Muskelzellen der Gefäßwände [157, 163, 164]. Einige Arbeitsgruppen berichten auch über einen Beitrag epikardialer Zellen zum Gefäßendothel und zu einem Teil der Kardiomyozyten [141, 142, 154, 156, 157, 163-167]; beides ist jedoch noch umstritten [168, 169]. Zumindest unter bestimmten *in vitro*-Bedingungen können proepikardiale Zellen in Kardiomyozyten differenzieren [142]. EPDC sind demnach bereits im Embryonalstadium multipotente Zellen [142]. Neben der Bereitstellung verschiedener Zellen hat das Epikard eine wichtige instruktive Rolle für zahlreiche Vorgänge während der Herzentwicklung. Es nimmt durch Zell-Zell-Kontakte und parakrine Sekretion Einfluss auf die Bildung, Reifung und Architektur des Myokards [161, 170]. Bei mechanischer oder genetischer Beschädigung des Epikards kam es in zahlreichen Studien zu schweren Defekten des Myokards und auch im Bereich der Herzgefäße [171, 172]. Das intensivste Koronarwachstum findet ebenfalls in Bereichen statt, in denen die Menge der subepikardialen Matrix und die Dichte der EPDCs am höchsten ist [142]. Darüber hinaus spielt das Epikard eine Rolle bei der Entstehung der Purkinjefasern des Reizleitungssystems [173] sowie bei der Bildung der Herzklappen [149, 161, 172]. Daraus lässt sich eine potentielle Beteiligung der EPDC an vielen kardialen Erkrankungen ableiten, u.a. an pathologischer Bindegewebsbildung im Sinne des *remodelling*, Rhythmusstörungen oder Defekten der Herzklappen [154] sowie Erkrankungen oder Fehlbildungen des Myokards (Übersichtsartikel: [141, 174]).

Insgesamt sind die epikardialen Zellen ein relativ neues Feld in der kardiovaskulären Entwicklungsbiologie [142]. Man hofft, dass die weitere Aufklärung der Vorgänge, welche die epikardiale Entwicklung steuern, helfen wird, neue Einsichten in die Mechanismen der angeborenen Herzkrankheiten zu geben [142]. Zudem könnten die stammzellähnlichen Eigenschaften der EPDC im Embryonalstadium ein Hinweis auf ihre Eignung für regenerative Zelltherapien am adulten Herzen sein.

Das adulte Epikard und seine Rolle nach Myokardinfarkt

Das adulte Säugetierherz reagiert auf Schädigung mit einer Defektheilung im Sinne einer Narbenbildung [22]. Andere Wirbeltiere sind jedoch in der Lage, diese Narbe durch funktionsfähiges Herzmuskelgewebe zu ersetzen. So kann der erwachsene Zebrabärbling, ein Karpfenfisch, nach Ablation von bis zu 20 % des Ventrikels innerhalb von 2 Monaten die volle muskuläre Integrität des Organs wiederherstellen [175]. Das Epikard, das sich bei adulten Organismen in einem Ruhezustand befindet, wird während dieses Heilungsprozesses reaktiviert. Die Reaktivierung zeigt sich durch eine proliferative Verdickung des Epikards über dem gesamten Organ sowie einer Reexpression der im Embryonalstadium charakteristischen Marker wie *WT-1* und *Tbx18* [176].

Es wird angenommen, dass diese epikardiale Reaktivierung bei den Reparaturvorgängen im Zebrafischherz eine entscheidende Rolle spielt [177-179]. Der Ersatz der Narbe durch neugebildete Herzmuskelzellen erfolgt jedoch nicht durch einen zellulären Beitrag aus dem Epikard, sondern durch Teilung vorhandener Herzmuskelzellen [179]. Dennoch wird vermutet, dass EPDC nach der Verwundung als instruierende Zellen mit parakrinen Signalen auf das Myokard und das Narbengewebe einwirken und für die Regeneration unverzichtbar sind. Dies wird auch deswegen angenommen, weil die Teilungsrate der Kardiomyozyten in unmittelbarer Nähe der verdickten Epikardschicht am größten ist [175]. Aufgrund ihrer parakrinen Wirkung auf Nachbarnzellen in der Organogenese und während der Myokardregeneration werden EPDC von einigen Autoren in diesem Kontext als „assistive Zellen“ bezeichnet [59].

Diese vielversprechenden Erkenntnisse sind bislang nur bedingt auf Säugetiere übertragbar. Bei neugeborenen Mäusen wurden ähnliche Experimente durchgeführt [57]: Nach chirurgischer Entfernung von 15 % des Ventrikelmyokards zeigte sich bei einem Alter von einem Tag eine ähnliche Aktivierung des Epikards wie beim Zebrafisch und Ersatz des ischämischen Areals durch voll funktionsfähiges Myokard innerhalb von 21 Tagen. Bei sieben Tage alten Tieren war jedoch keine *restitutio ad integrum* mehr möglich und es fand lediglich eine Narbenbildung wie bei den erwachsenen Tieren statt. Eine mutmaßliche Hypothese zur Erklärung des Erlöschens der Regenerationsfähigkeit ist das „Abschalten“ embryonaler Genprogramme oder die Bildung polyploider, also mehrkerniger Herzmuskelzellen [57].

Doch auch nach Infarzierung eines erwachsenen Säugetierherzens zeigt sich eine Aktivierung des Epikards im Sinne einer Verdickung und Reexpression embryonaler Marker [176, 180, 181]. Im infarzierten murinen Herzen nahm die epikardiale Dicke innerhalb von sieben Tagen nach Myokardinfarkt um mehr als das Sechsfache zu und epikardiale Zellen exprimierten wie im Zebrafisch embryonale epikardiale Markergene wie *WT-1*, *Tbx18*, *Tcf21* und *Gata5* [181-184] (siehe auch Abbildung 1.4). In der Literatur wird die Persistenz der *WT-1*-Expression mit dem Erhalt eines undifferenzierten Stammzellstatus in Verbindung gebracht [160, 161, 183].

Man ist sich mittlerweile sicher, dass auch die reaktivierten adulten EPDC einen Beitrag zur Regeneration nach Infarkt leisten und hofft, dass sie dabei zukünftig pharmakologisch manipuliert werden könnten. Dabei geht man davon aus, dass die Zellen einen Teil ihrer Fähigkeiten aus der Embryonalgeschichte rekapitulieren können. Insbesondere hinsichtlich der parakrinen, instruktiven Eigenschaften wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen überzeugende Ergebnisse erzielt: Für Phänotyp und Funktion von gesunden, adulten Kardiomyozyten konnte eine positive Wirkung durch EPDC im Sinne einer erhaltenen Homöostase *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [59, 170].

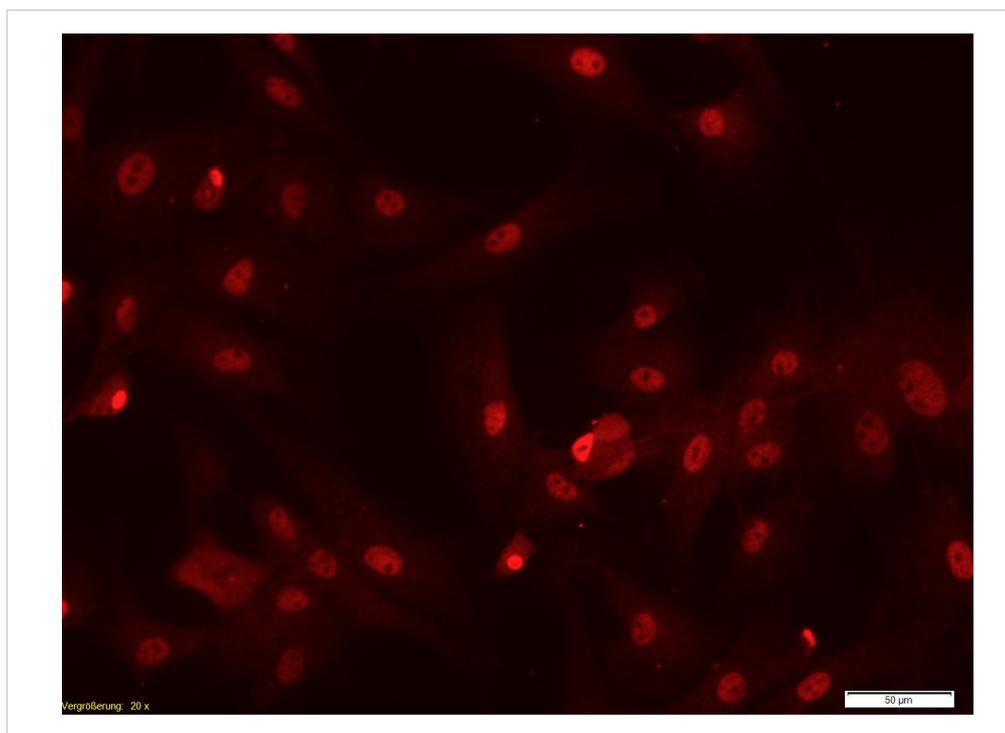


Abbildung 1.4: WT-1-positive EPDC nach Myokardinfarkt einer adulten Ratte *in vitro*. Immunfluoreszenzmarkierung des epikardialen Markers Wt-1 mit Tetramethylrhodamine (TRITC) sorgt für eine rötliche Färbung der epikardialen Zellkerne. Die Abbildung wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Zhaoping Ding.

Von EPDC sezernierte Botenstoffe sollen aber auch nach myokardialer Schädigung ein verbessertes Überleben der Kardiomyozyten, eine gesteigerte Angiogenese und reduziertes *remodelling* bewirken [59, 181, 185]. Das vom Epikard sezernierte kardioprotektive Protein *Follistatin-like 1 (FSTL1)* konnte sogar eine Kardiomyozytenproliferation im Herzinfarktmodell des Schweines stimulieren [69]. Wenn man durch EPDC *in vitro* konditioniertes Medium in die Grenzzone des Infarkts injizierte, zeigte sich eine reduzierte Infarktgröße und erhöhte Gefäßdichte bei verbesserter Pumpfunktion [181]. Das konditionierte Medium wirkte *in vitro* proliferationssteigernd auf andere CPC und endotheliale Zellen verschiedenen Ursprungs [59, 181]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Transplantation unbehandelter, in Zellkultur expandierter EPDC in infarzierte Mäuseherzen eine verbesserte Vaskularisation, Wanddicke und Herzfunktion bewirkte [59]. Ob es überlebende EPDC oder neugebildete Kardiomyozyten epikardialen Ursprunges nach derartigen Experimenten gibt, ist noch umstritten [59, 186]. Man ist sich aber einig, dass EPDC nach Infarkt überwiegend glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten bilden [180, 181, 187-189] und möglicherweise auch Zellen mit endothelialer Differenzierung [171]. Die EPDC verbleiben dabei größtenteils im Bereich der Herzoberfläche und des subepikardialen Raumes [181]. Sollte sich jedoch eine Möglichkeit finden, EPDC so zu manipulieren, dass sie in großer Zahl die Infarktzone migrieren, dort proliferieren und neue Kardiomyozyten bilden, wären sie der ideale Kandidat für regenerative Zelltherapien am Herzen.

Eine Arbeitshypothese der regenerativen Medizin ist es, dass eine Reaktivierung des embryonalen Programms in dem Gewebe erfolgen muss, welches das Organ in erster Instanz gebildet hat [30, 169]. Dies sei auch am ehesten durch Stimulation mit denselben Molekülen zu erreichen, die das Potential der Zelllinien auch während der Embryogenese regulieren [123, 188]. Während der embryonalen Kardiogenese sind EPDC multipotent und bilden Zellen aller kardiovaskulären Linien [163, 166, 167, 190]. Mit Hinblick auf die einzigartige Rolle der EPDC in der Embryonalentwicklung besteht also die Hoffnung, dass sich das zelluläre und parakrine Potential mit geeigneten Substanzen auch im erwachsenen Organismus reaktivieren oder sogar potenzieren lässt [30].

Von einigen Autoren werden EPDC bereits als „ultimative kardiale Stammzelle“ beschrieben [142]. Sie sind autolog, sodass man nicht auf die Verfügbarkeit eines passenden Spenders angewiesen wäre. Außerdem können sie auf Funktionen ihres Embryonalgedächtnisses möglicherweise leichter zurückgreifen als andere Zellen. Sie erfüllen das therapeutische Ideal: die Stimulation einer ortsständigen Zellpopulation, sodass limitiertes Graft-Überleben, erschwertes *Homing* und Abstoßungsreaktionen vermieden werden könnten [68] (engl. *resident cell-based therapy* [30]). Mit Hinblick auf ESC können bei den EPDC auch ethische Bedenken ausgeschlossen werden.

In der Hoffnung, dass es sich bei den EPDC um geeignete Zellen handelt, beginnt bereits die Suche nach den Faktoren, die eine Transdifferenzierung von EPDC in Kardiomyozyten möglich machen können. Da dem Säugetier die intrinsische regenerative Kapazität des Zebraabärblings fehlt, ist es notwendig, das Epikard zu stimulieren, um wenigstens eine moderate Verbesserung der Regeneration zu bewirken [30]. Dass grundsätzlich die Möglichkeit zu einer derartigen Stimulation des Epikards gegeben ist, konnte bereits in Arbeiten von Smart et al. gezeigt werden. Nach intraperitonealer Applikation des Peptids Thymosin β 4 bei Mäusen erfolgte eine Neubildung reifer Kardiomyozyten aus EPDC im Bereich der Infarkt Narbe [70, 191]. Die Tiere hatten signifikant verbesserte kardiale Funktionsparameter. Dies wurde als Surrogatparameter für ersetztes Myokard gewertet [68]. Die Anzahl der neugebildeten Zellen war mit <200 Zellen pro untersuchtem Herzen jedoch so gering [59, 68], dass erneut ein parakriner Effekt eher plausibel erscheint. Neben der insuffizienten Kardiomyozytendifferenzierung aus EPDC ist es ein weiterer Nachteil des Wirkstoffes, dass die Verabreichung der Substanz vor Eintreten der myokardialen Ischämie erfolgen muss. Bei Gabe nach Myokardinfarkt konnten keine neugebildeten Kardiomyozyten nachgewiesen werden [192], was die Substanz für die klinische Realität ungeeignet macht. Die Arbeit zeigt jedoch, dass EPDC generell *de novo* Kardiomyozyten bilden können und dass dieser Prozess mit einer anderen Substanz möglicherweise effizienter gestaltet werden kann. Da die Rolle des Epikards in Entwicklung, Homöostase und Krankheit noch ein junges Forschungsgebiet ist, gibt es erst wenige Kenntnisse über epikardiale Eigenschaften und Fähigkeiten. Die Sig-

nalwege, welche die EPDC-Entwicklung und ihr Verhalten im erwachsenen Organismus steuern, sind ebenfalls erst rudimentär erforscht. Letztlich ist eine genauere Charakterisierung der Zellen Voraussetzung, um im Rahmen von regenerativen Zelltherapien mit pharmakologischen Wirkstoffen die gewünschten therapeutischen Effekte auf die Myokardinfarktheilung mit Hilfe der EPDC zu erzielen.

1.3 Ziele dieser Arbeit

EPDC haben stammzellartige Eigenschaften und ihnen wurden vielfältige parakrine Effekte während der Myokardregeneration bei Zebrafisch und der neonatalen Maus zugeschrieben. Daher besteht die Hoffnung, dass nach geeigneter pharmakologischer Aktivierung EPDC in Kardiomyozyten umgewandelt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden EPDC aus infarzierten Herzen von Ratten nach einer neuen enzymatischen Methode isoliert. Sie sollten hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und –Geschwindigkeit *in vitro*, ihres chemotaktischen Potentials, ihrer möglichen Rolle im purinergen System, ihrer kardialen Vorprägung und ihres kardiomyogenen Transdifferenzierungspotentials mit bekannten bioaktiven Substanzen charakterisiert werden. Durch die Charakterisierung sollten mögliche Ansätze für eine zukünftige pharmakologische Manipulation und Differenzierung von EPDC aufgedeckt werden. Eine bessere Kenntnis epikardialer Eigenschaften ist die essentielle Basis für die zielgerichtete Entwicklung von möglichen Strategien hinsichtlich regenerativer Zelltherapien mit EPDC nach einem Myokardinfarkt.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Analysewaage	Ohaus Europe (Greifensee, Schweiz), PA214
Autoklav	F. & M. Lautenschläger (Köln, Deutschland), 5169
Cycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Master Cycler Gradient S
Durchflusszytometer	BD Biosciences (San Jose, USA), FACSCanto II
Gewebehomogenisator	MP Biomedicals (Santa Ana, USA), FastPrep-24
Gewebeschnneider	Bachofar Laboratoriumsgeräte (Reutlingen, Deutschland)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Deutschland)
Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Heracell 150i
Langendorff-Apparatur	Werkstatt der Physiologie, Universität Düsseldorf Datenaufzeichnung: ADInstruments (Spechbach, Deutschland), Powerlab/16SP Schlauchpumpe: Abimed (Langenfeld, Deutschland), Minipuls 3 Thermostat: Thermo Haake (Karlsruhe, Deutschland), DC1-B3 Flussmesser: Transonic Systems (Ithaca, USA), T106
MACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), MiniMacs
Magnetrührer	PCE Deutschland GmbH (Meschede, Deutschland), IKA-RCT basic
Mikroplattenanalysegerät	BMG LabTech (Ortenberg, Deutschland), FluoStar Optima
Mikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland), MZ6 Olympus (Shinjuku, Japan) CKX31 Zeiss (Oberkochen, Deutschland), Axio Vert.A1 mit AxioCam ICm1 Zeiss
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), NanoDrop 2000
pH-Meter	Knick (Berlin, Deutschland), 766 Calimatic
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Research

Reagenzglasschüttler	VWR International (Radnor, USA), Vortex-Schüttler Heidolph Instruments (Schwabach, Deutschland, REAX 2000)
Real-time PCR-Gerät	Life Technologies (Karlsruhe, Deutschland), StepOnePlus
Sterilwerkbank	Scanlaf (Lygne, Dänemark), Mars Pro Cytosafe Class 2
Tube Rotator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), MACSmix Tube Rotator
Vakuum-Absaugsystem	HLC (Pforzheim, Deutschland), AC 04
Zählkammer	Brand (Wertheim, Deutschland), Neubauer improved
Zentrifugen	Andreas Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Universal 320r; Rota-na 460r Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Microcentrifuge IR 220 VAC Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Centrifuge 5415r; Centrifuge 5424 Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA), Hereus Megafuge 16R

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und Typenbezeichnung.

Produkt	Hersteller und Typenbezeichnung
96-well PCR Platten	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Costar Stripetten	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Einmalspritzen	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Micro Fine 0,5 ml
Klebefolie (PCR)	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA), Microseal "B"
MACS-Filter	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland), MACS-Pre-Separation Filters 70µm
MACS-Trennsäule	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) MACS Separation Columns
Microtest 96-well Assay-Platte, schwarz	BD Falcon (Bedford, USA)
Pipettenspitzen	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

Spritzenaufsatzfilter	Sartorius Stedim Biotech (Göttingen, Deutschland), 0,45 µm & 0,2 µm
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Zellkulturwells	TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz) Starlab (Hamburg, Deutschland)
Zellsieb	BD Falcon (Bedford, USA), 40 µm Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland), 100 µm
Zellschaber	TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, Schweiz)

2.3 Chemikalien & Antikörper

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Antikörper mit Bezugsquellen.

Produkt	Hersteller
2,3-Butandion-Monoxim	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aktivin A	eBioscience (San Diego, USA)
Adenosin-5'-Triphosphat-Disodium-Salt hydrate (ATP)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Anti-Rat CD45 PE	eBioscience (San Diego, USA)
BMP4	R&D (Minneapolis, USA)
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
CHIR99021	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Collagenase CLS-2 295U/mg	BioChrome (Berlin, Deutschland)
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Dulbecco's PBS (ohne Ca ⁺ /Mg ⁺)	GE Healthcare Life Science (Freiburg, Deutschland)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (100 %, 96 %, 70 %)	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Fast qPCR MasterMix Plus	Eurogentec (Seraing, Belgien)
Glukose	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)

FBS Superior (FCS), Lot. 0367A	BioChrome (Berlin, Deutschland)
FGF-2	Peprotech (Rocky Hill, USA)
GlutaMax 100x	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Heparin-Natrium (25000 U/ml)	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isofluran	Actavis (Langenfeld, Deutschland)
IWP-2	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
KCL	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KHCO ₃	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
MgCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mouse Anti-Rat CD32	BD Biosciences (San Jose, USA)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaHCO ₃	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NH ₄ Cl	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Penicillin (10.000 U/ml) & Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
RNase-free DNase	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Trypan-Blau (4%)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)

2.4 Kits und Assays

Tabelle 2.4: Kits und Assays mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
CM 509 24-Well Fluorimetric Cell Migration Assay (8µm)	Merck Milipore (Darmstadt, Deutschland)
ECM 505 24-Well Fluorimetric Cell Migration Assay (3µm)	Merck Milipore (Darmstadt, Deutschland)
RNeasy-Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Quantitec Reverse-Transcription Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Taq DNA Polymerase (250 Units)	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.5 Sonden, Primer und TaqMan-Assays

Tabelle 2.5: Sequenzen der Haushaltsgene β -Actin und Tbp. Spalten von links nach rechts: Zielgen, Gensequenzen des Forward- (FW) und Reverse- (RV) Primer sowie der Sonde und Sondenlabel.

Gen	FW-Primer	RV-Primer	Sonde	Label
Tbp	TTCGTGCCAGAAATGC TGAA	GTTCGTGGCTCTCTTA TTCTCATG	ATCCCAAGCGGTTTGC TGCAGTCA	FAM/ TAMRA
β-Actin	CCCTGGCTCCTAGCAC CAT	GAGCCACCAATCCACA CAGA	ATCAAGATCATTGCTC CTCCTGAGCGC	FAM/ TAMRA

Tabelle 2.6: TaqMan® Gene Expression Assays für kardiale Marker.

Transkript	Gensymbol	Einsatz	Bestellnummer	Hersteller
GATA binding protein 4	<i>GATA4</i>	früher kardialer Marker	Rn01530459_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Islet-1/ ISL LIM homeobox 1	<i>ISL1</i>	früher kardialer Marker	Rn00569203_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta	<i>MYH7</i>	später kardialer Marker	Rn01488777_g1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
NK homeobox 5	<i>Nkx2.5</i>	früher kardialer Marker	Rn00586428_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
troponin T type 2 (cardiac)	<i>TNNT2</i>	später kardialer Marker	Rn01483694_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)

Tabelle 2.7: TaqMan® Gene Expression Assays für Rezeptoren und Enzyme des purinergen Systems.

Transkript	Gensymbol	Einsatz	Bestellnummer	Hersteller
CD 39	<i>Entpd1</i>	E-NTPDase 1	Rn00574887_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
CD 73	<i>Nt5e</i>	Ekto-5'-Nukleotidase	Rn00665212_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
A₁R	<i>Adora1</i>	ADP-Rezeptor	Rn01488777_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
A_{2A}R	<i>Adora2a</i>	ADP-Rezeptor	Rn00583935_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
A_{2B}R	<i>Adora2b</i>	ADP-Rezeptor	Rn00567697_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)
A₃R	<i>Adora3</i>	ADP-Rezeptor	Rn00563680_m1	Applied Biosystems (Foster City, USA)

2.6 Lösungen, Puffer, Zellkulturmedien

Tabelle 2.8: Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern.

Bezeichnung	Zusammensetzung & pH
ACK-Lyse-Puffer	0.15 M NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ 0.1 mM EDTA pH 7.4
Kollagenase-Lösung	40 mg Kollagenase CLS II, 295 U/mg 10 ml PBS
MACS-Puffer	PBS 0.5 % BSA 5 mM EDTA pH 7,4
Waschpuffer	4 mM NaHCO ₃ 10 mM HEPES 30 mM 2,3-Butandion-Monoxim 11 mM Glukose 0.3 mM EDTA 6.6 mM NaCL 0.22 mM KCL 0.1 mM MgCl ₂

Tabelle 2.9: Kultur- und Differenzierungsmedien.

Medium	Zusammensetzung
EPDC-Standardkulturmedium	DMEM 1 % Glutamin 30 % FCS (ggf. reduziert auf 10 % oder 5 %) 1 % Penicillin/ Streptomycin
Konzentrationen der Zusätze für Differenzierungsmedien	10 μ mol/l 5-Azacytidin 10 ng/ml Aktivin A 10 ng/ml BMP4 3 μ M CHIR99021 10 ng/ml FGF-2 2 μ mol/l IWP-2
Quenching Medium	DMEM 5 % BSA 1 % FCS

2.7 Software

Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme.

Programm	Hersteller
Word 2011	Microsoft (Redmond, USA)
Exel 2011	Microsoft (Redmond, USA)
Power Point 2011	Microsoft (Redmond, USA)
Prism 6.0	Graph Pad (La Jolla, USA)
GIMP 2.8.18	GIMP-Team, Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License
Inkscape	Free Software Foundation (Boston, USA)

3 Methoden

3.1 Isolation primärer EPDC nach kardialer Ischämie

3.1.1 Art und Herkunft der Tiere für die Organentnahme

Die Isolierung der epikardialen Zellen erfolgte aus männlichen Wistar-Ratten (230-320 g schwer, 12-16 Wochen alt). Die Versuchstiere wurden von der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen. Standardfutter (*Ssniff Spezialdiäten GmbH*, Soest, Deutschland) sowie Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Im Umgang mit den Tieren galten die Vorgaben der Tierschutzverordnung (Aktenzeichen der Tierversuchsgenehmigungen des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz: 8.87-50.10.34.08.206 und 84-02.04.2014.A174).

3.1.2 Kardiale Infarzierung mittels Ischämie-/Reperfusionstechnik

Die Okklusion des Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Herzkranzarterie führt zu einem Infarkt der Herzvorderwand. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Induktion eines RIVA-Infarktes nach der Ischämie-/Reperfusionstechnik (I/R), um eine Reaktivierung und Proliferation der EPDC zu stimulieren. Die Herzinfarktinduktion wurde von Dr. med. Zhaoping Ding aus dem Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf vorgenommen [193]: Nach Betäubung mit Isofluran in einem Gasbehältnis zur Narkoseeinleitung wurden die Ratten intubiert und die Anästhesie dann mittels mechanischer Beatmung mit Isofluran und Sauerstoff fortgesetzt. Die Tiere wurden in Rückenlage auf einer Wärmeplatte positioniert. Über Elektroden an den Extremitäten wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet, sodass die elektrische Herzaktivität durchgehend evaluiert werden konnte. Durch einen links parasternalen Schnitt wurde der Brustkorb eröffnet, damit der RIVA für einen Verschluss zugänglich war. Ein 6-0 Polypropylen-Faden wurde mit einer gebogenen Nadel unter dem RIVA durchgeführt und das Gefäß reversibel verschlossen (Ischämiephase). Die Unterbrechung des Blutflusses im Koronargefäß wurde mittels visueller Betrachtung unter dem Mikroskop und durch Auftreten von ST-Strecken-Hebungen im EKG kontrolliert. Die Fadenligatur wurde nach 60 min gelöst und der Blutfluss im RIVA wiederhergestellt (Reperfusionsphase). Während der gesamten Prozedur blieb der Herzbeutel intakt. Der Verschluss des Brustkorbs wurde zweischichtig für Muskulatur und Haut durchgeführt.

3.1.3 Isolation primärer EPDC nach Organentnahme

Die Isolationstechniken für epikardiale Zellen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen erheblich [59, 170, 181, 194]. Unsere Arbeitsgruppe isoliert EPDC nach einer neu

etablierten Methode [193], bei der die Zellen nach Langendorff-Perfusion [195] von der Oberfläche infarzierter Herzen enzymatisch mithilfe von Kollagenase abgelöst werden.

Sieben Tage nach der Myokardinfarktinduktion erfolgt die Herzentnahme nach Tötung der Ratten; anschließend konnten die epikardialen Zellen isoliert werden. Hierfür wurden die Tiere mit Isofluran betäubt, dann erhielten sie eine intraperitoneale Injektion von 0,4 ml verdünnter Heparinlösung (100 I.E./ml). Nach Verteilung des Heparins in der Zirkulation wurde die Ratte durch Isofluraninhalation getötet. Das Handling der lebenden Tiere bis zum Eintritt des Todes wurde durchgeführt von Frau Dr. rer. nat. Daniela Friebe.

Nach der Entnahme wurde das thorakale Organpaket in Waschpuffer unter Zusatz von 0,1 ml Heparinlösung geschwenkt. Unter einem MZ6-Lichtmikroskop (*Leica*, Wetzlar, Deutschland) wurde der Herzbeutel eröffnet. Lungen, Thymus, Fett und die großen Gefäße wurden entfernt und nur die Aortenwurzel proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus belassen. Durch diesen Aortenstumpf wurde das Herz kanüliert, an der Langendorff-Apparatur aufgehängt und vier Minuten mit körperwarmem, oxygeniertem Waschpuffer retrograd über die Herzkranzgefäße perfundiert. An die Perfusion anschließend wurden Herzohren und der Aortenstumpf entfernt und das Organ in die Kollagenaselösung überführt (siehe Tabelle 2.8). In einem Inkubator wurde das Herz im Kollagenasebad bei 37 °C für 20 Minuten mittels eines Tuberotators geschwenkt. Nach Zugabe von 3 ml FCS zum Stoppen des Verdauens wurde die Suspension mithilfe eines Zellsiebes (70 µm) gefiltert. Um ein Zellpellet zu gewinnen, wurde die Lösung für sieben Minuten bei 700 g zentrifugiert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Aussaat nach der Isolation

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in EPDC-Standardkulturmedium resuspendiert (siehe Tabelle 2.9: DMEM mit 1 % Glutamin, 30 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS, auch *fetal bovine serum*, FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin). Die Ausplattierung erfolgte auf Zellkulturplastiken der Firmen *PP Techno Plastic Products* (Trasadingen, Schweiz), *Greiner Bio-One* (Kremsmünster, Österreich) und *Starlab GmbH* (Hamburg, Deutschland). Nach 48 h waren die Zellen adhärent. Freischwimmende Blutzellen und Zelldetritus konnten durch einen Medienwechsel zu diesem Zeitpunkt entfernt werden.

3.2.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die EPDC wurden in einem Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. In der regulären Kultur erhielten die Zellen das EPDC-

Standardkulturmedium. Um ein konstantes Milieu zu erhalten, wurde im Wechsel alle zwei bis drei Tage Medium hinzugegeben oder das Medium ausgetauscht. Das Medium wurde zuvor im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Sterile Einwegartikel und Zellkulturgeschirr standen für alle Arbeiten mit den Zellkulturen zur Verfügung. Alle Medien wurden unter einer Sterilwerkbank hergestellt (Mars Pro Cytosafe Class 2, *Scanlaf*, Lygne, Dänemark). Sofern unsterile Komponenten notwendig waren (z.B. bioaktive Moleküle als Transdifferenzierungsinduktoren), wurde das Medium mit Spritzenvorsatzfiltern der Firma *Sartorius Stedim Biotech* gefiltert (Göttingen, Deutschland, Porengröße 0,2 µm). Die Aufbewahrung der Medien erfolgte bei 4 °C. Die Desinfektion der Zellkulturbank sowie der darunter verwendeten Gerätschaften wurde mit UV-Licht und Ethanol (70 %) vorgenommen.

3.2.3 Zellpassage und Neuaussaat

Die Zellen wurden bei 60-90 % Konfluenz vom Kulturgeschirr abgelöst, geteilt und neu ausgesät. Dafür wurde zunächst das Medium verworfen und Rückstände durch Waschen mit PBS entfernt. Bei 37 °C wurde Trypsin 0,05 % + EDTA auf die Zellen aufgebracht. Das Ablösen der Zellen von den Zellkulturplastiken konnte im Lichtmikroskop kontrolliert werden. In der Regel genühten zwei bis fünf Minuten; dann flottierten die Zellen frei. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Mittels Zentrifugation (5 min bei 350 g) wurden die Zellen pelletiert. Nach Resuspension in Medium konnten die Zellen anschließend in entsprechend benötigter Anzahl neu ausplattiert werden.

3.3 Magnetische Zellseparation von Immunzellen und EPDC

Das infarzierte Herz enthält auch nach der Perfusion mittels Langendorff-Apparatur noch rote Blutzellen (Erythrozyten) sowie aufgrund der inflammatorischen Vorgänge vermehrt Immunzellen (Leukozyten). Diese befinden sich nach dem Verdau wie die EPDCs in der Zellsuspension und stellen eine Kontaminante dar, welche Genexpressionsanalysen beträchtlich verfälschen kann. Aus diesem Grund wurden die Erythrozyten durch Hämolyse mittels ACK-Lyse-Puffer und Immunzellen mittels magnetischer Zellseparation aus der Zellsuspension eliminiert, sofern die EPDC unmittelbar nach der Isolation untersucht werden sollten.

Das Prinzip der magnetischen Zellseparation (engl. *magnetic cell sorting*, MACS) beruht auf der Markierung einer Zellfraktion anhand spezifischer Oberflächenmerkmale (Antigene) mit supermagnetischen MACS-Beads und der Trennung von der unmarkierten Zellfraktion über eine magnetisierte Säule (schematische Darstellung siehe Abbildung 3.1). Die Markierung der Zellen erfolgte hier mithilfe von spezifischen Fluorochrom-markierten FACS-Antikörpern ((**1**) in Abbildung 3.1). Die MACS-Beads sind ebenfalls Antikörper-gekoppelt ((**2**) in Abbildung 3.1), dieser

Antikörper ist wiederum spezifisch gegen das Fluorochrom der FACS-Antikörper gerichtet (Sandwich-Markierung). Eine Säule, die eine Matrix aus ferromagnetischen Stahlpartikeln enthält, wird in einem Magneten aufgehängt, wodurch ein starkes Magnetfeld entsteht. Wird ein Zellgemisch durch die Säule geschleust, verbleibt die Fraktion der MACS-Beads-markierten Zellen im Magnetfeld der Säule, wohingegen die unmarkierten Zellen mit der Spülflüssigkeit die Säule verlassen können ((3) in Abbildung 3.1). Sobald die Säule vom Magneten entfernt wird, werden die magnetisch markierten Zellen ebenfalls von der Säule eluiert ((4) in Abbildung 3.1) und die getrennten Fraktionen können einzeln weiterverwendet werden.

Ausgangspunkt für die MACS-Separation war die EPDC-Isolierung wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben. Nachdem die Zellen nach Zentrifugation ein Zellpellet gebildet hatten, konnte der Überstand verworfen werden. Fünf Milliliter des ACK-Lysepuffers wurden für 15 Minuten hinzugegeben. Dann wurden fünf Milliliter PBS für einen Waschschrift zugefügt, die Zellen für sieben Minuten mit 700g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in drei Millilitern MACS Puffer resuspendiert. Ein Nygonsieb (70 µm) entfernte Verunreinigungen durch grobe Gewebetrümmer und Zellaggregate. Das Zellsieb wurde mit drei Millilitern MACS-Puffer nachgespült. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die EPDC wurden anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 5 µl Anti-CD32-Antikörpern (Mouse Anti-Rat CD32, *BD Biosciences*, San Jose, USA) und zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden in der Zellsuspension unspezifische Bindungen der nachfolgend hinzugegebenen CD45-Antikörper an Fc-Rezeptoren von Immunzellen blockiert (Fc: engl. *fragment crystallisable*, Oberbegriff von Membranrezeptoren für die Bindung der konstanten Region von Immunglobulinen). Erneutes Zentrifugieren und eine Resuspension des Pellets in 200 µl MACS-Puffer schlossen sich vor der Inkubation mit 2 µl eines PE-gekoppelten CD45-Antikörpers an (PE-Fluorochrom: Phycoerythrin, Anti-Rat CD45 PE, *eBioscience*, San Diego, USA). Die spezifische Bindung dieses Antikörpers an die Immunzellen erfolgte über 15 min bei 4-8 °C. Darauffolgend wurden vier Milliliter des MACS-Puffers hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in einem Volumen von 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Dann wurden 20 µl Anti-PE-MACS-Beads hinzuzufügt (Anti-PE MicroBeads, *Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Deutschland) und bei 4-8 °C für 15 min inkubiert. Die Immunzellen trugen nun eine Markierung von CD45 mit einem FACS-Fluorochrom und supramagnetischen Partikeln auf ihrer Oberfläche. EPDC, die dieses Merkmal nicht exprimieren, waren hingegen unmarkiert.

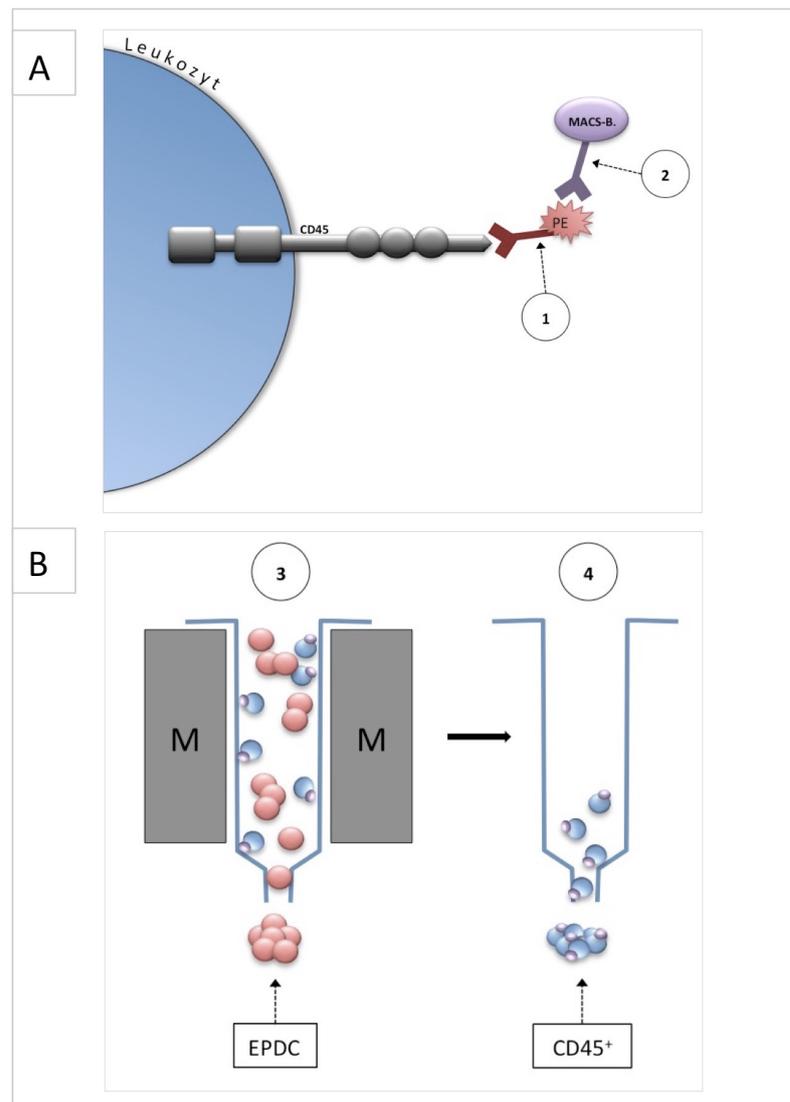


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Prinzips der magnetischen Zellseparation. Beispielhaft anhand der Trennung von $CD45^+$ Leukozyten von $CD45^-$ EPDC. **(A)** Darstellung auf Einzelzellebene. Zunächst erfolgt die Markierung der Leukozytenfraktion anhand des spezifischen Oberflächenmerkmals CD45 über den PE-Fluorochrom-gekoppelten FACS-Antikörper (1). An das Fluorochrom kann wiederum ein PE-spezifischer MACS-Antikörper binden (2). **(B)** Darstellung der Trennung über die magnetisierte Säule. Die MACS-markierte Zellfraktion verbleibt im Magnetfeld (M: Magnet mit Halterung für Säule), während die unmarkierten EPDC von der Säule depletiert werden können (3). Die Elution der $CD45^+$ -Immunzellen erfolgt nach Entfernung des Magneten (4). (B) modifiziert nach [196].

Für die anschließende Trennung wurde der MiniMACS-Separator der Firma *Miltenyi Biotec* (Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Der Magnet des Separators wurde bei 4-8°C für mindestens 30 Minuten vorgekühlt. Eine MACS-Säule wurde in den Separator gespannt und mit 500 µl kaltem MACS-Puffer äquilibriert. Das Zellgemisch wurde mit weiteren 500 µl des MACS-Puffers gemischt und in die Säule pipettiert. Der zuvor verwendete Falcon wurde mit MACS-Puffer gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls auf die Säule gegeben, um die Zellausbeute zu erhöhen. Die Säule wurde drei- bis viermal mit MACS-Puffer gewaschen, um die unmarkierten EPDC durch die Säule in ein Sammelgefäß zu spülen. Dann wurde der Magnet entfernt und die Säule über einem zweiten Falcon gespült. Die CD45-tragenden Immunzellen konnten so eben-

falls eluiert werden. Die Reinheit der EPDC wurde durch Quantifizierung von CD45-positiven Zellen innerhalb der getrennten Zellfraktionen mittels durchflusszytometrischer Analyse (engl. *Fluorescence-activated cell sorting*, FACS) kontrolliert. Die Reinheit der Zellen sollte bei $\geq 95\%$ liegen. Die FACS-Kontrolle wurde von Dr. rer. nat. Daniela Friebe durchgeführt.

3.4 Bestimmung der Generationszeit

Die Wachstumseigenschaften der epikardialen Zellen sollten mittels eines dynamischen und eines statischen Ansatzes untersucht werden. Zunächst wurde eine Aussaat von 20.000 Zellen/Well in Triplikaten vorgenommen. Nach 2-4 Tagen, noch vor vollständiger Konfluenz, erfolgte eine Passagierung und Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer. Für die Kalkulation der Aussaat kam zur Unterscheidung vitaler und unvitaler Zellen Trypanblau (4 %, 1:5) zum Einsatz. Anschließend erfolgte eine erneute Aussaat der Zellen. Die Populationsverdopplungszeit errechnete sich aus der Anzahl der Zellen im Verhältnis zur Kulturzeit.

Da anzunehmen ist, dass ein Teil der Zellen bei dieser Methode durch den Stress der Passage noch nach dem Zählen abstirbt und nicht erneut im Kulturgefäß adhärirt, wurde zusätzlich die Zeit bis zur Verdopplung einer Population mittels einer Wachstumskurve in statischer Kultur bestimmt. Zu diesem Zweck wurden in Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen Zellen mit einer Startdichte von 5000 Zellen/9,6 cm² (entspricht einer Vertiefung der 6-Well-Platte) in Triplikaten ausgesät. Zu Beginn des Experiments wurden ausreichend Wells für alle Zählungen mit EPDC bestückt. Die Zellen wurden nach dem Zählen nicht erneut ausgesät, sondern nach dem Ablösen und Zählen verworfen.

Bei Vermehrung durch Teilung in zwei Tochterzellen lässt sich die Wachstumskinetik mit folgendem Ansatz beschreiben [197]:

$$N = N_0 \cdot 2^{\frac{t}{t_d}} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Darin ist N_0 die Zellanzahl zum Zeitpunkt $t=0$ und N die Zellanzahl zum Zeitpunkt t . Die Populationsverdoppelungszeit t_d ist von der Art der Zelle und den gewählten Versuchsbedingungen abhängig. Durch Umformung von Gleichung 1 ergibt sich für die Populationsverdopplungszeit:

$$t_d = t \cdot \frac{\log 2}{\log \frac{N}{N_0}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Durch halblogarithmische Auftragung der Zellzahlen über der Zeit stellt sich die exponentielle Wachstumsphase als lineare Gerade dar (Gleichung 3). Darin ist $\log N_0$ der Achsenabschnitt der vertikalen Achse. Aus der Steigung m kann später die Populationsverdopplungszeit t_d bestimmt werden.

$$\log N = m \cdot t + \log N_0 \quad (\text{Gleichung 3})$$

Mit Gleichung 2 ergibt sich für die Verdoppelungszeit:

$$t_d = \frac{\log 2}{m} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Für die Wachstumskurven der EPDC wurden Regressionsgeraden erstellt und die Populationsverdopplungszeit für jedes Herz einzeln berechnet; erst dann erfolgte eine Mittelwertbildung.

3.5 Migrationsassay

Die Fähigkeit zur Migration und das Reaktionsvermögen der EPDC auf chemoattraktive Substanzen sollten grundlegend untersucht werden. Hierfür wurde eine modifizierte Boyden-Kammer verwendet. Dieses System wurde ursprünglich entwickelt, um die Chemotaxis von Leukozyten zu studieren und wurde dann zu einem der wichtigsten Werkzeuge, um Zellmotilität und Invasion zu untersuchen [198]. Die klassische Kammer besteht aus zwei Kompartimenten, getrennt durch eine Membran, die Zellen durch aktive Migration überwinden können [198]. Der Anteil der migrierten Zellen wird dann an der Unterseite der Membran z.B. mittels Fluoreszenz gemessen.

Für die Untersuchungen kam der *QCM-24-Well Fluorimetric Cell Migration Assay* der Firma *Merck Milipore* zum Einsatz (schematische Darstellung in Abbildung 3.2). Dieser enthält eine Zellkulturplatte (untere Kammern) mit zugehörigen Einsätzen (obere Kammern, engl. *Inserts*), an deren Boden sich eine Membran mit Öffnungen definierter Größe befindet. Es wurden Assays mit einer Porengröße von 3 μm und 8 μm verwendet. Um den Membraneinsatz kann ein Medium mit oder ohne chemoattraktive Zusätze platziert werden (untere Kammern). Durch die

Kompartimentierung der Lockstoffe und der Zellen durch die Membran kann festgestellt werden, ob sich die EPDC zielgerichtet entlang des Konzentrationsgradienten des Lockstoffes bewegen (Chemotaxis).

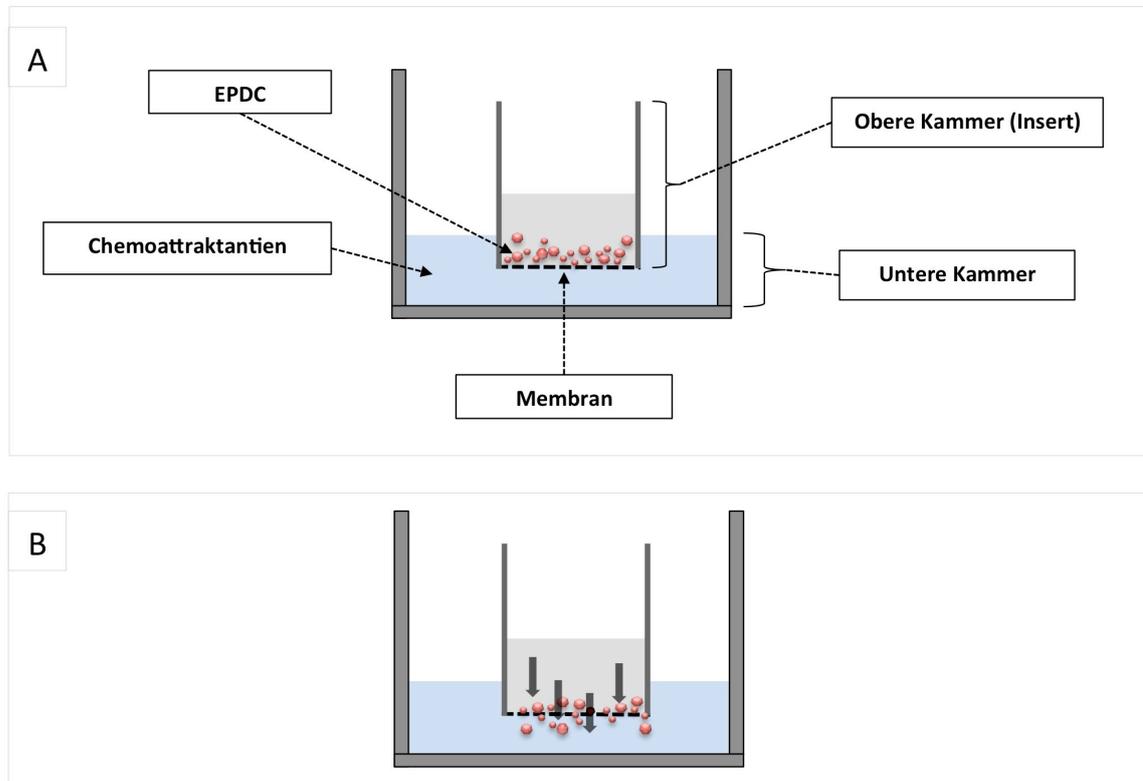


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Boyden-Kammer zur Untersuchung chemotaktischer Eigenschaften von EPDC. Zellen aus der oberen Kammer migrieren aktiv entlang des Lockstoffgradienten aus der oberen Kammer durch die Poren der Membran in das chemoattraktive Medium in der unteren Kammer. (A) Einzelkomponenten des Migrationsassays und entsprechende Bezeichnungen, (B) Darstellung der Migration von EPDC entlang des Lockstoffgradienten vom Insert durch die Membran in die untere Kammer.

Für das Experiment wurden Zellen der 2.-4. Passage (P_2 - P_4) auf eine Zelldichte von 40.000 Zellen/100 μ l in *Quenching Medium* eingestellt. Die Zellen entstammten diesen Passagen, weil eine Expansion der EPDC nötig war, um eine ausreichende Anzahl zu erhalten und weil eine 2-3-fache Passagierung vom Hersteller des Assays empfohlen wurde [199]. Ein „Aushungern“ der Zellen für 24-48 h durch Entzug von FCS, wie im Protokoll des Herstellers vorgeschlagen, wurde nicht durchgeführt, da Serumentzug zum Absterben der EPDC führte.

Ein Insert wurde in der Zellkulturplatte platziert und mit 250 μ l der Zellsuspension gefüllt, dann wurden weitere 50 μ l des *Quenching Mediums* hinzugegeben. Unterhalb des Membraneinsatzes wurde das *Quenching Medium* in die untere Kammer mit oder ohne Zusatz potenziell chemoattraktiver Substanzen pipettiert. Die Migration der Zellen wurde während der Inkubationszeit im Brutschrank abgewartet. Für jeden Versuchsdurchgang wurden vier verschiedene Ansätze untersucht: Eine Negativkontrolle ohne Zellen (Leerwert, engl. *blank*), eine Kammer ohne Zugabe

von chemoattraktiven Substanzen im *Quenching Medium*, welches eine ungerichtete Migration der Zellen anzeigt, ein Ansatz mit Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ ATP sowie ein Ansatz mit 30 % FCS-Zusatz im Medium. Nach 16 h Inkubation bei Standard-Zellkulturbedingungen wurde der Zellüberstand aus der oberen Kammer entfernt. Der Membraneinsatz wurde in eine frische Vertiefung mit 225 μl vorgewärmter *Detachment Solution* des Assay überführt und 30 min im Brutschrank inkubiert, um Zellen von der Unterseite der Membran abzulösen. Der *Lysis-Buffer* wurde 1:75 mit einem Fluoreszenzfarbstoff des Assays versetzt und 75 μl der Mischung zu den Zellen gegeben. Unter Lichtschutz folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über 15 min. Für die Messung wurden anschließend 200 μl der Lösung in eine Platte für das Mikroplattenanalysegerät überführt. Der Anteil der chemotaktisch migrierten Zellen wurde indirekt über Nukleinsäuren-Fluoreszenz in einem Mikroplattenanalysegerät (FluoStar Optima, *BMG LabTech*, Ortenberg, Deutschland) bei 480/520 nm bestimmt. Der *blank*-Wert (Leerwert) wird als Basalwert der Materialfluoreszenz subtrahiert.

Ist eine Korrelation der gemessenen Fluoreszenz (in relativen Fluoreszenzeinheiten, RFU) mit der Zellzahl gewünscht, so ist dies mittels einer Standardkurve möglich. Sie muss für jeden Zelltyp gesondert bestimmt werden. Dazu werden bekannte Zellzahlen ohne Migrationskammer nach dem Protokoll behandelt. Trägt man die gemessene Fluoreszenzintensität gegen die bekannten Zellzahlen auf, so erhält man die Standardkurve. Diese wurde für die vorliegende Arbeit nur exemplarisch für $n=1$ getestet, da ein relativer Vergleich bereits durch die Fluoreszenzmessung möglich war und für die Erstellung der Kalibrationskurve große Zellanzahlen benötigt werden.

3.6 Transdifferenzierungsexperimente

3.6.1 5-Azacytidin induzierte kardiogene Differenzierung

Von Experimenten mit anderen Stammzellgruppen wie MSC oder ESC ist bereits bekannt, dass durch definierte chemische Substanzen bzw. bioaktive Moleküle die (Trans-)Differenzierung in kardiomyozytenähnliche Zellen möglich ist. Sollte eine solche Neubildung von Herzmuskelgewebe durch *in vitro* Stimulation von EPDC möglich sein, wären sie der ideale Kandidat für regenerative Therapien am Herzen. In verschiedenen Experimenten mit ESC, MSC, Sca-1⁺-CPC und ADSC konnte eine Behandlung mit 5-Azacytidin eine kardiomyogene Differenzierung der Zellen induzieren [77, 105, 114, 200-202]. Analog zu diesen Versuchen sollten EPDC der Passage 2 (P₂) mit 5-Azacytidin-haltigem Medium stimuliert und eine mögliche kardiomyogene Differenzierung der Zellen morphologisch und auf Genexpressionsebene untersucht werden.

Es wurden Differenzierungs-Medien mit FCS in den Konzentrationen 5 %, 10 % und 30 % hergestellt (Letzteres entspricht dem Standardkulturmedium), da für eine erfolgreiche Differenzierung geringere Serumkonzentrationen vorteilhaft sein können. Den Medien wurde außerdem 5-Azacytidin in der Konzentration 10 $\mu\text{mol/l}$ für 24 h zugesetzt. Anschließend erfolgte die weitere Kultur der Zellen in Medien ohne 5-Azacytidin mit der zuvor gewählten FCS-Konzentration. Die Plattenbelegung kann Abbildung 3.3 entnommen werden. Die Differenzierungs-Medien wurden aufgrund der Thermoinstabilität des 5-Azacytidins für jedes Experiment aus einem Gefriervorrat neu hergestellt und steril filtriert. Eine Untersuchung auf morphologische Veränderungen erfolgte täglich mit einem Lichtmikroskop. Die kardiomyogene Differenzierung der Zellen wurde nach drei Wochen auf mRNA-Ebene (engl. *messenger ribonucleic acid*) mittels quantitativer *Real-Time PCR* (qPCR) analysiert.

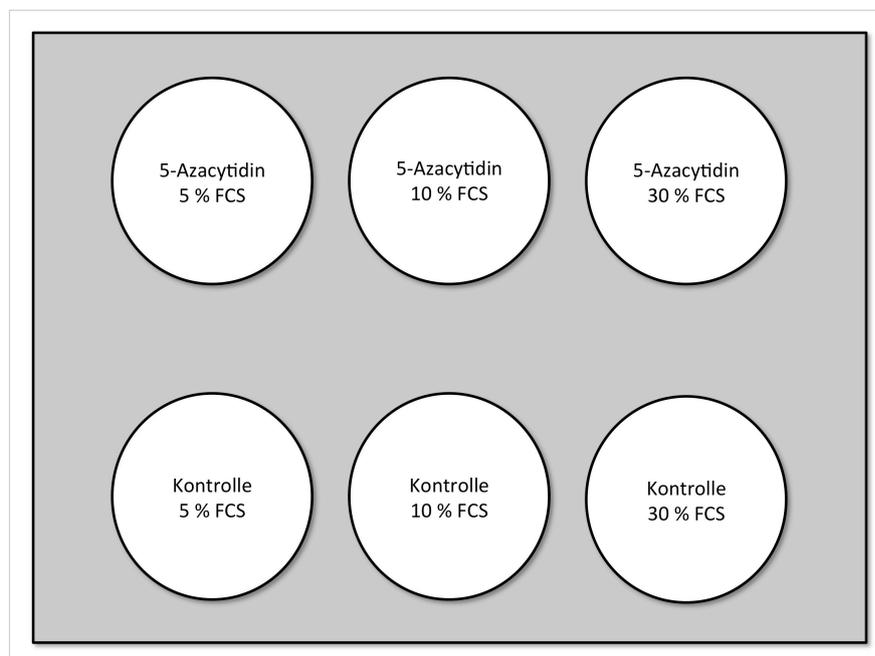


Abbildung 3.3: Plattenbelegung bei Inkubation mit 5-Azacytidin. Die Inkubation mit 5-Azacytidin-haltigem Medium erfolgte bei 60-80 % Konfluenz mit P_2 -Zellen für 24 h, anschließend wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 3 Wochen in EPDC-Standardkulturmedium kultiviert.

3.6.2 Transdifferenzierungsexperimente mit Aktivin A, BMP4, FGF-2, Wnt-Inhibitoren und Wnt-Aktivatoren

Neben 5-Azacytidin sind u.a. Aktivin A, BMP4, FGF-2, der Inhibitor des Wnt-Signalweges IWP-2 sowie das Small molecule CHIR99021, ein Wnt-Aktivator, bekannt für ihre kardiointduktiven Wirkung auf bestimmte Zellpopulationen [79, 80, 82, 107, 203-209]. Diese Substanzen wurden hier ebenfalls als potenzielle Induktoren für die kardiomyogene Transdifferenzierung der EPDC eingesetzt. Die Versuchsbedingungen wurden in Anlehnung an die vorhergehenden Experimente mit 5-Azacytidin modifiziert. Die Inkubation mit den Faktoren erfolgte einzeln und in verschiedenen Kombinationen in Medium mit 30 % FCS. Die Substanzen und ihre Konzentrationen

in den Differenzierungsmedien wurden entsprechend von Angaben in der Literatur und auf Empfehlung von PD Dr.rer.nat. Boris Greber (Max-Planck-Institut für molekulare Biomedizin, Universität Münster) gewählt. Die Konzentrationen der Wirkstoffe in den verschiedenen Versuchsansätzen sind dem Materialteil zu entnehmen (siehe Tabelle 2.9). Analog zu den Differenzierungsversuchen mit 5-Azacytidin wurden P₂-EPDC bei einer 60-80 % Konfluenz mit den verschiedenen Differenzierungsmedien inkubiert. Im Screening für die kardiomyogene Induktionsfähigkeit einzelner Faktoren (Plattenbelegung entsprechend Abbildung 3.4) wurde die Kulturzeit auf sieben Tage nach Ende der Induktion verkürzt, bei Stimulation mit mehreren bioaktiven Substanzen (Plattenbelegung entsprechend Abbildung 3.5) wurden 14 Tage abgewartet. CHIR99021 wurde in der kombinierten Stimulation nicht eingesetzt, da seine Wirkung der von IWP-2 entgegengesetzt ist. Die Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen untersucht. Nach Ende der Kulturzeit wurde die Expression kardialer Marker mittels qPCR analysiert.

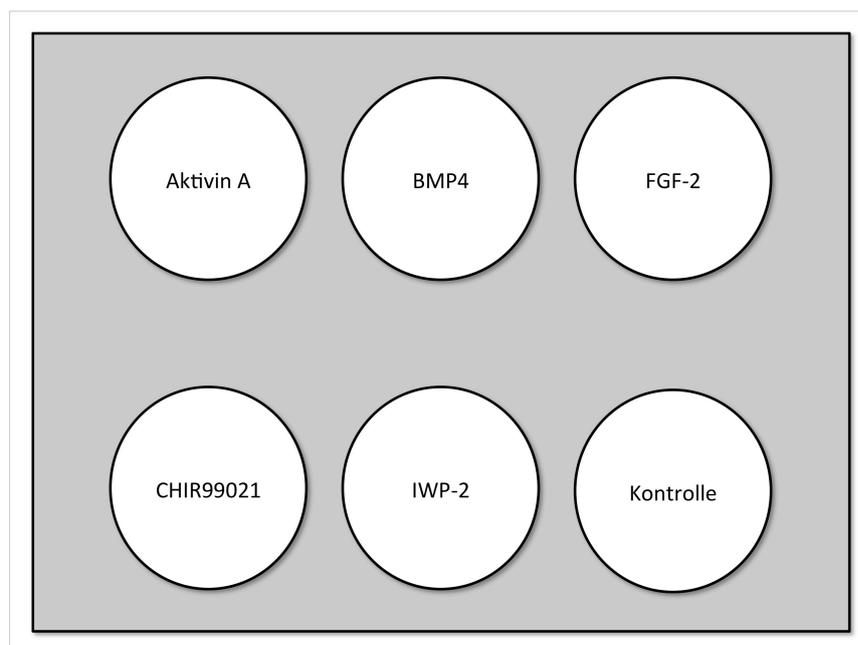


Abbildung 3.4: Plattenbelegung bei Inkubation mit einzelnen bioaktiven Molekülen. Die Inkubation erfolgte bei 60-80 % Konfluenz mit P₂-Zellen für 7 d.

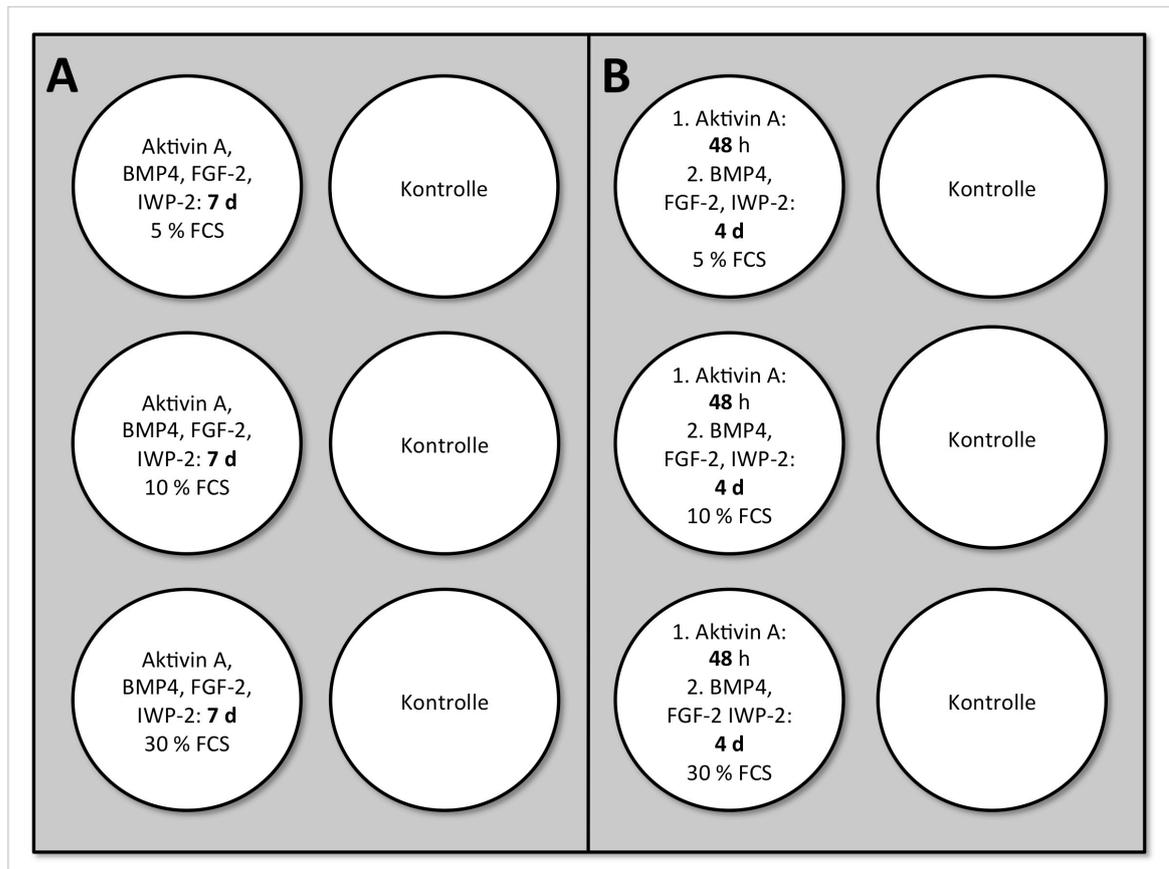


Abbildung 3.5: Plattenbelegung bei Inkubation mit mehreren bioaktiven Molekülen. Die Inkubation erfolgte bei 60-80 % Konfluenz mit P_2 -Zellen. Protokoll **A** sah eine gleichzeitige Inkubation mit den genannten Substanzen vor; bei Protokoll **B** wurde eine Voraktivierung mit Aktivin A für 48 h durchgeführt, bevor eine Zugabe von BMP4, IWP-2 und FGF-2 für weitere 4 Tage erfolgte. Die Expressionsanalysen erfolgten 7d nach Ende der Induktion.

3.7 Expressionsanalysen mittels quantitativer *Real-Time PCR*

3.7.1 Prinzip der qPCR

Expressionsuntersuchungen mittels qPCR wurden für kardiale Strukturproteine und Transkriptionsfaktoren sowie Rezeptoren und Enzyme des purinergen Systems durchgeführt. Durch Untersuchung der mRNA kann die aktuelle Genregulation und -expression in Zellen untersucht werden. Dazu wird zunächst die RNA aus dem Probenmaterial isoliert und dann in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wiederum kann mittels qPCR vervielfältigt und mithilfe fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden auf die Transkripte bestimmter Gene untersucht werden. Um eine Relativierung der gemessenen Genprodukte in Bezug zur vorhandenen RNA-Menge zu ermöglichen, wurden sie mithilfe der Expression zweier Referenzgene (engl.: *housekeeping genes*) normalisiert. Diese Gene werden auf relativ konstantem Niveau exprimiert und dienen der Zellhomöostase. Es wurden *β-actin* und *tata-box-protein* (Tbp) als Haushaltsgene ausgewählt.

In jedem Zyklus der PCR ergibt sich eine Verdoppelung der cDNA, sodass die Menge exponentiell zunimmt. Dieser Anstieg kann mittels fluoreszierender Sonden gemessen werden, wenn der Reporterfarbstoff mit einem Laser angeregt wird. Für die vorliegende Arbeit wurden *TaqMan*-Sonden verwendet. Diese Sonden binden spezifisch an den cDNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern. Sie verfügen über einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff und einen Quencher, der eine Lichtemission des Reporters verhindert, solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander befinden. Bei der Elongation, also der Vervielfältigung des cDNA-Abschnittes durch enzymatisches Anlagern von Nukleotiden, wird die Sonde durch die DNA-Polymerase gespalten. Der Reporter wird vom Quencher getrennt und gibt ein Fluoreszenzsignal ab, welches proportional zur amplifizierten Menge des cDNA-Produktes ist. Der PCR-Zyklus, bei dem die Intensität der Fluoreszenz die Grundlinie übersteigt, wird mit einem C_T -Wert nummeriert (engl.: *cycle threshold*). Da mit jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge im Versuchsansatz zu erwarten ist, entspricht ein um eine Einheit kleinerer C_T -Wert der doppelten Menge an cDNA.

3.7.2 Herkunft der Proben für die qPCR

Sofern EPDC direkt nach der Isolation untersucht werden sollten, wurden sie durch Hämolysebehandlung und anschließende magnetische Zellseparation (MACS, siehe Abschnitt 3.3) von Verunreinigung mit Immun- und anderen Blutzellen befreit. Kardiomyozyten, die als Positivkontrolle dienten, wurden durch Zerkleinern des Herzens nach EPDC-Isolation durch Verarbeitung mittels Gewebeschnieder und Gewebehomogenisator gewonnen. Alle Zellproben wurden dann bei -80°C bis zur Isolation der RNA (siehe 3.7.3) verwahrt. Bei Proben aus mehrtägigen Zellkulturversuchen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann unverzüglich bei -80°C in ihren Kulturplatten eingefroren. Die Zellen wurden später mittels Zellschabern und dem Lysepuffer des RNeasy-Mini Kits (*Qiagen*, Hilden, Deutschland) von der Oberfläche des Zellkulturgeschirrs gelöst und dann für RNA-Isolation verwendet.

3.7.3 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation wurde mit dem RNeasy-Mini Kit (*Qiagen*, Hilden, Deutschland) entsprechend dem Protokoll des Herstellers vorgenommen. Die Zellen wurden nach Zugabe des RLT-Puffers durch mehrfaches Aufziehen in einer Einmalspritze homogenisiert, um die Lyse der Zellen zu unterstützen. Kontaminanten wie genomische DNA wurden durch mehrere Waschstritte und einen DNA-Verdau entfernt. Die RNA-Aufreinigung erfolgte dann über Trennsäulen, an die Nukleinsäuren binden. Die eluierte RNA wurde mithilfe eines NanoDrop 2000-Spektralphotometers quantifiziert (*Thermo Fisher Scientific*, Rockford, USA) und bis zur reversen Transkription bei -80°C verwahrt.

3.7.4 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die gesamte RNA einer Zelle mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre cDNA-Stränge umgeschrieben. In dieser Arbeit wurden dafür das *Quantitec Reverse-Transcription Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) und der Master Cycler Gradient S (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die maximal eingesetzte RNA-Menge im Endreaktionsvolumen von 20 µl betrug 500 ng. In jedem Ansatz wurde eine Probe ohne RNA-Matrize als Negativ-Kontrolle (engl. *non-template control*, NTC) sowie eine Probe mit zufälliger RNA-Probe ohne Zugabe von Reverser Transkriptase mitgeführt. Letztere Probe kann eine Verunreinigung der Versuchskemikalien mit genomischer DNA anzeigen. Die Zusammensetzung der Einzelkomponenten im Reaktionsvolumen ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die reverse Transkription.

RNA	max. 12 µl
H ₂ O	12 - [RNA] µl
gDNA-Whipe-out-Puffer	2 µl
RT Puffer	4 µl
RT-Primer-Mix	1 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

Zunächst wurden die RNA und der *gDNA Wipe Out Buffer* für zwei Minuten bei 42 °C erhitzt, um erneut mögliche genomische DNA-Kontaminanten zu zerstören. Dann wurden Puffer, Primer und die Reverse Transkriptase hinzugegeben. Anschließend begann die cDNA-Synthese. Die RNA diente als Matrize, an welche die Oligo-Nucleotid-Primer banden. Die Reverse Transkriptase synthetisierte cDNA-Stücke unterschiedlicher Länge ausgehend von diesen Primern während der Inkubation bei 42 °C für 15 Minuten. Zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben zuletzt für 3 min auf 95 °C erhitzt. Die cDNA wurde bei -20 °C bis zum Einsatz in der qPCR gelagert.

3.7.5 Real-time PCR

Die Messung der Expressionslevel der cDNA-Proben erfolgte in 96-Well Platten. Die Ansätze für die PCR-Reaktionen wurden als Dreifachbestimmung angesetzt. Sofern die später bestimmten C_T-Werte um mehr als 0,2 voneinander abwichen, wurde eine zusätzliche Bestimmung durchgeführt und die abweichende Messung als Pipettierfehler gewertet. Für jedes zu quantifizierende Gentranskript wurde ein Reaktionsansatz mit Nukleotid-Gemisch, destilliertem Wasser, spezifi-

schen Primern und Sonden erstellt. Für die Haushaltsgene wurden Sonden und Primer einzeln hinzugefügt; für kardiale Marker sowie für die Rezeptoren und Enzyme des purinergeren Systems standen TaqManGene Expression Assays der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) zur Verfügung (Einzelheiten siehe Tabelle 2.5, Tabelle 2.6 und Tabelle 2.7). Tabelle 3.2 zeigt die Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die qPCR-Reaktion.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die qPCR.

Ansatz ohne TaqMan-Assay		Ansatz mit TaqMan-Assay	
Forward Primer (5 μ M)	2,0 μ l		
Reverse Primer (5 μ M)	2,0 μ l		
Sonde (5 μ M)	0,4 μ l	TaqMan Assay	0,5 μ l
2 x Fast qPCR MasterMix Plus	5,0 μ l	2 x Fast qPCR MasterMix Plus	5,0 μ l
H ₂ O	1,6 μ l	H ₂ O	3,5 μ l
cDNA	1,0 μ l	cDNA	1,0 μ l
Summe	10 μl	Summe	10 μl

Die PCR-Reaktionen wurden in einem StepOnePlus Real-time PCR-System (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Reaktionsplatten auf 95 °C erhitzt, um die TaqMan-Polymerasen zu aktivieren. Eine Trennung von Doppelsträngen wurde bei gleicher Temperatur erreicht (Denaturierung). Ein Absenken auf 60 °C für 1 min ermöglichte eine Anlagerung der Primer an die DNA (Hybridisierung). Von den Hybridisierungsstellen ausgehend konnten die gewünschten cDNA-Abschnitte vervielfältigt werden (Elongation). Es wurden 40 Zyklen durchgeführt.

3.7.6 Relative Quantifizierung mit der ΔC_T - und $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak)-Methode

Die Kalkulation der basalen Expression erfolgte mithilfe der ΔC_T -Methode zur Relativierung der amplifizierten cDNA-Produkte zu Referenzgenen mit konstantem Expressionsniveau. Bei den Transdifferenzierungsexperimenten konnte außerdem die Expression der behandelten Gruppen im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak-Methode [210]) relativiert werden. Nachfolgende Erläuterung der Berechnung ist angelehnt an den *Real-Time PCR Applications Guide* der Firma *Bio-Rad Laboratories* [211]: Aus den C_T -Werten der jeweiligen Zielgene und der Referenzgene wird zunächst der Mittelwert berechnet. Die Genexpression wird

relativiert durch die Subtraktion des C_T -Mittelwertes eines Zielgens vom C_T -Mittelwert des Referenzgens. Die Verdopplung der DNA-Menge mit jedem PCR-Zyklus wird einberechnet, indem die Basis 2 mit dieser Differenz potenziert wird (Gleichung 5).

$$\text{normalisierte Zielgenexpression} = 2^{C_T(\text{Referenzgen}) - C_T(\text{Zielgen})} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Handelt es sich um ein Transdifferenzierungsexperiment, wird die Rechnung durch Anwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode erweitert. Sie relativiert die Expression der induzierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und macht eine Bewertung des Behandlungseffekts möglich (Gleichungen 6-9).

$$\Delta C_{T(\text{Test})} = C_{T(\text{Zielgen,Test})} - C_{T(\text{Referenzgen,Test})} \quad (\text{Gleichung 6})$$

$$\Delta C_{T(\text{Kontrolle})} = C_{T(\text{Zielgen,Kontrolle})} - C_{T(\text{Referenzgen,Kontrolle})} \quad (\text{Gleichung 7})$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Test})} - \Delta C_{T(\text{Kontrolle})} \quad (\text{Gleichung 8})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (\text{Gleichung 9})$$

3.8 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Berechnungen und die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgten mit GraphPad Prism sowie Microsoft Excel. Für den Mittelwertvergleich wurden der Wilcoxon-Test (gepaarte Proben) oder der Mann-Whitney-U-Test (ungepaarte Proben) verwendet. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Es wurde simultan unter Annahme einer Normalverteilung mit dem gepaarten bzw. ungepaarten T-Test und einer One-way-ANOVA verfahren. Da aufgrund der geringen Stichprobenanzahl nicht sicher von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde bei Bezugnahme auf die Ergebnisse letzterer Testungen das Ergebnis gesondert kommentiert. Ohne besondere Kommentierung handelt es sich ausschließlich um Ergebnisse aus nichtparametrischen Berechnungen. Als Signifikanzniveaus wurden $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ und $***p \leq 0,001$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologie und Wachstumsmuster epikardialer Zellen nach Myokardinfarkt

EPDC wurden im Rahmen dieser Arbeit nach einer neu etablierten Methode isoliert, bei der es sich um eine Modifikation von bisherigen Isolationsprotokollen handelt [193]. Es besteht die Möglichkeit, dass die isolierte Population sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften von den EPDC-Populationen anderer Forschungsgruppen unterscheiden, auch wenn ihre epikardiale Herkunft auf Grund der *WT-1*-Expression unzweifelhaft ist [193]. Während sämtlicher Zellkulturexperimente wurde eine tägliche Untersuchung der Zellen mittels eines inversen Lichtmikroskops durchgeführt, um so die morphologischen Eigenschaften der Zellen zu studieren und mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen.

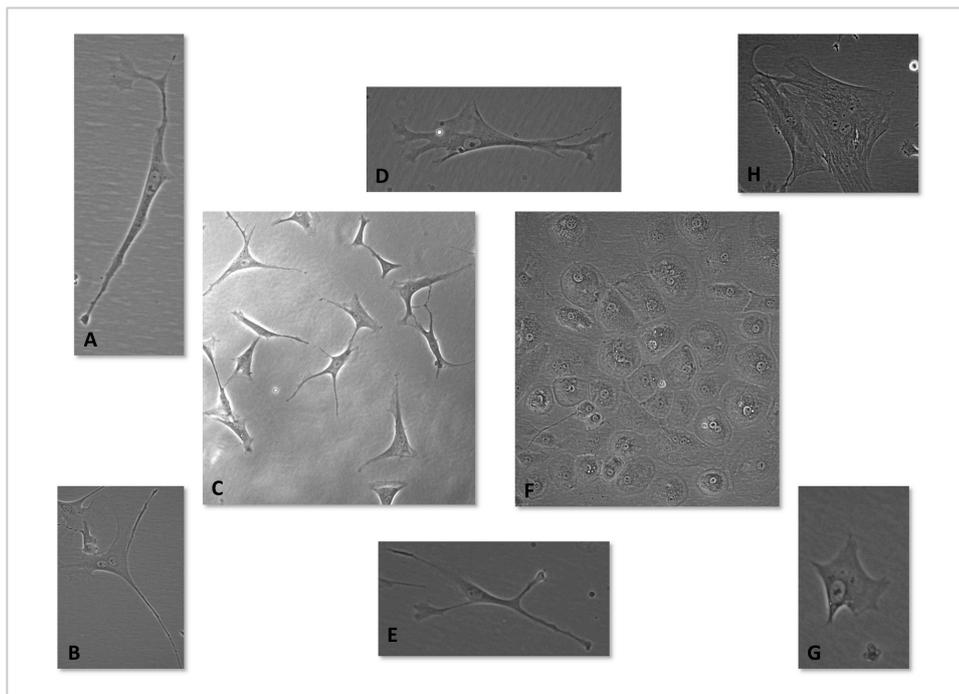


Abbildung 4.1: Morphologie von Ratten-EPDC nach myokardialer Infarzierung in Zellkultur. A-E mesenchymal-fibroblastenartige EPDC, F & G pflastersteinartige Formierung, H riesig-stumpfwinklige Morphologie. Zum Teil mehrkernige Zellen in A, B, D, H. Objektive: 10x in C & F, A, B, D, E, H & G 20x.

Im Hinblick auf die einzelne Zelle fanden sich grundsätzlich drei verschiedene morphologische Typen: Fibroblasten ähnelnde, mesenchymale Zellen mit langen, schlanken Zellausläufern (Abbildung 4.1, A-E), große polygonale Zellen mit vermehrt stumpfwinkligen, kurzen Ausläufern und deutlich erkennbarem Zytoskelett (Abbildung 4.1, H) sowie Zellen die „pflastersteinartig“ imponierten (engl. *cobble-stone*, [59] [194], Abbildung 4.1, F und G).

Alle Zellen wuchsen adhärent über zahlreiche Passagen. Die fibroblastenähnlichen Zellen überwogen, wobei sie im Gegensatz zu den anderen Zelltypen auch mehrschichtig wuchsen. Im Zellverband fanden sich häufig zusammenliegende Gruppen von Zellen gleicher Morphologie, insbesondere von Zellen mit fibroblastenartigem und *cobble-stone*-Wachstum. Teilweise konnte eine Mehrkernigkeit beobachtet werden. Bei starker Konfluenz bildeten sich unter den fibroblastenähnlichen Zellen kugelförmige Zusammenballungen mit radialen Zellausläufern (Abbildung 4.2).

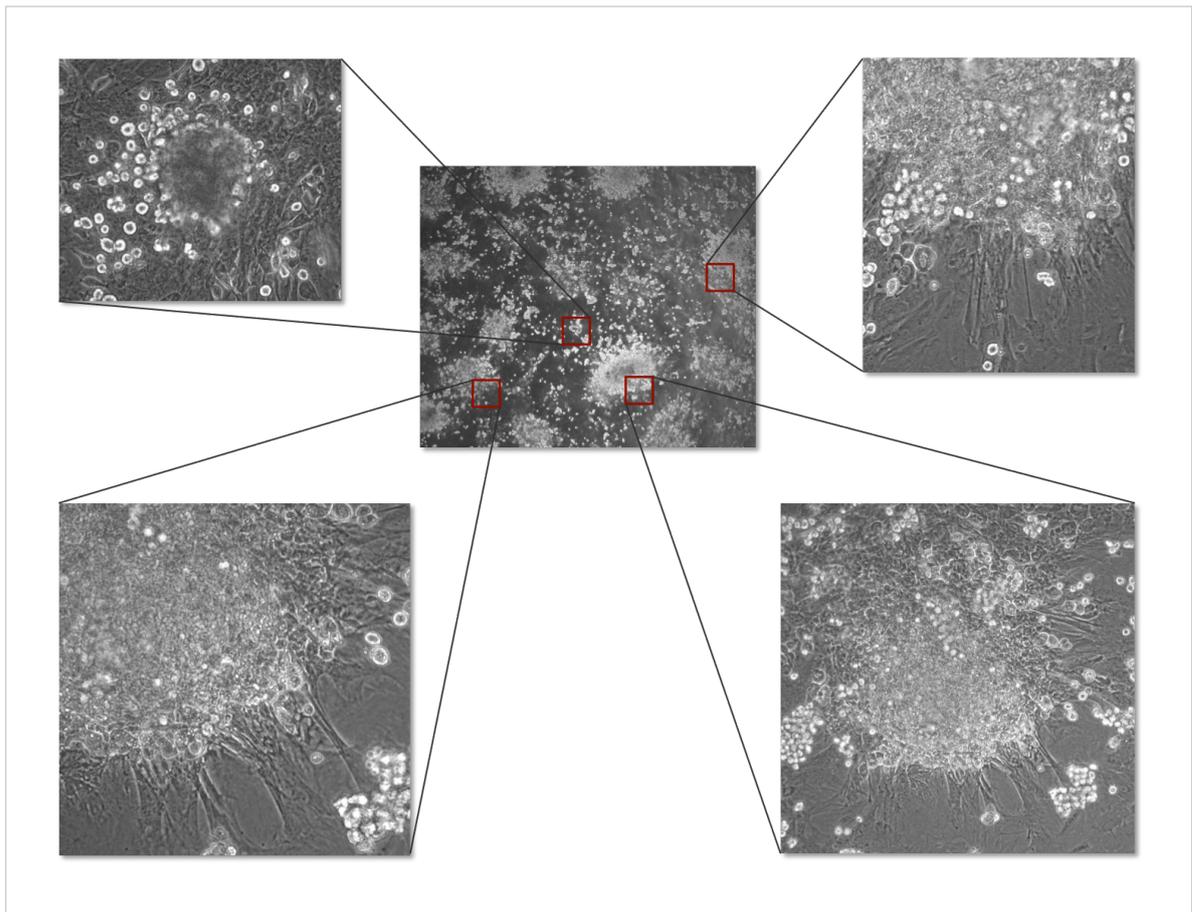


Abbildung 4.2: Kugelförmig-sphärenartige Zusammenballungen von EPDC. Mittig: Übersichtsaufnahme, links und rechts Detailaufnahmen. Auffällig sind auch radial verlaufende, schlanke Zellen an den Sphärenrändern. Objektive: 5x (Mitte) und 10x.

Bei vollständiger Konfluenz wurden außerdem Strukturen beobachtet, die in der Literatur bei anderen Zellpopulationen als „Myotubules“ beschrieben wurden und als langgestreckte, teils verzweigt anmutende Zellen oberflächlich über darunter liegenden Zellen wuchsen (Abbildung 4.3). Es konnte keine Querstreifung und keine spontanen Kontraktionen gefunden werden.

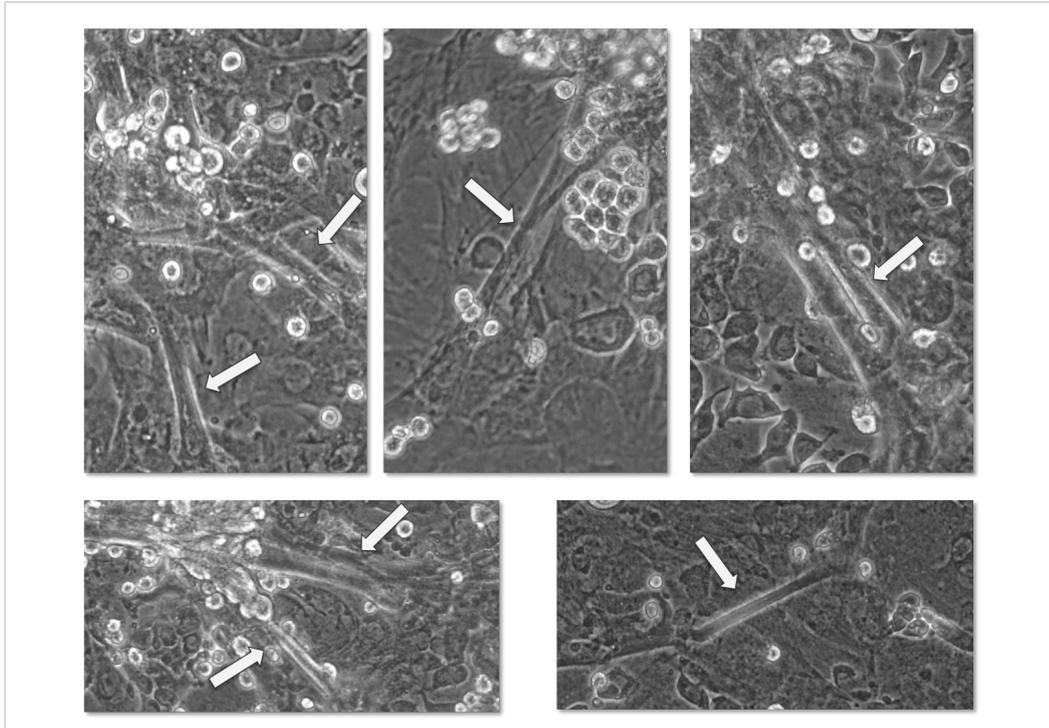


Abbildung 4.3: Mögliche „Myotubules“ in Form von langgestreckten EPDC. Diese Wachstumsform (weiße Pfeile) zeigte sich bei vollständiger Konfluenz sowohl unter Standardkulturbedingungen als auch bei den Transdifferenzierungsexperimenten.

4.2 Populationsverdopplungszeit und Wachstumsverhalten nach Myokardinfarkt

Aufgrund des modifizierten Isolationsprotokolls war die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der epikardialen Zellen nach Infarkt ein wichtiger Ausgangspunkt für zukünftige Experimente. Für die Bestimmung der Populationsverdopplungszeit wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zunächst wurde eine regelmäßige Teilung, Zählung und erneute Aussaat von 20.000 Zellen durchgeführt. Dies entspricht dem üblichen Umgang mit einer Langzeit-Zellkultur, bei der ebenfalls eine Neuaussaat erfolgt. Dabei ergab sich eine Populationsverdopplungszeit von $37,80 \pm 13,50$ h (Abbildung 4.4). Ein kleiner Teil der Populationen benötigte wesentlich länger, unabhängig davon, ob es sich um eine frühere oder spätere Passage handelte (Abbildung 4.4, blauer Pfeil).

Außerdem wurde eine statische Kultur (Zellzahl zu Beginn 5000/Well) zur Erstellung einer Wachstumskurve untersucht. Dafür wurden EPDC in Dreifachbestimmung im Abstand von 1-4 Tagen über einen Zeitraum von ca. 30 Tagen lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Kammer gezählt. Halblogarithmisch aufgetragen ergab sich eine Wachstumskurve mit typischem Verlauf (Abbildung 4.5).

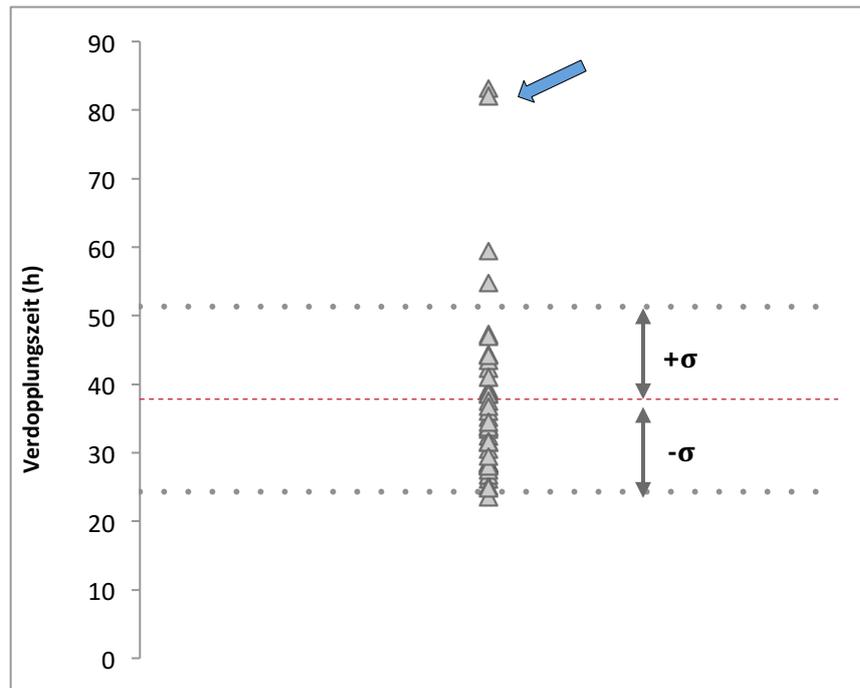


Abbildung 4.4: Populationsverdopplungszeit von EPDC aus infarzierten Rattenherzen. Die Zählung erfolgte bei Passagierung, anschließend wurden die Zellen erneut ausgesät. Mittelwert 37,80 h (rote Linie), Standardabweichung (σ) \pm 13,50 h (grau-gepunktete Linien und graue Pfeile). Der blaue Pfeil markiert Messungen mit ungewöhnlich langer Populationsverdopplungszeit ($n=3$).

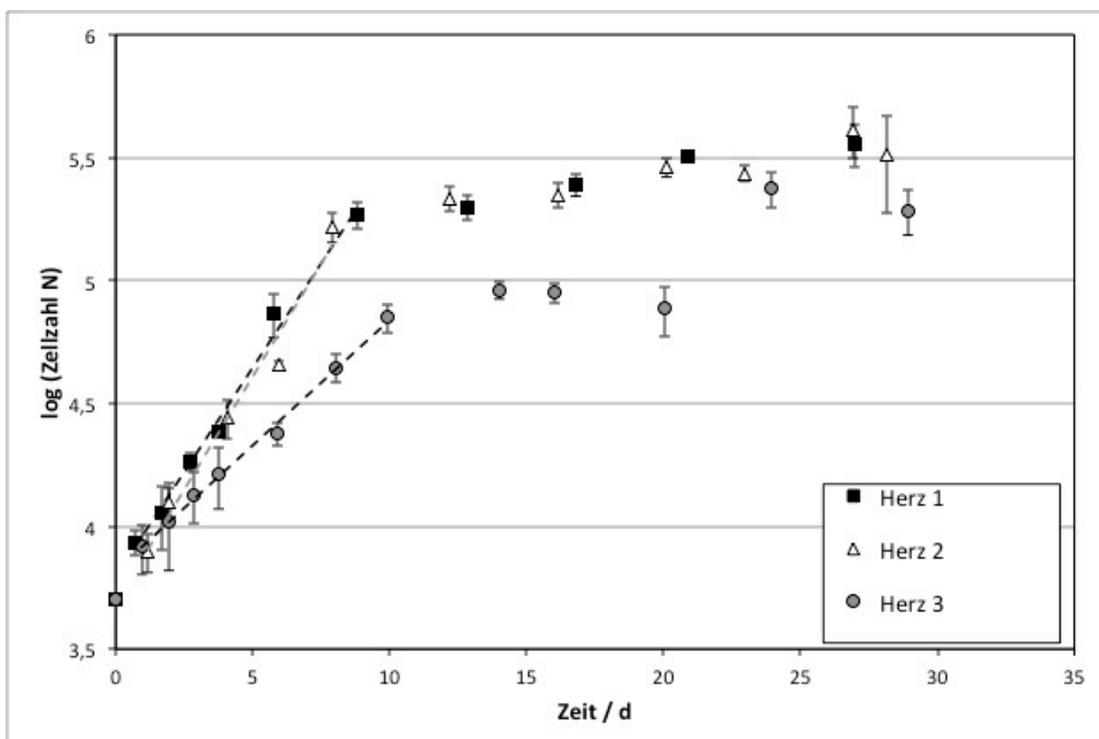


Abbildung 4.5: Wachstumskurve von EPDC aus infarzierten Rattenherzen. Im Zeitraum des exponentiellen Wachstums (log-Phase) konnte mittels Regressionsgeraden die Populationsverdopplungszeit berechnet werden. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei Einzelmessungen \pm Standardabweichungen ($n=3$).

Die Zellen adhärten rasch nach Aussaat und begannen mit der Zellteilung noch im Zeitraum bis zur ersten Zählung nach 24 h. Die Initialphase (lag-Phase) zwischen Beimpfen und Erreichen der maximalen Teilungsrates nach Adaptation an die Zellkulturbedingungen ist in der graphischen Darstellung nicht sicher zu identifizieren, da sie bereits vor der ersten Zählung abgeschlossen war. In der anschließenden Phase des exponentiellen Wachstums (log-Phase) wiesen die Zellen eine konstante Verdopplungszeit auf. Das Zellwachstum verlangsamte sich ab dem 8-10. Tag und ging in eine stationäre Phase (auch Plateauphase) über. Eine vollständige Kontaktinhibition bei Konfluenz fand nicht statt, da die Zellzahlen auf einem langsameren Wachstumsniveau weiter anstiegen. Die Absterbephase lag nicht im beobachteten Zeitraum. Die Populationsverdopplungszeit (P_d , engl. *population doubling time*) kann im Bereich des exponentiellen Wachstums in der log-Phase berechnet werden. Es ergab sich eine Verdopplungszeit von $50,87 \pm 10,13$ h ($n=3$).

4.3 Migratorische Kapazität von EPDC

In der vorliegenden Arbeit sollte auch untersucht werden, inwiefern die EPDC aus adulten infarzierten Rattenherzen, die kein pharmakologisches Priming erhalten haben, *in vitro* basale Fähigkeiten im Bereich der Migration und Chemotaxis besitzen. Als chemoattraktive Substanzen wurden ATP- und serumhaltiges Medium in Boyden-Kammern eingesetzt und der Anteil der EPDC, der chemotaktisch migrierte, anhand Nukleinsäure-Fluoreszenz gemessen. Als Maßeinheit für die Wirkung der chemoattraktiven Substanzen wurden in Abbildung 4.6 relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) aufgetragen. Sie machen einen relativen Vergleich der Gruppen untereinander möglich, da der Fluoreszenzfarbstoff mit der Menge der zellulären Nukleinsäuren und somit der Zellzahl in der Probe korreliert [212]. Außerdem wurde exemplarisch eine Standardkurve mit unterschiedlichen Zellzahlen erstellt, um den RFU entsprechende absolute Zellzahlen abschätzen zu können (Abbildung 4.7).

Es zeigte sich, dass eine Membranporengröße von 3 μm keine Migration der Zellen erlaubte. Eine Porengröße von 8 μm erwies sich hingegen als passend. Die Wirkung der chemoattraktiven Substanzen auf das Migrationsverhalten der EPDC ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Hier zeigte sich zunächst, dass auch ohne Chemoattraktantien eine ungerichtete Migration durch die Membran stattfand (*Quenching Medium*-Gruppe). ATP bewirkte eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung des Fluoreszenzsignals, sodass eine chemotaktische, also gerichtete Bewegungsfähigkeit der EPDC bereits vermutet werden kann. Wurde das Medium unterhalb des Membraneinsatzes mit 30 % FCS versetzt, verdreifachte sich das Fluoreszenzsignal: Bei Verwendung des Standardzellkulturmediums mit Zusatz von 30 % FCS migrierten signifikant mehr

Zellen als unter Einsatz von Quenching- oder ATP-haltigem Medium (unter Annahme einer Normalverteilung).

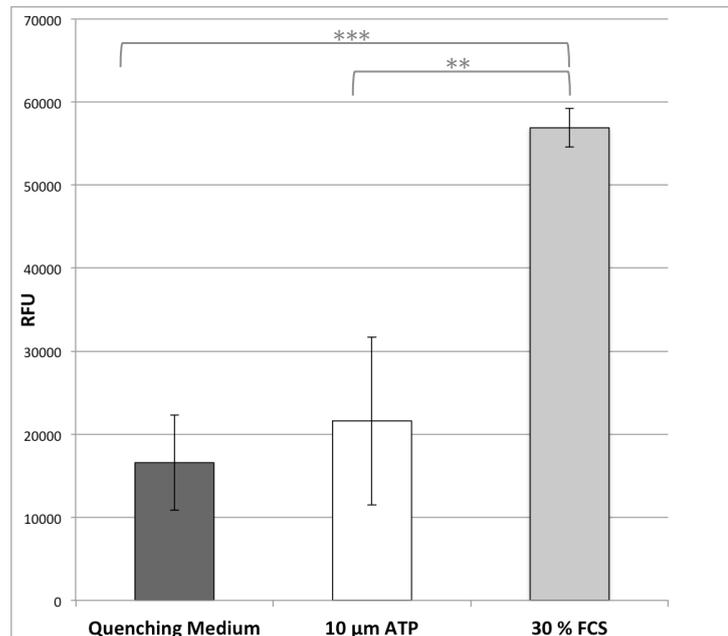


Abbildung 4.6: Chemotaktische Migration von EPDC im Boyden-Kammer-System. Ein relativer Vergleich der Wirksamkeit der Lockstoffe auf die EPDC wird möglich durch die Fluoreszenzmessung in relativen Fluoreszenzeinheiten (engl. RFU) nach Abzug des Leerwertes (Materialfluoreszenz). Einsatz von je 100.000 Zellen über 16 h. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung, $**p < 0,01$, $***p < 0.001$ unter Annahme einer Normalverteilung ($n=3$).

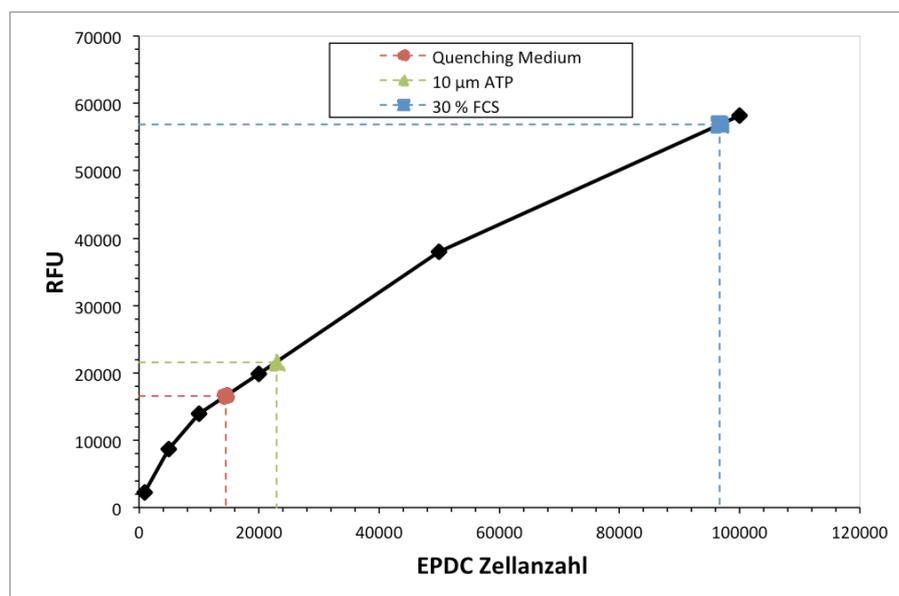


Abbildung 4.7: Standardkurve zur Korrelation von EPDC-Anzahl und RFU. Die Fluoreszenzmessung definierter Zellmengen erfolgte hier ohne den Einsatz eines Membraneinsatzes. Nach Lyse der Zellen wurde die fluoreszenzmarkierte Nukleinsäure-Menge (in RFU) im Plattenlesegerät erfasst und gegen die bekannten Zellzahlen aufgetragen. Kreis, Dreieck und Quadrat markieren die Mittelwerte aus **Abbildung 4.6**. Exemplarisch für $n=1$.

Wird der Mittelwert der RFU der Migrationsgruppen mittels einer Kalibrationskurve (hier exemplarisch für $n=1$) mit einer absoluten Zellzahl korreliert, so migrierten unter Einfluss des

Quenching Mediums (ungerichtete Migration) ca. 14.500 Zellen, nach ATP-Zugabe ca. 22.900 Zellen und unter FCS-Einfluss ca. 96.700 Zellen durch die Membran (siehe Abbildung 4.7).

4.4 Basales Expressionsprofil von EPDC

4.4.1 Expression ausgewählter Enzyme und Rezeptoren des purinergeren Signalsystems

Um zu untersuchen, ob EPDC Teil purinerger Signalgebung im infarzierten Herzen sind, wurde die mRNA-Expression von ausgewählten Rezeptoren und Enzymen dieses Systems in frisch isolierten (P_1) und kurzzeitig kultivierten (P_2) EPDC analysiert (Abbildung 4.8). Die Isolation der Zellen erfolgte sieben Tage nach I/R. Um eine Verfälschung der Genexpressionsanalyse durch Kontamination mit RNA aus anderen Zellfraktionen auszuschließen, wurden die Leukozyten zuvor im MACS-System depletiert. Eine Verunreinigung durch weitere Blutzellen wie Erythrozyten und Thrombozyten ist bei Langendorff-Verdau und nach Verwendung des ACK-Lyse-Puffers vernachlässigbar [28]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkripte der E-NTPDase CD39 und der Ekto-5'-Nukleotidase CD73 quantifiziert, die den Abbau von Nukleotiden zu AMP und schließlich zu Adenosin katalysieren.

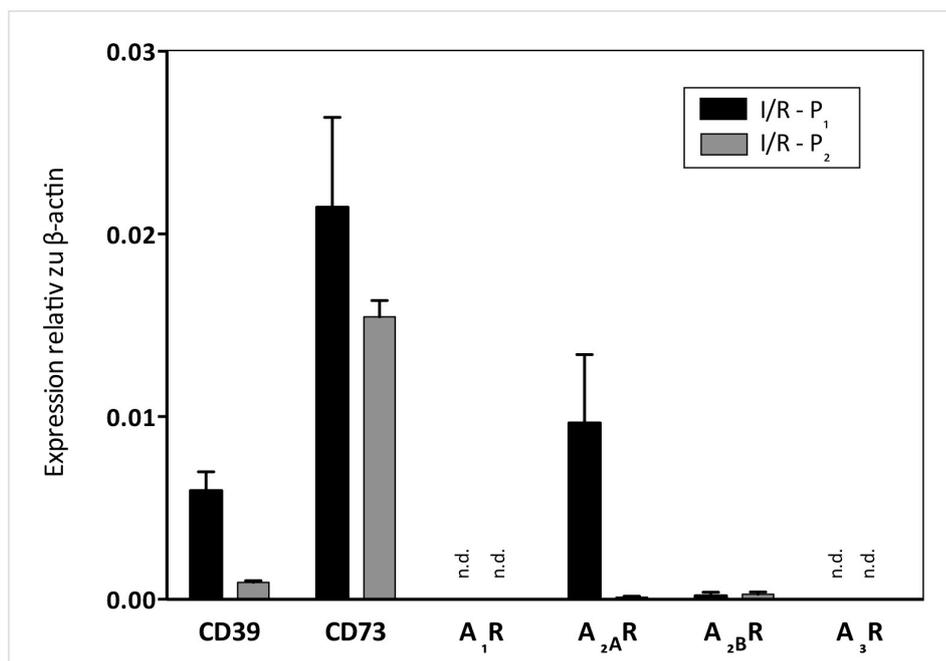


Abbildung 4.8: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von Enzymen und Rezeptoren des purinergeren Signalsystems in EPDC aus infarzierten Herzen und ihre Veränderung unter Kulturbedingungen. Bei P_1 handelt es sich um Zellen, die unmittelbar nach Isolation und Leukozytendepletion untersucht wurden. P_2 -EPDC wurden nach Expansion in Zellkultur bei der 1. Passagierung gewonnen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=3$).

Außerdem wurden die Expressionslevel der Adenosinrezeptoren A_1 -R, A_{2A} -R, A_2 -R und A_3 -R in den EPDC bestimmt. So kann abgeschätzt werden, ob EPDC selbst Ziel autokriner oder parakriner purinergere Signale – vermittelt durch das lokal entstandene Adenosin – werden könnten.

In den P_1 -EPDC fanden sich sowohl Transkripte von CD39 als auch von CD73 mit deutlich höherer Expression der Ekto-5'-Nukleotidase. Das Expressionsniveau der CD39 nahm in der P_2 -Kultur signifikant ab, sofern eine Normalverteilung angenommen wurde. Das Niveau der CD73 zeigte keine wesentliche Expressionsänderung. Unter den Adenosinrezeptoren war der A_{2A} -Rezeptor in den P_1 -Zellen mit Abstand am stärksten exprimiert. Seine Expression sank während der Kulturzeit beinahe bis unter die Nachweisgrenze. A_{2B} -Rezeptoren waren in geringerer Ausprägung ebenfalls in den EPDC direkt nach der Isolation vorhanden, mit etwa gleichbleibendem Expressionsniveau in der Kulturgruppe. Die A_1 - und A_3 -Rezeptoren konnten weder im P_1 -Isolat, noch in den P_2 -Zellen detektiert werden.

4.4.2 Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und Strukturproteine

Um den Einfluss der Kulturbedingungen auf die Expression kardialer Marker und damit die Vorprägung und Differenzierung der Zellen zu untersuchen, wurden frisch isolierte MACS-separierte EPDC (P_1) mit kultivierten Zellen (P_2) verglichen. Gemessen wurde die basale Expression der herzmuskelspezifischen Proteine *Troponin T* und *MHC* sowie die Transkriptionsfaktoren *GATA4*, *Nkx2.5*, *MEF2C* und *Islet-1*, die während der embryonalen Kardiogenese von Herzmuskelzellen exprimiert werden. Der Nachweis erfolgte auf mRNA-Ebene mittels qPCR. Als Negativ-Kontrolle dienten MACS-separierte Lymphozyten; Herzmuskelzellen aus zerkleinertem Gewebe bildeten die Positiv-Kontrolle.

Abbildung 4.9 zeigt die Expression der genannten Transkriptionsfaktoren und der kardialen Proteine in beiden Passagen sowie im Vergleich zu Kardiomyozyten. Abbildung 4.9 **B** ist ein Vergrößerungsausschnitt von Abbildung 4.9 **A** ohne die Transkripte aus den Herzmuskelzellen für eine bessere Darstellung der EPDC-Gentranskripte. *MHC* fand sich in den MACS-separierten Zellen der P_1 -Isolate, nicht jedoch in P_2 -Zellen. *Isl-1* fand sich nur in vereinzelt Proben (ohne Abbildung). *NKx2.5* und *MEF2C* konnten in EPDC-Proben nicht nachgewiesen werden. Die Transkripte von *Troponin T* und *Gata4* waren als herzmuskelspezifische Marker in allen Proben nachweisbar, auch nach einigen Tagen in Kultur. Die Menge der *Troponin T*-mRNA-Transkripte nahm zwar in der Expansionszeit ab (ca. 4-7 d, je nach Ausgangszellzahl), war jedoch noch immer in allen P_2 -Proben detektierbar. *Gata4* hingegen war in P_2 ähnlich hoch exprimiert wie bei den P_1 -Zellen.

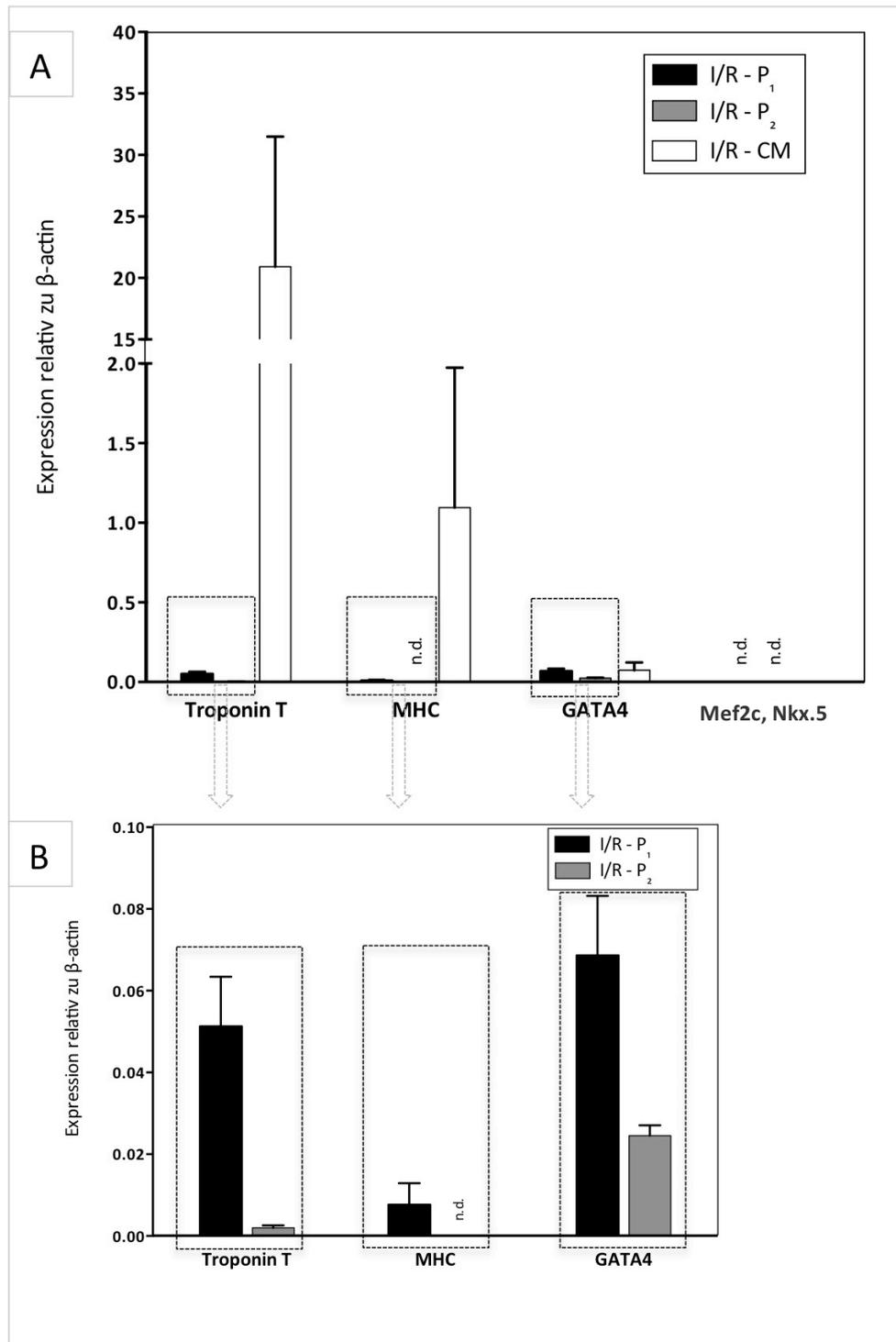


Abbildung 4.9: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Rattenherzen und ihre Veränderung unter Kulturbedingungen. Bei P₁ handelt es sich um Zellen, die unmittelbar nach Isolation und Leukozytendepletion untersucht wurden. P₂-EPDC wurden nach Expansion in Zellkultur bei der ersten Passagierung gewonnen. In A sind die Daten der EPDC aus B im Vergleich zur Expression von Kardiomyozyten (CM) aus infarzierten Herzen dargestellt. Mittelwerte ± Standardabweichung, n=3.

Um die Höhe der Expression zu relativieren, wurden Kardiomyozyten als Positivkontrolle auf die gleichen Transkripte untersucht (Abbildung 4.9, A). Die Expression von *Troponin T* lag in den reifen Herzmuskelzellen um ein Vielfaches höher (ca. 560x höher) als in den EPDC. Auch die

Expression von *MHC* war erwartungsgemäß höher, jedoch nicht in einem so hohen Ausmaß wie *Troponin T* (ca. 90x höher). Bei der Höhe der Expression von *Gata4* gab es zwischen den EPDC und den Kardiomyozyten keinen signifikanten Unterschied.

Zur Langzeitbeobachtung wurden EPDC nach der 1. Passage für weitere 7, 14 oder 21 Tage in einer statischen Kultur gehalten und die Expression von *Troponin T* und *Gata4* verglichen. Abbildung 4.10 zeigt dementsprechend die Expression von EPDC aus infarzierten Rattenherzen zu fünf Zeitpunkten über ca. 4 Wochen für *Troponin T* und *Gata4* (Zusammenstellung von Daten aus Abbildung 4.9, Abbildung 4.11, Abbildung 4.12, Abbildung 4.13).

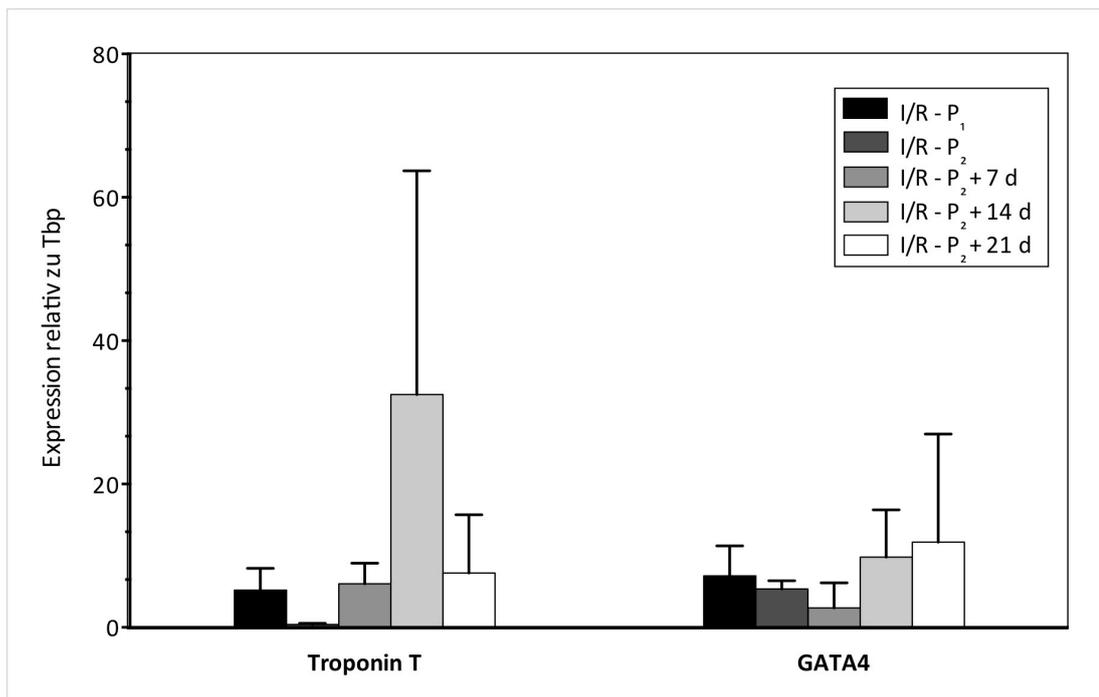


Abbildung 4.10: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen und ihre Veränderung in Langzeitzellkultur. Bei P₁ handelt es sich um Zellen, die unmittelbar nach Isolation und Leukozytendepletion untersucht wurden. P₂-EPDC wurden nach Expansion in Zellkultur bei der 1. Passagierung gewonnen. Die weiteren Messungen erfolgten mit Kulturen, die nach der 1. Passagierung für weitere 7 d, 14 d oder 21 d kultiviert wurden. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von *Troponin T* und *Gata4*. Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3.

Hier kann man entnehmen, dass *Troponin T* und *Gata-4* im weiteren Kulturverlauf im Wesentlichen unverändert in den EPDC detektierbar blieben, sodass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Expressionshöhen bestanden. Zusammenfassend fanden sich sowohl unmittelbar nach der Isolation als auch in kultivierten EPDC eine Expression der kardialen Marker *Troponin T*, *Gata4*; in P₁ wurde auch *MHC* exprimiert. Die Expressionslevel von *Troponin T* und *MHC* sind erwartungsgemäß deutlich niedriger als in den Herzmuskelzellen. Die Expression von *Gata4* hingegen war in EPDC vergleichbar ausgeprägt wie in den Kardiomyozyten.

4.5 Transdifferenzierungspotenzial von EPDC

4.5.1 Einfluss von 5-Azacytidin auf die kardiomyogene Differenzierung von EPDC

In diesen Versuchen wurde überprüft, ob 5-Azacytidin [64, 77, 78, 104-106, 128, 213-216] eine kardiomyogene Differenzierung der EPDC induzieren oder verstärken kann. Um gleichzeitig zu untersuchen, ob der hohe Serumgehalt des üblichen Kulturmediums die Transdifferenzierung der Zellen verhindert oder begünstigt, wurden drei Gruppen mit 5 %, 10 % und 30 % Serum im Medium getestet. Die Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch auf Veränderungen untersucht. Drei Wochen nach der Induktion wurde eine Expressionsanalyse kardialer Marker mittels qPCR durchgeführt.

Lichtmikroskopisch zeigte sich, dass die Gruppe mit 5 % FCS im Kulturmedium zu keinem Zeitpunkt konfluent wuchs. Es befanden sich deutlich mehr abgestorbene Zellen flottierend im Serumüberstand. Sonst fanden sich keine relevanten morphologischen Unterschiede zwischen den Gruppen oder im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Abbildung 4.11 zeigt die Expression von kardialen Proteinen und Transkriptionsfaktoren in den drei Gruppen mit unterschiedlichem Serumgehalt. Die Transkriptmengen wurde mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode zu der Expression in den unbehandelten Kontrollen in Beziehung gesetzt.

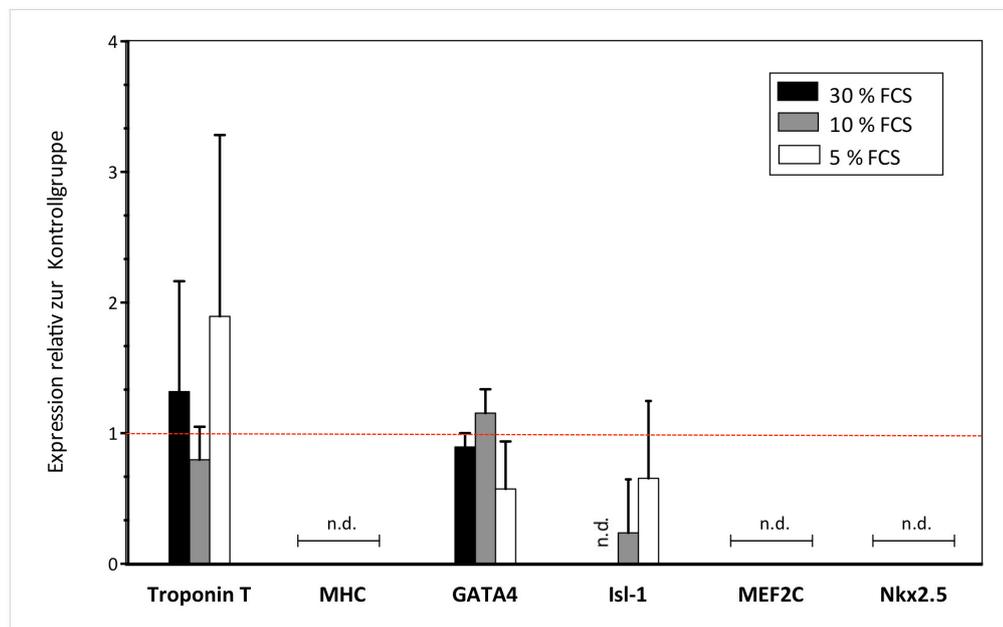


Abbildung 4.11: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen nach Inkubation mit 5-Azacytidin. Zellen der Passage 2 wurden für 24 h mit 10 $\mu\text{mol/l}$ 5-Azacytidin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 21 d in Medien mit unterschiedlichem Serumanteil kultiviert. Die Analyse auf mRNA-Ebene erfolgte mit qPCR. Die Ergebnisse wurden mit der Kontrollgruppe mithilfe der Livak-Methode verglichen. Die Expression in der Kontrollgruppe entspricht daher dem Wert 1 (rote Linie). Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$.

Wie schon bei den Expressionsanalysen der unbehandelten Zellen P_1 und P_2 , waren *Troponin* und *Gata4* in allen Proben nachweisbar. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der Azacytidin-behandelten und der Kontrollgruppe. In Bezug auf die Serumkonzentration

on zeigten sich ebenso keine relevanten Unterschiede, auch nicht in den unbehandelten Kontrollgruppen. Die Expression der Transkriptionsfaktoren *NKX2.5* und *MEF2C* und des kardialen Proteins *MHC* lag unterhalb der Detektionsgrenze. Nur in vereinzelt Proben fand sich *Isl-1*. Insgesamt zeigte sich also keine relevante Änderung der Expression der kardialen Marker in den EPDC durch 5-Azacytidin. Die Expressionslevel von *Troponin T* und *Gata4* blieben trotz Proliferation der Zellen über 4 Wochen konstant.

4.5.2 Einfluss von Aktivin A, BMP4, FGF-2 sowie eines Wnt-Aktivators und -Inhibitors auf die kardiomyogene Differenzierung von EPDC

Neben 5-Azacytidin wurden die EPDC mit weiteren bioaktiven Molekülen inkubiert, um eine Differenzierung in Richtung von Herzmuskelzellen zu erzielen. Von den eingesetzten Substanzen war bereits bekannt, dass sie bei anderen Stammzellgruppen das Potential besitzen, die Ausprägung eines myokardialen Phänotyps zu fördern [79, 80, 82, 107, 203-209]. Zum Teil spielen sie außerdem eine Rolle in der kardialen Organogenese. Aktivin A, BMP4, FGF-2, der Inhibitor des Wnt-Signalweges IWP-2 und der Wnt-Aktivator CHIR99021 wurden einzeln und in Kombination auf einen Effekt auf die kardiomyogene Differenzierung der EPDC getestet. Durch Inkubation mit den Einzelsubstanzen für eine Woche sollten sich bereits Tendenzen für die kardioinduktive Wirkung einer Substanz auf die EPDC zeigen. Die qPCR-Auswertung erfolgte sieben Tage nach Ende der Stimulation. In diesem Protokoll wurde, da es sich um ein Vorexperiment zum Screening der Substanzen handelte, ausschließlich bei einem Serumgehalt von 5 % getestet.

Erneut konnten *Troponin-T*, *Gata-4* in allen Proben und in geringen Mengen *Isl-1* in einem Teil der Proben detektiert werden. Es bestand jedoch keine signifikante Erhöhung der kardialen Marker im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 4.12). Ein mikroskopischer Unterschied bezüglich der Morphologie im Vergleich zu den Kontrollpopulationen war ebenso nicht zu beobachten.

Nach der Einzelapplikation erfolgte die Testung einer gestaffelten Inkubation der bioaktiven Moleküle. Es wurden zwei verschiedene Protokolle getestet. In Gruppe A wurden alle vier Substanzen (Aktivin A, BMP4, FGF-2, IWP-2) gleichzeitig für sieben Tage auf die Zellen aufgebracht. In Gruppe B fand eine Voraktivierung mit Aktivin A über 48 h statt; BMP4, FGF-2 sowie IWP-2 wurden anschließend für 96 h appliziert. Der Wnt-Aktivator CHIR99021 wurde aufgrund der antagonistischen Wirkung zu IWP-2 nicht gleichzeitig eingesetzt.

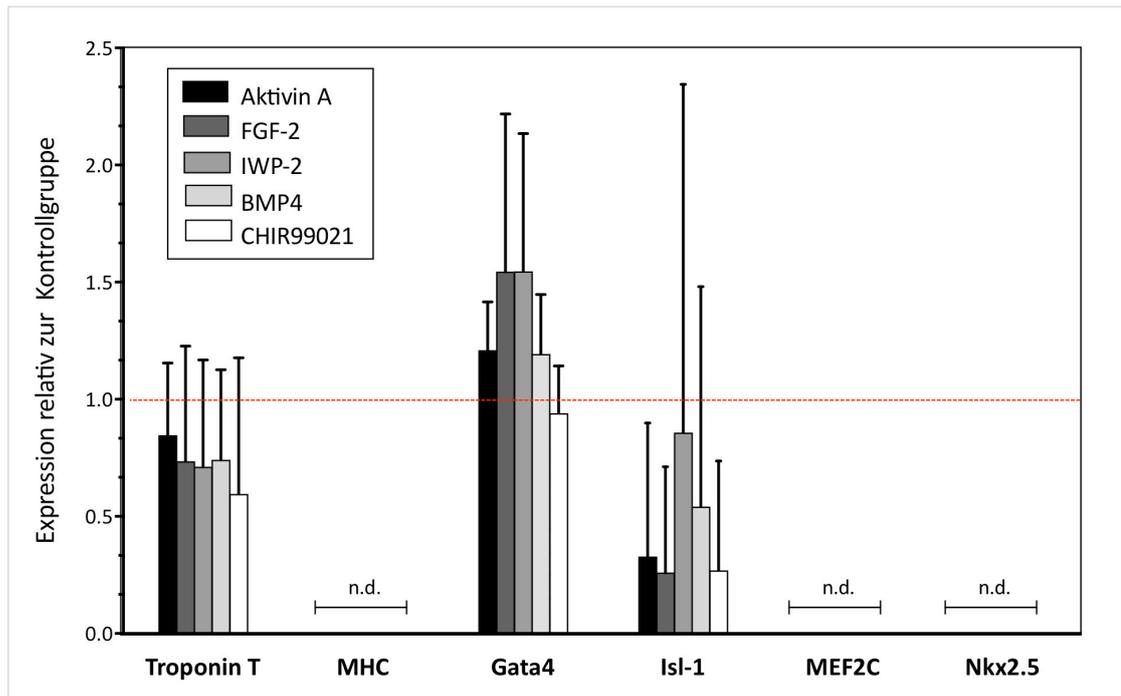


Abbildung 4.12: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen nach Stimulation mit verschiedenen bioaktiven Substanzen. Die Wirkstoffe wurden einzeln mit P_2 -EPDC für 7 d bei 5 % FCS inkubiert. Die Analyse auf mRNA-Ebene erfolgte mit qPCR. Die Ergebnisse wurden mit der Kontrollgruppe mithilfe der Livak-Methode verglichen. Die Expression in der Kontrollgruppe entspricht daher dem Wert 1 (rote Linie). Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$.

Es wird angenommen, dass in der späteren kardialen Entwicklung eine Wnt-Inhibierung eher eine kardiale Differenzierung fördert, während es in der frühen Organogenese umgekehrt ist [217, 218]. Da es sich bei den EPDC um adulte Zellen handelt, bestand die Vermutung, dass sie in Ihrer Beeinflussbarkeit eher einem späteren Entwicklungsstadium ähneln würden, sodass auf einen analogen Ansatz mit dem Wnt-Aktivator verzichtet wurde. Um den Einfluss des Serumgehalts zu kontrollieren, wurden, wie bei den Stimulationsexperimenten mit 5-Azacytidin, drei Untergruppen mit 5 %, 10 % und den üblichen 30 % FCS im Medium gebildet. Morphologisch ergab sich bei der täglichen mikroskopischen Inspektion kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen. In der qPCR exprimierten EPDC erneut *Troponin T* und *Gata4* in allen Gruppen sowie geringe Mengen *Isl-1* in einzelnen Proben. *MEF2C*, *NKX2.5* und *MHC* wurden in keiner Probe detektiert. Abbildung 4.13 zeigt die Expressionslevel in Relation zu ihrer unbehandelten Kontrolle ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ –Methode).

Durch die eingesetzten bioaktiven Moleküle wurde unter den gegenwärtigen Versuchsbedingungen keine signifikante Steigerung der Expression kardialer Marker in den EPDC beobachtet. Auch unter Variation des Serumgehalts und der gestaffelten Applikation in Gruppe B wurden keine signifikanten Unterschiede in den sechs Untergruppen gefunden. Die unbehandelten Kontrollgruppen zeigten bei unterschiedlichem FCS-Gehalt des Kulturmediums ein Expressionsni-

veau von *Troponin T* und *Gata4*, das keinen relevanten Unterschied zum Expressionslevel der frisch isolierten P₁-oder der über kurze Zeit kultivierten P₂-EPDC zeigte.

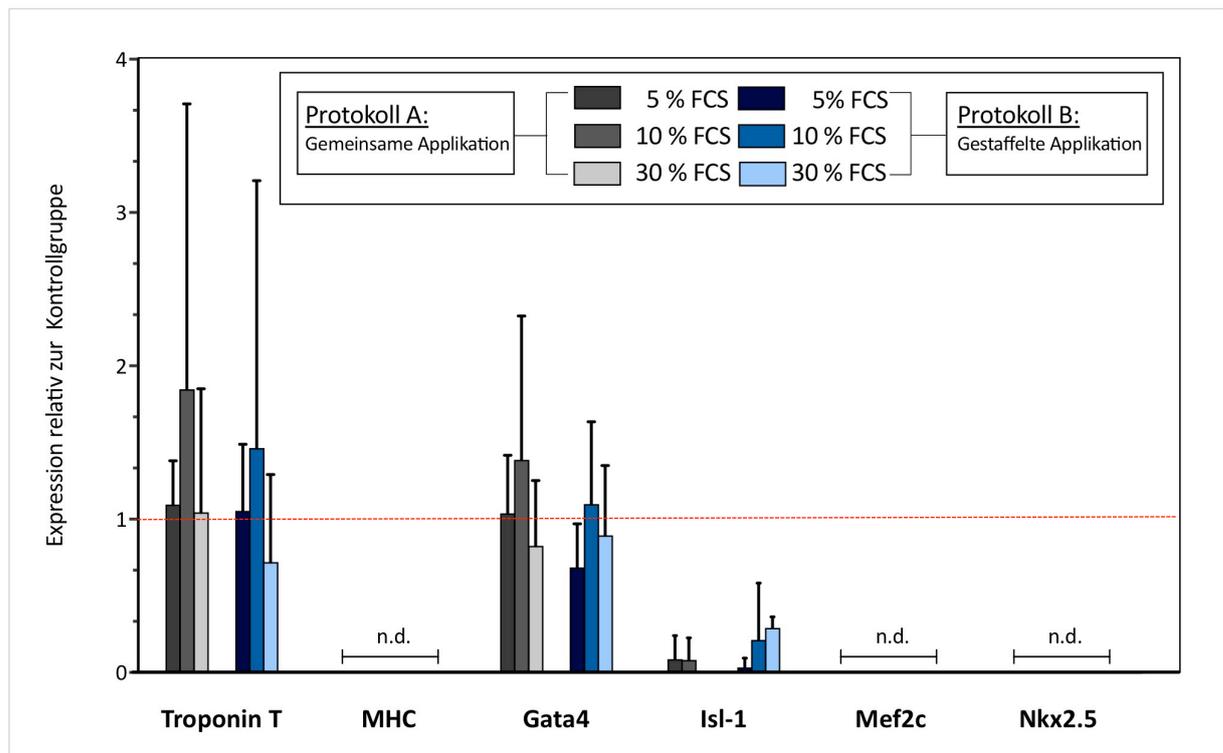


Abbildung 4.13: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Rattenherzen nach Stimulation mit bioaktiven Substanzen bei gleichzeitiger oder serieller Applikation. EPDC der Passage 1 oder 2 wurden mit mehreren Substanzen gleichzeitig (Protokoll A) oder seriell (Protokoll B) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichem Serumanteil kultiviert. Die Analyse auf mRNA-Ebene erfolgte mit qPCR 14 d nach Ende der Applikation der Transdifferenzierungsmedien. Die Ergebnisse wurden mit der Kontrollgruppe mithilfe der Livak-Methode verglichen. Die Expression in der Kontrollgruppe entspricht daher dem Wert 1 (rote Linie). Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n=3$.

5 Diskussion

5.1 Wachstumsverhalten und Kulturmorphologie

5.1.1 EPDC zeigen typische Wachstumsmuster und ähneln morphologisch mesenchymalen Stammzellen sowie kardialen Vorläuferzellen

Epikardiale Zellen und ihre Abkömmlinge sind erst seit kurzer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Dabei besteht zwischen den verschiedenen Arbeitsgruppen noch keine Einigkeit über die ideale Isolations- oder Kulturmethode. Die Zellen werden inkonsistent vor oder nach Infarkt gewonnen, von der Oberfläche des Herzens herunter geschabt [170], wandern selbstständig aus einem Gewebestück aus [59, 194] oder werden nach Gesamtverdau des Herzens nach genetischer Markierung vorzugsweise mithilfe von *WT-1* selektioniert [181]. Folglich kann man annehmen, dass die Zellpopulationen, die von den verschiedenen Forschungsgruppen gewonnen werden, sich dementsprechend voneinander unterscheiden und eine direkte Vergleichbarkeit nicht unbedingt gegeben ist. In Anlehnung an die Methode von Zhou et al. [219] wurden die EPDC für die vorliegende Arbeit durch eine vergleichsweise schonende Methode gewonnen, bei der lediglich ein oberflächlicher Verdau der nach Infarkt verdickten Epikardschicht erfolgte. Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten, dass ein Großteil dieser Zellen *Wt-1*-positiv waren und es sich somit tatsächlich um EPDC handelte (siehe Abbildung 1.4 sowie [193]). Während aller Experimente wurden die Zellen täglich via Lichtmikroskop untersucht, um so die morphologischen Eigenschaften der Zellen zu studieren und sie mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen vergleichen zu können. Dabei ergaben sich, trotz der neuen Isolationsmethode, grundsätzlich keine größeren Abweichungen von den Beschreibungen in der Literatur [59, 169, 170, 181, 187, 194, 220]. Einige Phänomene, die während der Kulturzeit beobachtet werden konnten, wurden jedoch bislang nur in Zusammenhang mit anderen Zellpopulationen aus der Gruppe der CPC beschrieben [85, 126] und geben Hinweise auf mögliche Überschneidungen der EPDC mit diesen Gruppen. Im Hinblick auf die einzelne Zelle fanden sich lichtmikroskopisch drei verschiedene Typen. Die großen polygonalen Zellen mit stumpfwinkligen Ausläufern imponierten mit einem deutlich sichtbaren Zytoskelett. Sie zeigten im Verlauf eine Zunahme der Zellgröße bei abnehmender Ausprägung der Zellfortsätze und kamen in den späten Passagen gehäuft vor, so dass es sich möglicherweise um eine seneszente Form von EPDC handelt. Dafür spricht auch, dass sie die vorherrschende Zellpopulation waren, wenn man den Serumanteil des Mediums stark reduzierte sowie in den späteren Passagen (>P₁₅). Eine ähnliche Morphologie findet sich ebenfalls bei anderen mesenchymalen Zelltypen mit zunehmendem Kulturalter [114, 221].

Einige Arbeitsgruppen haben berichtet, dass ihre EPDC-Kultur zunächst ein uniformes „pflastersteinartiges“ (engl. *cobble-stone*), also eher epitheliales Wachstumsmuster zeigte und dann spontan in die mesenchymale, fibroblastenähnliche Wachstumsform überging [170]. Dieses Verhalten wurde mit einem spontanen Durchlaufen des EMT-Prozesses und damit der Umwandlung der zunächst ruhenden mesothelialen Zellen in aktivierte EPDC in Kultur erklärt [59]. Die Beobachtung zeigte sich nicht nur in Kultur adulter Zellen, sondern auch bei Untersuchungen an proepikardialen Explantaten, welche nach chemischer Induktion der EMT von einem epithelialen zum fibroblastenähnlichen Wachstumsmuster wechselten [187]. Schon bei *ex vivo* Kulturen von menschlichen embryonalen Epikard 6-8 Wochen p.c. finden sich ebenfalls diese beiden vorherrschenden Wachstumsmuster [220] (pflastersteinartige und spindelförmige, mesenchymale Morphologie). Dass die hier untersuchten Isolate dieses pflastersteinartige Wachstum nur an vereinzelten Stellen zeigten, könnte damit zusammenhängen, dass sie sich nach Infarzierung bereits in einem aktivierten Zustand befanden und auch die epithelial-mesenchymale Transformation zum großen Teil bereits *in vivo* durchlaufen hatten [181]. Die vereinzelten pflastersteinartigen Zellen, die in den Kulturen der vorliegenden Arbeit auftraten, könnten zum anderen daher rühren, dass bei der verwendeten Isolationsmethode naturgemäß nicht nur die aktivierten EPDC des subepikardialen Raumes, sondern auch die mesothelialen Zellen von der Oberfläche abverdaut wurden. Diese zeigen *in vivo* ebenfalls ein epitheliales Wachstumsmuster [134]. Außerdem kann auch eine Durchmischung mit endothelialen Zellen aus den angeschnittenen Gefäßen, die ebenfalls ein epitheliales Wachstumsmuster zeigen, nicht sicher ausgeschlossen werden. Die pflastersteinartigen Zellen wuchsen nicht mehrschichtig und waren von geringer Anzahl, sodass ihre Rolle bei den nachfolgend beschriebenen Beobachtungen in den mehrschichtigen Zonen der Kultur eher als gering einzuschätzen ist.

Die andere häufig beschriebene Wachstumsform der EPDC, die spindelförmigen, mesenchymalen, fibroblastenähnlichen Zellen, waren in den Isolaten der vorliegenden Arbeit die vorherrschende Population. Diese Beobachtung deckt sich mit der von anderen Arbeitsgruppen und bestätigt, dass EPDC in Kultur eine überwiegend mesenchymale Morphologie zeigen [59, 169, 181, 194]. Obwohl das Aussehen der einzelnen Zellen zwar dem von Fibroblastenkulturen entspricht [221], waren die epikardialen Zellen weniger gleichförmig. Insgesamt ähnelt diese Wachstumsform der EPDC auch anderen mesenchymalen multipotenten Stammzellgruppen. So präsentieren sich z.B. die MSC des Knochenmarkes sehr ähnlich [108, 222, 223]: Spindelförmige MSC, die zuerst von Friedenstein et al. beschrieben wurden, adhärieren an Zellkulturplatten, sehen wie Fibroblasten aus und wachsen in Kolonien [102]. Diese Eigenschaften treffen auf EPDC auch zu. Es ist bekannt, dass MSC mit dieser Morphologie ein breites Differenzierungspotential besitzen [64, 103-107]. *Adipose-derived stem cells* aus dem Fettgewebe haben ebenfalls ein ähnliches Wachstumsmuster und ein vielversprechendes Differenzierungspotential [114].

Geht man also davon aus, dass der Stammzellstatus, in dem eine Differenzierung in andere Gewebe möglich ist, häufig mit einer spindelförmigen, mesenchymalen Morphologie einhergeht, wie es z.B. Goumans et al. postulierten [216], könnte bei den EPDC möglicherweise auch die spindelförmige Population das größte Potential für eine kardiomyogene Differenzierung haben. Die Morphologie der mesenchymalen Knochenmarkszellen wird außerdem von einigen Autoren in zwei Gruppen eingeteilt. Mets und Verdonk sprachen hier von Typ I Zellen, welche der oben beschriebenen spindelförmigen Population ähnelten, während Typ II Zellen groß und flach sind und intrazytoplasmatische Fibrillen zeigen [224]. Der Beschreibung nach findet sich hier eine weitere morphologische Parallele der EPDC zu MSC, da es auch unter ihnen eine große, polygonale Wachstumsform gibt (s.o.).

Obwohl eine völlige Heterogenisierung des Wachstumsmusters bei den EPDC nicht vorkam, nahmen die spindelförmigen Zellen unter den EPDC in den ersten Zellpassagen deutlich zu, so dass vermutet werden kann, dass sie möglicherweise die höchste Proliferationskapazität besitzen. Eine ähnliche Homogenisierung und ein Proliferationsvorteil der fibroblastenähnlichen Zellen war auch bei anderen mesenchymalen Stammzellen, z.B. den ADSC zu beobachten [114]. Unter den MSC ist die spindelförmige Zelle ebenfalls die mit dem höchsten Proliferationspotential [224]. In späteren Passagen nahm die Anzahl der spindelförmigen EPDC ab, während die großen, polygonalen Zellen zunahm, ähnlich dem Dominanzmuster der Typ I und II Zellen der MSC [224].

Neben den Beobachtungen der Morphologie der einzelnen Zelle zeigten sich im Wachstumsmuster von EPDC-Zellkolonien ebenso Parallelen zu anderen Stammzellgruppen:

Bei vollständiger Konfluenz bildeten sich sphärische Zellansammlungen mit radialen Zellausläufern (Abbildung 4.2). Diese kugelförmige Wachstumsform ähnelt den *cardiospheres*, einer Untergruppe der CPC mit kardiogenem Differenzierungspotential [85]. Diese wurden von Messina et al. als c-kit-positive Zellen beschrieben, die sich, im Gegensatz zu den EPDC, zunächst als kleine runde, nicht adhärente Zellen präsentieren. C-kit⁺-Zellen von Beltrami et al. zeigen ebenfalls ein sphärisches Wachstum [85, 126]. Es gibt noch weitere Zellen, die spontan Sphären bilden z.B. neurale Stammzellen [225] und fetale Hühner-Kardiomyozyten [226]. Dieses Wachstumsmuster tritt also auffallend oft in Verbindung mit stammzellähnlichen oder sogar kardiomyogenen Differenzierungsmöglichkeiten von Zellen auf, sodass diese Sphären bei den EPDC möglicherweise auch auf eine geeignete Subpopulation unter den epikardialen Zellen hinweisen könnten. Dies ist auch deshalb interessant, weil auch das Epikard c-kit-positive Zellen enthält. Diese reagierten nach einem Infarkt mit Expression myokardialer Marker und vaskulären Phänotypen *in vivo* [186], sodass die hier beobachteten kugelförmigen Kolonien insbesondere auf die Ex-

pression dieses Proteins und weitere Parallelen zu c-kit⁺-Zellen in Hinsicht auf ein mögliches kardiomyogenes Differenzierungspotential untersucht werden sollten.

Eine andere vielversprechende Beobachtung war es, dass sich bei konfluentem Wachstum schlanke, länglichere Zellen ausbildeten, sofern keine Passagierung durchgeführt wurde, wie z.B. im Rahmen der Bestimmung der Wachstumskurve oder nach Inkubation in Transdifferenzierungsmedien. Diese Zellen ähnelten zumindest morphologisch den kardiomyozytenähnlichen Zellen, die bei Experimenten mit anderen Stammzellpopulationen beobachtet wurden (engl. *myotubules*) [104, 214]. Dass eine spontane Kontraktion niemals beobachtet wurde, ist nicht zwingend ein enttäuschendes Ergebnis. Denn von manchen Autoren wird vermutet, dass transdifferenzierte, kardiomyozytenähnliche Zellen, die in Kultur keine spontanen Kontraktionen zeigen, eher reiferen Herzmuskelzellen ähneln, da nur kardiomyozytenähnliche Zellen mit embryonalem oder fetalem Phänotyp in Kultur kontrahieren [94].

Zusammenfassend zeigen die epikardialen Zellen also eine ähnliche Morphologie wie EPDC, die mithilfe anderer Methoden isoliert wurden (überwiegend pflastersteinartig und mesenchymal-spindelförmig). Sie glichen dabei außerdem fetalen EPDC und EPDC aus nichtinfarzierten Herzen. Außerdem gibt es bezüglich des Wachstumsmusters Parallelen zu anderen multipotenten mesenchymalen Populationen, was ein Hinweis auf Untergruppen der EPDC mit möglichem kardiomyogenem Differenzierungspotential sein kann.

5.1.2 EPDC zeigen nach Myokardinfarkt eine gesteigerte Proliferationskapazität

Kenntnisse über das Wachstumsverhalten einer Zellkultur sind grundlegend für zahlreiche weiterführende Experimente. So kann beispielsweise die Zeit bis zum Erreichen einer gewünschten Populationsgröße, der Einfluss von chemischen Substanzen oder Co-Kultur auf die Proliferation abgeschätzt werden. Außerdem ist eine gute Proliferationskapazität Grundvoraussetzung, um aus Biopsiematerial oder durch *in vivo* Stimulationen eine wirksame Populationsgröße für Zelltherapien zu erhalten; sprich ihre therapeutische Anwendbarkeit ist u.a. abhängig von ihrer Expandierbarkeit *in vitro* oder *in vivo* [22]. Die Beschreibung des Wachstumsverhaltens der nach einer neuen Methode isolierten EPDC und der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist folglich eine wichtige Basis für weitere Experimente.

Wessels et al. hatten bereits eine hohe proliferative Aktivität des epikardialen Epithels und der EPDC beobachtet [142]. Dies konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ebenfalls bei den infarzierten Ratten-EPDC bestätigt werden. Das Wachstumsverhalten der meisten Zelltypen folgt einem typischen Verlauf, der sich in vier Phasen einteilen lässt [227]. Nach Beimpfen des Zellkulturgeschirrs erfolgte zunächst eine Anpassung des Zellstoffwechsels an die Umgebungsbedingungen. Eine Zellteilung findet in dieser Phase allenfalls auf niedrigem Niveau statt

(lag-Phase). Diese Phase war bei den epikardialen Zellen ungewöhnlich kurz und konnte nicht direkt beobachtet werden, da sie zum Zeitpunkt der ersten Zellzählung nach 24 h bereits die nächste Phase mit exponentiellem Wachstum (log-Phase) erreicht hatten. Diese Beobachtung deckt sich mit den Wachstumskurven von embryonalen Mausepikard-Zellen, die eine lag-Phase von 20 h hatten [189] und spricht für eine gute und rasche Anpassungsfähigkeit der Zellen an die Zellkulturbedingungen. Winter et al. haben EPDC von humanen, nicht infarzierten Herzen ebenfalls auf ihre Wachstumsdynamik untersucht und beschrieben dort eine wesentlich längere Anpassungsphase, da sich die Zellen erst ab dem 10. Tag konstant vermehrten. Möglicherweise spielt auch der Speziesunterschied und die unterschiedliche Zusammensetzung des Kulturmediums eine Rolle bei diesem erheblichen Unterschied zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die verbesserte Proliferationskapazität der EPDC auf ihren aktivierten Status nach Herzinfarkt zurückzuführen ist, wofür bereits Beobachtungen *in vivo* wie eine verdickte Epikardschicht und Marker einer erhöhten Teilungsaktivität sprechen [176, 180-182, 193].

Nach ausreichender Adaptation wird nach der lag-Periode eine Phase der maximalen Teilungsrate erreicht. In dieser sogenannten log-Phase findet ein exponentielles Wachstum statt. Bei halblogarithmischer Auftragung der Zellzahl kann in dieser Phase die Populationsverdopplungszeit berechnet werden. Für die Kultur von Ratten-EPDC ergab sich unter den üblichen Kulturbedingungen mit Zusatz von 30 % FCS eine Generationszeit von $50,87 \pm 10,13$ h ohne Kulturteilung und $37,80 \pm 13,50$ h in der Kultur mit regelmäßigen Passagen. Der Unterschied lässt sich möglicherweise damit erklären, dass durch die Passagierung Zellen mit höherer Proliferationskapazität selektioniert wurden. Eine gewisse Kontakthemmung bei vollständiger Konfluenz oder die anfängliche Zelldichte in Kultur könnten ebenfalls Ursachen für die raschere Zellteilung der EPDC in der dynamischen Kultur sein, sofern sie auch in ihrem Proliferationsverhalten MSCs ähneln. So haben Colter et al. in Experimenten mit humanen MSC herausgefunden, dass eine extrem niedrige Aussaatdichte die Populationsverdopplungszeit auf 12 h verkürzen konnte [228]. Eine Variation der Anfangszahl der EPDC sollte zukünftig auf ähnliche Effekte untersucht werden, da sich ein ebensolcher Effekt hier in der dynamischen Kultur mit verkürzter Verdopplungszeit bereits angedeutet hat. Ein weiterer Grund für die längere Populationsverdopplungszeit in der nicht passagierten Kultur ist das verlangsamte Wachstum der EPDC-Kultur aus einem der Herzen (siehe Abbildung 4.5, Herz 3). In der dynamischen Kultur gab es ebenfalls Wells, in denen EPDC deutlich verlängerte Verdopplungszeiten hatten (siehe Abbildung 4.4., blauer Pfeil). Dass das Epikard eine heterogene Zellpopulation darstellt, die möglicherweise nicht in jeder Isolationsgruppe die gleichen Eigenschaften besitzt, ist hier eine mögliche Erklärung. Zu dem gleichen Schluss kamen auch Bollini et al., allerdings im Rahmen von Expressionsanalysen. Sie hatten bereits vermutet, dass es unter den EPDC einen Phänotyp gibt, der den aktivierten

mesenchymalen Typ repräsentiert und einen, der potentiell eher auf Proliferations- und Migrationsreize reagieren könnte [188]. Mit Hinblick auf die mikroskopischen Beobachtungen sind mutmaßlich die fibroblastenartigen, mesenchymalen Zellen diejenigen, die unter den EPDC nach Myokardinfarkt die größte Proliferationskapazität besitzen. Diese Vermutung muss durch weitere Untersuchungen noch bestätigt werden.

Im Vergleich teilen sich EPDC trotz ihrer leichten und raschen Expandierbarkeit langsamer als andere mesenchymale Zellpopulationen. So haben z.B. Bronchialfibroblasten von Pferden bei einem 10 % FCS-Anteil im Medium eine Populationsverdopplungszeit von 15-20 h [221] und die von MSC aus dem Knochenmark von Menschen lag je nach Kulturbedingungen zwischen 12 h [228] und 33 h [229]. Embryonales Mausepikard benötigte im Vergleich zu den adulten Ratten-EPDC eine geringfügig kürzere Populationseverdopplungszeit (35,76 h, [189]). Interessanterweise hatten die EPDC eine annähernd ähnliche Verdopplungszeit wie andere residente CPC von adulten Ratten [126], was ein weiteres Indiz für mögliche Überschneidungen der Populationen sein kann.

Die Größe der Population nahm auch bei 100 % Konfluenz weiter zu, wenn auch nicht exponentiell (ab dem 8.-10. Tag, stationäre Phase/Plateauphase). Dies deckt sich mit den mikroskopischen Beobachtungen, die ein mehrschichtiges Zellwachstum zeigen, sodass vermutet werden kann, dass unter EPDC eine partielle, jedoch keine vollständige Kontaktinhibition stattfindet, wie es häufig in anderen Zellkulturen gesehen wird [114, 230, 231]. Unterstützt wird diese These zudem von der Wachstumskurve embryonaler Maus-Epikard-Zellen, die sich nach Erreichen der Plateauphase ebenfalls weiter teilten [189].

Abweichend von den Ergebnissen dieser Arbeit, berichteten Winter et al. von konstanten Verdopplungsraten (log-Phase) der menschlichen EPDC aus nichtinfarzierten Herzen zwischen dem 10.-50. Tag [59]. Möglicherweise liegt die Diskrepanz bis zum Beginn der log-Phase und die lange konstante Verdopplungsrate zum einen an der Größe des Kulturgefäßes, sodass eine partielle Kontaktinhibition bei Winter et al. erst viel später erfolgen konnte. Dafür spricht zumindest die ungewöhnlich lange Beobachtungszeit bei Winter et al. [59]. Eine weitere Erklärung könnte der Speziesunterschied mit einer deutlich langsameren Teilungsrate bei den menschlichen EPDC sein. Möglicherweise ist der erhebliche Unterschied jedoch auch dadurch verursacht, dass den EPDC von Winter et al. eine entsprechende Aktivierung durch myokardiale Infarzierung fehlte. Das sich die infarzierten Ratten-EPDC rascher teilen, stützt erneut die These, dass in epikardialen Zellen nach Infarzierung tatsächlich ein fetales Programm inklusive erhöhter Proliferation gestartet wird [181].

Die rasche und zuverlässige Expansion von Zellen ist Grundvoraussetzung für zellbasierte Therapieansätze nach Herzinfarkt. Da kardiale und Skelettmuskelbiopsien keine entsprechenden Zellzahlen ermöglichen [232, 233], sind sie für diesen Einsatz ungeeignet. Im Gegensatz dazu zeigen EPDC eine relativ kurze Verdopplungszeit *in vitro* und möglicherweise auch eine ausreichende *in vivo* Proliferation, sodass sie die bei einem Herzinfarkt abgestorbenen Kardiomyozyten (bis zu einer Milliarde [5, 7]) zahlenmäßig ersetzen könnten. Zudem könnte die Wachstumsgeschwindigkeit durch mitogene Wirkstoffe weiter erhöht werden.

5.2 Migratorisches Potenzial kultivierter EPDC

5.2.1 Optimierung der Boyden-Kammer-Methode für EPDC

Für die Anwendbarkeit eines Boyden-Kammer-Assays zur Untersuchung von chemotaktischen Eigenschaften ist es notwendig, die Zellzahl, Inkubationszeit und Membranporengröße für die jeweilige zu untersuchende Zellpopulation zu optimieren. Marshall et al. geben an, dass die Zellanzahl für Boyden-Kammer-Experimente empirisch bestimmt werden muss und gewöhnlich zwischen 10.000-100.000 Zellen liegt [234]. Eine Anzahl von um die 100 Zellen nach der Migration sei realistisch, dafür mussten z.B. 15-20.000 HUVEC Zellen oder 30.000 Hela-Zellen eingesetzt werden [198]. Das hier verwendete Assay von Merck Milipore empfahl hingegen, zwischen 500.000-1.000.000 Zellen einzusetzen. Die Differenz hängt mutmaßlich mit der Größe der Assays und der eingesetzten Detektionsmethoden (manuelles Zählen vs. Fluoreszenzdetektion) zusammen. Da der Migrationsassay mit EPDC der 2.-4. Passage durchgeführt wurde und daher die Zellzahl limitiert war, erfolgte der Einsatz von 100.000 Zellen. Im Hinblick auf die Experimente von Winter et al., die bereits Boyden-Kammer-Experimente mit EPDC menschlicher nicht-infarzierter Herzen durchführten [59], scheint die gewählte Zellzahl ein guter Kompromiss zu sein. Winter et al. setzten 50.000 Zellen je Boyden-Kammer ein und gaben an, dass zwischen 50-250 Zellen migrierten, was den Empfehlungen von Mashall et al. entspricht.

Die Porengröße soll so gewählt werden, dass eine Balance zwischen gerichteter Translokation und Minimierung zufälliger Migration gewährleistet ist [198]. Die meisten Autoren empfehlen, für einige Tumor- und Immunzellen zwischen 3-5 μm zu wählen [234], während Fibroblasten und Epithelzellen eine Porengröße von 8 μm benötigen [199]. Die EPDC waren bei einer Membranporengröße von 3 μm nicht in der Lage, die Barriere zu überwinden, bei 8 μm hingegen konnte eine chemotaktische Migration beobachtet werden. Dieses Ergebnis ist hinsichtlich der Ähnlichkeit von EPDC mit anderen mesenchymalen Zellen wie SMC, Fibroblasten und Myofibroblasten erwartungsgemäß. Winter et al., die Experimente mit menschlichen EPDC aus nicht-infarzierten Herzen durchführten, verwendeten ebenfalls eine 8 μm -Membran [59].

Bezüglich des zeitlichen Aspektes der EPDC-Migrationsexperimente müssen zukünftig ggf. noch weitere Anpassungen erfolgen: Die Inkubationszeit wurde auf 16 h festgelegt, da das Protokoll des Herstellers einen Zeitraum von 4-24 h empfahl. In der Literatur waren bereits 4 h ausreichend für die Migration von Tumor- und Endothelzellen [198]. Bei adulten menschlichen EPDC ohne Herzinfarkt wurde eine verkürzte Migrationszeit von 6 h gewählt [59]. Je kürzer die Zeit, desto unwahrscheinlicher ist es, dass Proliferation die Zellzahlen in der Messung verfälscht [234]. Mit Hinblick auf die kurze lag-Phase der EPDC könnte eine kürzere Inkubationszeit vermutlich zuverlässigere Ergebnisse liefern, wenn genaue Zellzahlen und kein relativer Vergleich zwischen Gruppen zum Screening auf wirksame Stimulantien gewünscht sind. Dies ist insbesondere in Hinsicht auf den Einsatz von FCS oder anderen proliferationssteigernden Substanzen als Chemoattraktantien wichtig.

5.2.2 EPDC besitzen migratorische Fähigkeiten

Die Migration von Zellen, ihre Bewegung von einem Ort zum anderen, ist ein zentraler Bestandteil von Wundheilungsvorgängen. Das betrifft nicht nur die Einwanderung von Leukozyten zum Abbau des nekrotischen Gewebes. Erst die Migration von mesenchymalen Zellen z.B. von Fibroblasten, Muskelzellen und Myofibroblasten an den Ort der Schädigung kann durch Bildung von Ersatzgewebe und Produktion neuer extrazellulärer Matrix den Wundheilungsvorgang abschließen [55]. Bislang gab es widersprüchliche Aussagen zur Migrationsfähigkeit adulter EPDC. Einige Arbeitsgruppen postulierten, dass die Zellen die Fähigkeit zur Migration weitgehend verloren hätten [235] und nur nach Vorbehandlung des erwachsenen Tieres, beispielsweise mit Thymosin β 4 [236], eine Migration möglich sei. Epikardiale Zellen können während der Embryonalentwicklung migrieren, dann am Ort ihrer Bestimmung Zellen unterschiedlicher Gewebe bilden [141, 142, 154, 156, 157, 163-167] und parakrin auch ihre Umgebung beeinflussen [161, 170-172]. Folglich ist ein wichtiger Aspekt bei der Suche nach neuen Strategien um das Epikard in der regenerativen Zelltherapie einzusetzen, die embryonale Migrationsfähigkeit der EPDC zu reaktivieren oder die vorhandene Kapazität doch zumindest durch pharmakologische Beeinflussung erheblich zu steigern. So könnten entweder *in vivo* die Anzahl der epikardialen Zellen im Bereich des infarzierten Gewebes erhöht oder bei *in vitro Tissue engineering* z.B. Gerüste (engl. *Scaffolds*) mit transdifferenzierten Epikardzellen besiedelt werden. Die migratorischen Eigenschaften epikardialer Zellen sind bislang jedoch nur rudimentär untersucht.

Eine besondere Form der Migration ist die Chemotaxis. Der Begriff bezeichnet die gerichtete Wanderung von Zellen entlang eines Lockstoffgradienten, im Falle der Wundheilung zum Entzündungsort [55, 56]. Um zu untersuchen, ob epikardiale Zellen, die nach einer neuen Methode von infarzierten Rattenherzen isoliert wurden, chemotaktische Fähigkeiten besitzen, erfolgte die Inkubation der EPDC mit Chemoattraktantien in einem Boyden-Kammer-Assay. Ob adulte EPDC migratorische Fähigkeiten besitzen, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bislang wider-

sprüchlich bewertet. Einige Forscher beschrieben das Epikard in adulten Organismen als „schlafend“ [235] und postulierten, dass es unfähig sei, zu migrieren oder zu differenzieren [235]. Die EPDC blieben nach Infarkt im Epikard; hier konnte keine Migration ins Myokard beobachtet werden [181, 192]. Wird eine Isolationsmethode verwendet, bei der ein Auswandern der EPDC aus Explantaten erforderlich ist, migrieren adulte EPDC *in vitro* ohne zusätzliche Stimulation durch bioaktive Substanzen nur sehr langsam [68, 194] oder gar nicht [236]. Gittenberger-de Groot et al. und andere Arbeitsgruppen hingegen beobachteten, dass EPDC *in vivo* nach Infarkt in die Randzone des Infarktes [174] oder gar in die Infarktzone selbst einwanderten [59, 237]. Diese EPDC verblieben jedoch größtenteils im Bereich der Herzoberfläche und des subepikardialen Raumes [181].

Durch Experimente mit chemotaktischen Stimulantien im Boyden-Chamber-Assay konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EPDC aus infarzierten Rattenherzen sowohl ungerichtete migratorische als auch gerichtete chemotaktische Aktivitäten ausüben können: Ohne Stimulation im *Quenching Medium* wurde bereits eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals gemessen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass auch ohne Stimulus eine ungerichtete Migration durch die Membran stattfand. ATP konnte den Anteil der migrierten EPDC im Vergleich zum *Quenching Medium* nur geringfügig steigern. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass die ATP-Inkubation unter 1 % FCS-Zugabe im Medium erfolge. FCS besitzt Nukleotidase-Aktivität und kann einen signifikanten Abbau von ATP verursachen [238]. Dies könnte dazu geführt haben, dass das ATP während der Inkubation degradiert wurde und daher nicht mehr als chemotaktischer Stimulus wirken konnte. Auch eine Degradation des ATP durch die EPDC selbst ist möglich (siehe auch Abschnitt 5.3). Ein hoher FCS-Zusatz war hingegen ein starker Stimulus für eine chemotaktische Migration der EPDC, da sich die gemessene Fluoreszenzintensität verdreifachte.

Bezüglich der Korrelation der RFU mit absoluten Zellzahlen nach der EPDC-Migration gibt es noch Unsicherheiten. Die Kalibrationskurve wurde nur exemplarisch für $n=1$ getestet, da die absolute Zellzahl für ein Screening auf die Wirksamkeit der Substanzen und die Detektion einer migratorischen Aktivität nicht notwendig war; hier genügte auch der relative Vergleich. Die Umrechnung in absolute Zahlen mithilfe der Kalibrationskurve ergab sehr hohe Zahlen migrierter Zellen, die mit Hinblick auf die Erfahrungen mit anderen Zellpopulationen [198] und mit EPDC aus nichtinfarzierten menschlichen Herzen [59] unplausibel erscheinen. Eine völlig ungerichtete Migration z.B. durch zu große Poren in der Membran ist unwahrscheinlich, da EPDC relativ große Zellen sind und ein 8 μm -Assay bei Experimenten mit adulten EPDC aus nicht infarzierten Herzen ebenfalls passend war [59]. Der Anteil der migrierten Zellen im Ansatz ohne Stimulanz ist im Vergleich mit den durch FCS-stimulierten auch zu gering, als dass ein simples „Durchrutschen“ der Zellen durch die Membran anzunehmen wäre. Man kann vermuten, dass während

der langen Inkubationszeit eine Teilungsaktivität stattfindet und so die Zellzahlen generell zu hoch ausfallen. Doch selbst wenn die geschätzte absolute Zellzahl halbiert wird – eine großzügige Reduktion mit Hinblick auf die Populationsverdopplungszeit von > 24h – sind die Zellzahlen sehr viel höher als bei anderen Zellpopulationen in der Literatur [59, 198]. Es ist möglich, dass die Messungen mit n=1 aus der Kalibrationskurve nicht zuverlässig sind, dies sollte zunächst in wiederholten Messungen festgestellt werden. Mit Hinblick auf die relativen Verhältnisse könnten sich die hohen absoluten Zahlen bei Bestätigung durch die gesteigerte migratorische Kapazität von EPDC nach Myokardinfarkt und durch den starken Stimulus FCS auch als richtig erweisen.

Welche Faktoren im FCS die erhöhte Migration der EPDC induziert haben, gilt es in zukünftigen Experimenten zu klären. Einige Hinweise auf mögliche wichtige Stimulantien gibt es bereits in der Literatur. EPDC werden nach Infarkt zu großen Teilen phänotypisch zu Myofibroblasten- und Fibroblasten-ähnlichen Zellen [170, 180, 181, 187-189], sodass man vermuten kann, dass EPDC noch weitere Eigenschaften mit diesen Zellen teilen, möglicherweise auch im Hinblick auf ihre Migrationsmechanismen. Aufgrund dieser Ähnlichkeit liegt es nahe, in Zukunft an EPDC Substanzen zu testen, die in diesen verwandten mesenchymalen Zellgruppen Chemotaxis auslösen konnten [55]. Zu diesen Substanzen zählen u.a. PDGF, IGF, EGF und TGF- β [53, 55]. Es gibt auch bereits Erkenntnisse über spezifische Faktoren oder Konditionen, welche die Migration adulter EPDC *in vitro* und *in vivo* beeinflussen. Thymosin β 4 steigert *in vivo* die Abwanderung von EPDC ins infarzierte Myokard und ein durch sie selbst konditioniertes Medium konnte bei EPDC aus nicht infarziertem adulten humanen Material *in vitro* eine chemotaktische Reaktion provozieren [59]. Hypoxie hingegen verminderte die migratorische Kapazität adulter EPDC *in vitro* [59]. Folglich sollte ein Schwerpunkt auf einer Stimulation der Migration von post-Infarkt EPDC unter sauerstoffarmen Bedingungen gelegt werden, in Anlehnung an das Milieu im nekrotischen Myokard. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe weisen außerdem darauf hin, dass Komponenten der extrazellulären Matrix, die zum Teil durch EPDC selbst produziert werden können, *in vitro* ebenfalls die migratorischen Fähigkeiten von EPDC steigern [184]. Die weitere Identifizierung von chemoattraktiven Faktoren sowie die Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen tragen dazu bei Strategien zu entwickeln, die eine verbesserte Mobilisierung von EPDC in die Infarktregion ermöglichen werden.

5.3 EPDC als aktive Teilnehmer im purinergen Signalsystem nach Myokardinfarkt

Nach einem Myokardinfarkt werden purinerge Verbindungen aus absterbenden Zellen [9, 35, 239] oder aktiv z.B. von infiltrierenden Leukozyten freigesetzt, welche den Entzündungs- bzw. Wundheilungsprozess orchestrieren [240, 241]. Nukleotide und Nukleoside können selbst als

chemische Lockstoffe fungieren und lösen an Rezeptoren proinflammatorische, aber auch antiinflammatorische Signale aus [242]. ATP vermittelt über die P2X- und P2Y-Rezeptoren vorwiegend proinflammatorische Effekte [243]. Extrazelluläres ATP wird durch die Ektoenzyme CD39 und CD73 rasch zu Adenosin abgebaut, welches über G-Protein-gekoppelte Adenosinrezeptoren überwiegend antiinflammatorisch wirkt [34, 45]. Extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside spielen somit eine wichtige Rolle als Immunmodulatoren [244]. Die am Entzündungsprozess nach Myokardinfarkt beteiligten Signalwege sowie auch die partizipierenden Zellgruppen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie sind jedoch Bestandteil intensiver Forschung, da eine überschießende oder verlängerte Immunantwort nach Infarkt zu einer Einschränkung der Herzfunktion führt [31] und eine schnellere Auflösung der Entzündung ein Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellt.

Über die Rolle der epikardialen Zellen im Gefüge der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt ist bislang nur wenig bekannt. Ihnen wird aber am ehesten eine entzündungsmodulierende Funktion und parakrine Stimulation der anderen beteiligten Zellarten zugeschrieben [181]. Aufgrund der zentralen Bedeutung von Adenosin als überwiegend antiinflammatorischer Signalgeber wurde der Schwerpunkt in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung der Expression der Enzyme CD39 und CD73 sowie der vier G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren gelegt. Überraschenderweise exprimierten EPDC sowohl CD39 als auch CD73 und könnten somit aktive Teilnehmer am Nukleotidstoffwechsel durch Abbau von Nukleotiden zu Adenosin darstellen. Möglicherweise gibt es Subgruppen von EPDC, die jeweils nur eines oder beide Enzyme tragen. So könnte z.B. mit FACS-Analysen untersucht werden, ob es eine metabolische Kompartimentierung innerhalb der EPDC gibt, wie es etwa bei den Immunzellen der Fall ist [28]. Über die Expression von CD39 wird der ATP-Gehalt im Extrazellularraum niedrig gehalten. Dies ist insofern sinnvoll, da das ATP in höheren Konzentrationen den Zelltod einleitet [245, 246] und in erster Linie proinflammatorische ATP-Rezeptoren aktiviert [242]. Die Expressionsdaten zu CD39, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden, lassen vermuten, dass EPDC am Abbau des ATP beteiligt sind. Durch die Hydrolyse des Nukleotids könnte die proinflammatorische, ATP-vermittelte Immunreaktion u. a. auch durch EPDC lokal begrenzt antagonisiert werden [41]. Da EPDC auch CD73 exprimierten, ist es wahrscheinlich, dass sie *in vivo* zur verstärkten Bildung von Adenosin im Bereich der Entzündung beitragen. Aufgrund der Lokalisation der EPDC könnten diese mittels der Ektoenzyme außerdem dazu beitragen, den ATP-Gehalt im Transsudat des Herzbeutels niedrig zu halten und maßgeblich auch an der Adenosinbildung in diesem Kompartiment beteiligt sein. Im Perfusat der epikardialen Oberfläche bei Hunden fand man Adenosin, dessen Konzentration bei Asphyxie zunahm [247]. Ebenfalls stieg der Adenosinspiegel in der epikardialen interstitiellen Flüssigkeit an [248]. Das Adenosin in der perikardialen und interstitiellen Flüssigkeit kann durch den direkten Kontakt mit der Herzoberfläche und den Koronarge-

fäßen seine bekannten positiven Effekte vermitteln und so zu Vasodilatation verbliebener Kollateralen [247, 249], Senkung des myokardialen Sauerstoffverbrauches [250] und somit geringerer Absterberate von Kardiomyozyten beitragen. EPDC könnten somit als aktive Teilnehmer im purinergen Signalsystem maßgeblich sowohl in die Modulation inflammatorischer Prozesse als auch in die Kardioprotektion involviert sein.

Bislang wurde angenommen, dass nur kardiale Immunzellen und wenige kardiale Endothelzellen im Herzen CD73 exprimieren [28, 251]. Diese Beobachtungen können nun um EPDC erweitert werden. Der Nachweis der CD73 auf EPDC gelang unserer Arbeitsgruppe mittlerweile auch auf Proteinebene durch immunhistochemische Färbungen und in der Durchflusszytometrie [184]. Untersuchungen der Enzymaktivitäten von CD39 und CD73 *in vitro* und *in vivo* werden Aufschluss darüber geben, mit welchem Ausmaß diese beiden Ektoenzyme tatsächlich an der Metabolisierung von ATP zu Adenosin beteiligt sind. Erste Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass EPDC zumindest *in vitro* tatsächlich messbare Enzymaktivitäten aufweisen [184].

Im Vergleich zu frisch isolierten EPDC (P₁-Zellen) war bei Zellen der Passage 2 (P₂-Zellen), welche einige Tage in Zellkultur gehalten wurden, eine Abnahme der CD39-Expression zu beobachten. Dies kann zum einen den Zellkulturbedingungen geschuldet sein. Bei Immunzellen ändert sich beispielsweise die Expression der Ektoenzyme im inflammatorischen Milieu [28]. Nimmt man ähnliches auch für epikardiale Zellen an, so entsprechen P₁-Zellen EPDC aus einer inflammatorischen stimulierten Umgebung, wohingegen das Kulturmedium den P₂-Zellen keinen inflammatorischen Stimulus bietet. Zwar enthält das dem Medium zugesetzte FCS zahlreiche Hormone, Zytokine und andere bioaktive Moleküle, doch ist anzunehmen, dass der ATP-Gehalt aufgrund der ATPase-Aktivität des FCS gering ist [252]. Somit wurde die CD39-Expression auf den EPDC möglicherweise deshalb reduziert, weil wenig entsprechendes Substrat in der Umgebung vorhanden war. Zum anderen könnte eine Subgruppe der EPDC, die vergleichsweise mehr CD39 exprimiert, schlechter an das Zellkulturgeschirr adhärirt sein, sodass ihr Anteil in Kultur durch den Medienwechsel abnahm.

Neben ihrer aktiven Rolle im Nukleotidstoffwechsel könnten EPDC auch selbst Ziel der purinergen Signalgebung sein, da sie Adenosinrezeptoren exprimieren. In den frisch isolierten P₁-Zellen war der A_{2A}-Rezeptor am stärksten exprimiert. Seine Expression sank während der Kulturzeit jedoch beinahe bis unter die Nachweisgrenze. Möglicherweise nahm die Transkriptmenge des A_{2A}-Rezeptor aus den gleichen Gründen ab wie die der CD39. Die Zellen, die diesen Rezeptor stark exprimierten, adhärirten möglicherweise nicht oder der entsprechende Stimulus zur Expression fehlte im Kulturmedium. Der A_{2A}-Rezeptor, der nach der Isolation von den EPDC am stärksten exprimiert wird, löst überwiegend antiinflammatorische Vorgänge aus. Es wurde häufig postuliert, dass EPDC über parakrine Mechanismen auf ihre Umgebung einwirken [59, 170,

175, 177-179]. Welche Signalstoffe EPDC dabei freisetzen, ist jedoch kaum erforscht. Möglicherweise ist der A_{2A} -Rezeptor ein Ausgangspunkt, über den u. a. die Freisetzung von parakrinen Botenstoffen reguliert wird. Der Nachweis des Rezeptors ist auch insofern interessant, als dass er auf eine mögliche Interaktion mit Immunzellen z.B. nach Myokardinfarkt hinweist. So konnte zwar gezeigt werden, dass die CD73-exprimierenden Immunzellen – die T-Zellen - die wesentliche Zellfraktion sind, die Wundheilung nach Infarkt fördern [28]. Allerdings ist die Anzahl der T-Zellen so gering, dass vermutet wurde, dass dieser Effekt durch die Wirkung des von den T-Zellen gebildeten Adenosins auf andere Zellen vermittelt wird [28]. EPDC könnten in diesem Szenario eine dieser Zellgruppen darstellen.

Neben immunmodulatorischen Effekten vermittelt der A_{2A} -Rezeptor bei Fibroblasten in Entzündungsmodellen verschiedener anderer Organe profibrotische Effekte [253, 254]. Ob der A_{2A} -Rezeptor von EPDC auch eine maßgebliche Rolle beim Remodellingprozess spielt, gerade weil EPDC viele Eigenschaften mit Fibroblasten teilen, muss in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls noch weiter geklärt werden.

A_{2B} -Rezeptoren waren direkt nach der Isolation geringer exprimiert mit etwa gleichbleibendem Expressionsniveau in Kultur. Mittlerweile konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine Aktivierung dieses Rezeptors die Freisetzung von Zytokinen aus den EPDC bewirkt und ihre eigene enzymatische Ausstattung verändern kann [184]. Allerdings ist noch unklar, ob in diesem Rahmen eher pro- oder antiinflammatorische Effekte in der Infarktzone ausgeübt werden [184].

Transkripte des A_1 - und A_3 -Rezeptors wurden nicht detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass tatsächlich kaum eine Verunreinigung mit Kardiomyozyten vorliegt, denn diese exprimieren alle vier Untergruppen des Adenosinrezeptors [255, 256]. Dass A_1R und A_3R nicht nachgewiesen wurden, lässt den Umkehrschluss zu, dass bei der gewählten Isolationsmethode Kardiomyozyten vermutlich zuverlässig von den EPDC separiert wurden. Ebenso scheint die Verunreinigung mit Immunzellen nach der CD45-negativen MACS-Separation der EPDC vernachlässigbar zu sein, da Leukozyten ebenfalls A_1R und A_3R exprimieren würden [28]. Die Blutzellen, Immunzellen und Kardiomyozyten waren alle während des Isolationsprozesses aktiv aus der zu untersuchenden Zellsuspension entfernt worden. Deutliche Überschneidungen zeigte das Expressionsprofil der EPDC hingegen mit dem kardialer Fibroblasten, welche ebenfalls überwiegend $A_{2A}R$ und $A_{2B}R$ exprimieren (Übersichtsartikel [256]). Dies betont erneut die große Ähnlichkeit und mögliche Überschneidungen mit dieser Zellpopulation [156, 157, 170, 180, 181, 184, 187-189].

5.4 Kardiomyogene Prägung von EPDC

5.4.1 EPDC exprimieren basal kardiomyogene Marker

Da einige Arbeitsgruppen in adulten EPDC bereits eine kardiomyozytenähnliche Differenzierung nachweisen konnten [186, 194], stellte sich zunächst die Frage, ob die EPDC aus infarzierten Rattenherzen basal ebenfalls kardiogene Marker exprimieren und wie sich deren Expression im Laufe der Kulturzeit verändert. Interessanterweise waren mit *Troponin T* und *GATA4* zwei herzmuskelzellspezifische Marker in allen EPDC-Proben nachweisbar, auch nach mehreren Wochen in Kultur. Der Transkriptionsfaktor *Islet-1* wurde nur vereinzelt und *NKX 2.5* und *MEF2C* wurden nicht detektiert. *MHC*, das Teil des kontraktiven Apparates ist, fand sich in den MACS-separierten Zellen der P₁-Isolate, nicht jedoch in späteren Passagen.

GATA4 ist in die Herzentwicklung involviert und wird auch im adulten Wirbeltierherz exprimiert [257]. Dieser Transkriptionsfaktor kann also zu allen Zeitpunkten auf eine mögliche kardiogene Prägung der EPDC hinweisen. Er soll an der Steuerung verschiedener Stadien der Kardiogenese beteiligt und ein Vermittler von Überlebens-, Proliferations- und Differenzierungssignalen sein [258, 259]. Die Expression von *GATA4* kann aber auch dazu dienen, Zellen in einem Vorläuferstadium zu halten, in dem sie fähig sind, in kardiogene Zellen zu differenzieren [260] und soll die Chromatinstruktur kardialer DNA-Loci für eine Transkription zugänglich machen [261]. Darüber hinaus wurde *GATA4* als ein Marker für myokardiale und vaskuläre Vorläufer im Epikard beschrieben [186, 262]. Überraschenderweise nahm das Expressionslevel von *Troponin T* zwar in Kultur ab, jedoch nicht signifikant und *GATA4* wurde nahezu konstant exprimiert. Dies weist stark darauf hin, dass auch EPDC, die *in vitro* durch Teilung neu entstanden sind, die kardialen Marker *Troponin T* und *GATA4* transkribieren. Diese Prägung der Zellen scheint unter den gewählten Kulturbedingungen stabil zu sein. Die Expressionslevel von *Troponin T* und *MHC* sind jedoch noch deutlich niedriger als in ausdifferenzierten Herzmuskelzellen. Das grundsätzliche Vorhandensein einer kardiomyogenen Vorprägung der EPDC (engl. *commitment*) ist dennoch zu vermuten und lässt hoffen, dass die Zellen mit geeigneten Mitteln bzw. in passender Umgebung zu vollwertigen Herzmuskelzellen ausdifferenzieren können. Insbesondere auch deshalb, weil mit *Troponin T* ein Merkmal exprimiert wird, das bereits für eine gewisse Reife der Zellen spricht. Zahlreiche Autoren teilen die Ansicht, dass die Expression kardialer Marker darauf hinweist, dass das embryonale, kardiogene Potential der Zellen nicht verloren ist und reaktiviert werden kann [189]. Wenn davon ausgegangen wird, dass EPDC am ehesten ein ihnen bekanntes, also ihr embryonales Programm bei Reaktivierung im adulten Organismus wiederholen, wäre bestenfalls die Expression von *GATA4*, *Nkx2.5* und *Isl-1* zu erwarten. Allerdings nicht zwingend gleichzeitig, da z.B. *Isl-1* zwar vom Proepikard exprimiert wird, von den späteren embryonalen EPDC jedoch nicht: Zellen des Proepikards, die *WT-1⁺* sind, exprimieren teilweise *NKx2.5*, *Isl-1*

und *GATA4* [157], allerdings nicht als Koexpression, sondern sequentiell. Sie exprimieren kein *MEF2C* [189]. Insgesamt ähneln die Beobachtungen dieser Arbeit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So untersuchten Van Tuyn et al. adulte humane epikardiale Zellen von Herzen ohne Infarkt und zeigten, dass diese auch *Troponin T* und *GATA4* exprimierten. Diese Arbeitsgruppe konnte weder *Isl-1* noch *Nkx2.5* detektieren. Im Unterschied zu den Messungen an den EPDC aus infarzierten Herzen in der vorliegenden Arbeit, fanden Van Tuyn et al. jedoch auch *MEF2C* [194]. Des Weiteren berichteten Limana et al. von Zellen aus adultem humanem und murinem Epikard, die neben *c-kit* und *GATA4* auch *Nkx2.5* exprimierten [186]. In einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass murine EPDC *Troponin T* exprimieren, allerdings erst, wenn die Mäuse vor Infarzierung mit Thymosin $\beta 4$ behandelt wurden, wohingegen die unbehandelten Kontrollen kein *Troponin T* aufwiesen [70]. Zu einem ähnlichen Resultat kamen Zhou et al.: In EPDC, welche aus infarzierten Mäuseherzen mittels FACS isoliert wurden, konnten keine Kardiomyozytenmarker detektiert werden [181]. Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten zum einen den verschiedenen Isolationsmethoden und Zellkulturbedingungen zuzurechnen sein, zum anderen wurden unterschiedliche Methoden zur Quantifizierung der kardialen Marker verwendet, die sich in der Sensitivität bzw. der unteren Nachweisgrenze unterscheiden. Zudem handelt es sich bei EPDC um eine heterogene Population, deren einzelne Zellfraktionen durch unterschiedliche Markerexpression charakterisiert sind [188], sodass die abweichenden Aspekte nicht unbedingt unplausibel oder widersprüchlich sein müssen.

Zusammenfassend ist die in den adulten, nach Myokardinfarkt reaktivierten EPDC nachgewiesene stabile *GATA4*-Expression ein starkes Indiz für ein kardiomyogenes Potential der Zellen, das durch geeignete Beeinflussung besser genutzt werden könnte. Die Expression von *Troponin T* könnte auf reifere kardiomyozytenähnliche EPDC hinweisen, da es sich um ein spätes kardiales Protein handelt, während die frühen kardialen Transkriptionsfaktoren *Nkx2.5*, *MEF2C* und *Isl-1* nicht oder allenfalls in kleinsten Mengen detektiert wurden. Es ergaben sich außerdem Hinweise, dass die kardiomyozytenähnlichen Zellen unter den EPDC eine Teilungsaktivität besitzen, da das Expressionsniveau in Kultur mit zunehmender Zellzahl nicht abnahm. Letzteres spricht außerdem für die Stabilität des kardiomyogenen *commitment* der EPDC.

5.4.2 Die Transkripte kardialer Markergene stammen nicht aus einer Kontamination der EPDC mit Kardiomyozyten

Da die epikardialen Zellen in der vorliegenden Arbeit nach einem neuen Isolationsprotokoll gewonnen wurden, sollte ausgeschlossen werden, dass die in den EPDC gemessenen Kardiomyozytenmarker nicht einer Verunreinigung mit Kardiomyozyten zuzurechnen sind. Obwohl immunologische Färbungen im Rahmen dieser Arbeit nicht angefertigt wurden, kann man aus den Ergebnissen der Experimente und den Arbeiten anderer Gruppen indirekt ableiten, dass eine sol-

che Verunreinigung unwahrscheinlich ist: Das Filtern der Zellsuspension hatte bei anderen Arbeitsgruppen bereits Kardiomyozytenfragmente zuverlässig entfernt [93, 94, 263]. Hinzu kommt, dass die Isolation und Kultur intakter Kardiomyozyten schwierig sind und spezielle, differenzierte Protokolle sowie eine äußerst behutsame Handhabung erfordern [170, 264]. Es ist also unwahrscheinlich, dass mit dem EPDC-Isolationsprotokoll vitale Kardiomyozyten in der Isolationsfraktion verblieben sind oder sogar im Kulturgefäß überlebten. Darüber hinaus waren die Verhältnisse von *Troponin T* zu *GATA4* in den EPDC im Vergleich zu den Kardiomyozyten sehr unterschiedlich (Abbildung 4.9). So war *Troponin T* in den Herzmuskelzellen >500x höher exprimiert als in den EPDC. Die *GATA4*-Expression der Kardiomyozyten war hingegen ähnlich hoch wie die der EPDC. *Troponin T* war in den EPDC nur geringfügig höher als die *GATA4*-Expression und dieses Verhältnis blieb auch unter Kulturbedingungen konstant. Bei Verunreinigung durch Kardiomyozyten wäre dementsprechend eine sehr viel höhere *Troponin T*-Expression und damit eine Verschiebung des *Troponin/GATA4*-Verhältnisses zu erwarten gewesen. In den Expressionsmessungen von Komponenten des purinergen Systems zeigte sich außerdem, dass von EPDC nur die A_{2A} - und in geringerem Maße die A_{2B} -Rezeptoren exprimiert wurden, während von Kardiomyozyten bekannt ist, dass sie über alle vier Adenosinrezeptoren verfügen (siehe auch Abschnitt 5.3, [28, 255]). Dies spricht ebenfalls gegen eine Verfälschung der Expressionsanalysen durch eine Kardiomyozytenverunreinigung.

5.5 Das Transdifferenzierungspotenzial von EPDC bleibt ungeklärt

5.5.1 5-Azacytidin induziert nicht die Differenzierung von EPDC in Kardiomyozyten

Da die kardiale Prägung der EPDC ein relativ stabiles Merkmal zu sein scheint, das auch über einen längeren Kulturzeitraum und bei Zellteilung nicht verloren geht, wurde in dieser Arbeit *in vitro* mit Differenzierungsexperimenten untersucht, ob die Zellen durch gezielte Stimulation in Herzmuskelzellen ausdifferenzieren können. Hierzu wurde zunächst das Cytidin-Analogon 5-Azacytidin verwendet, welches ein beliebter Wirkstoff ist, um nichtmyogene Zellen in (Herz-) Muskelzellen zu differenzieren [64, 105]. Der genaue Mechanismus, mit dem die Substanz diese myogene Differenzierung induziert, ist noch unbekannt [105]. Man nimmt jedoch an, dass durch Demethylierung von transkriptionell inaktiven Genen die Expression verändert und eine unkontrollierte myogene Spezifizierung induziert wird [64, 105, 265-267]. Diese Substanz ist häufig eine der Ersten, die eingesetzt wird, um ein kardiomyogenes Differenzierungspotential einer Zelle zu testen, sodass der Einsatz bei EPDC mit Hinblick auf bisherige Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen naheliegend war: In verschiedenen Zelltypen wie MSC, ESC, UCBSC (*umbilical cord blood-derived stem cells*), ADSC sowie Sca⁺-CPC induzierte 5-Azacytidin die Differenzierung in die kardiomyogene Linie [64, 77, 78, 104-106, 128, 213-216].

Nach Stimulation der EPDC aus infarzierten Rattenherzen in der vorliegenden Arbeit waren, ebenso wie bei den MSC von Tomita et al. [64], zunächst keine sichtbaren morphologischen Veränderungen der Kultur zu beobachten. Bei vollständiger Konfluenz beschrieben Tomita et al. „Myotubules“, also myozytenähnliche, langgestreckte, teils verzweigte Zellen. In EPDC-Kulturen ließ sich ein ähnliches Phänomen beobachten (Abbildung 4.3), allerdings erschien diese Art von Zelle auch in den Kontrollkulturen und sie wurden bislang nicht mittels immunologischer Färbungen auf Vorhandensein von Kardiomyozytenmarkern untersucht.

In den Expressionsanalysen zeigte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen keine signifikant erhöhte Expression kardialer Marker nach Behandlung der EPDC mit dieser Substanz. Insbesondere blieb auch die Expression von *GATA4* und *Troponin T* konstant.

Es wäre denkbar, dass 5-Azacytidin die Differenzierung der EPDC in eine andere, nicht-kardiogene Linie induzierte. Eine solche Beobachtung wurde beispielsweise bei Fibroblasten gemacht, welche nach 5-Azacytidinbehandlung in Adipozyten und Skelettmuskelzellen differenzierten [268]. Des Weiteren zeigten Taylor et al., dass 5-Azacytidin in murinen ESC zwar eine myogene Differenzierung auslöste, jedoch auch eine adipogene oder chondrogene Wirkung hatte [213]. Sie schlussfolgerten, dass die Induktion eines muskulären Phänotyps zellzyklus-spezifisch erfolgte. Dies könnte für EPDC ebenfalls zutreffen. Eine Analyse weiterer Markergene verschiedener Zelllinien sowie die Einbeziehung des Zellzyklus in die Experimente könnte diesbezüglich mehr Aufschluss geben.

Eine Optimierung der Zellkulturbedingungen könnte bei den EPDC ebenfalls in einer Induktion kardialer Gene und somit Kardiomyogenese unter Einfluss von 5-Azacytidin resultieren. Daher wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die FCS-Konzentration variiert. Die Expressionslevel der kardialen Marker blieben jedoch weiter konstant. 5-Azacytidin wurde in einer Konzentration von 10 µmol/l eingesetzt. Diese Konzentration war in zahlreichen Versuchen anderer Arbeitsgruppen suffizient gewesen, um in mesenchymalen Knochenmarkszellen, *umbilical cord blood derived stem cells* und ESC eine kardiomyogene Differenzierung zuverlässig zu induzieren [77, 105, 106, 128, 214, 215]. Andere Arbeitsgruppen beobachteten jedoch, dass manche Zelltypen niedrigere oder auch höhere Konzentrationen von 5-Azacytidin für eine kardiogene Differenzierung benötigten [64, 104, 105, 215]. Darüber hinaus scheinen der Zeitpunkt und die Dauer der Applikation des Cytidin-Analogons, die Art der Zellpopulation, Speziesunterschiede und insbesondere die Medienzusammensetzung von Bedeutung zu sein. So konnten beispielsweise Medienzusätze zusätzlich zum 5-Azacytidin, wie z.B. Insulin, die Differenzierung bei anderen Zellpopulationen hemmen [106], während bFGF/FGF-2, Vitamin C, TGF-β, BMP4 und BMP6 diese förderten [78, 215, 216]. Die größte Steigerung der kardiomyogenen Differenzierung erzielten Burridge et. al, die durch Optimierung von 45 Kultur-Variablen von hESC wie

Monolayer-Kultur vs. 3D-System, Adhärenz, Zusammensetzung der Umgebungsatmosphäre und die Zusammensetzung des Mediums die Differenzierung gegenüber der alleinigen Induktion mit 5-Azacytidin auf $> 94.7 \pm 2.4\%$ steigerten [78]. Tomita et al., die selbst ein wirksames Differenzierungsprotokoll mit 5-Azacytidin für BMSC entwickelt haben, bemängelten, dass die Substanz nur zufällige Demethylierungen bewirke und daher nur in 30 % der Experimente überhaupt eine myogene Differenzierung beobachtet werden konnte [64]. Da die Wahrscheinlichkeit hoch ist, einen unerwünschten Zelltyp zu generieren, ist 5-Azacytidin generell als kardiogener Induktor eher als weniger geeignet einzustufen. Jedoch sollten, bevor gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass mittels 5-Azacytidin eine kardiale Transdifferenzierung der EPDC möglich ist, weitere Abwandlungen des Protokolls in Anlehnung an die oben aufgeführten Literaturdaten getestet werden.

5.5.2 Rekapitulation der Embryonalentwicklung durch bioaktive Moleküle

Mitglieder der TGF- β -Superfamilie als kardiinduktive Substanzen

Viele Arbeitsgruppen sind überzeugt davon, dass die Reaktivierung von Signalwegen, die schon in der Embryonalentwicklung die Spezifizierung der Herzmuskelzellen steuern, auch die kardiogene Differenzierung von Stammzellen einleiten kann. Die Zellen werden dabei nach teilweise komplexen Protokollen Mixturen von Wachstumsfaktoren ausgesetzt. Beliebte Substanzen sind dabei Wachstumsfaktoren wie BMPs und FGFs, die während der Embryonalentwicklung z.B. vom inneren (Entoderm) und äußeren Keimblatt (Ektoderm) sezerniert werden. Sie sind notwendig für die Spezifizierung und Stabilisierung des Mesoderms, in welchem das Herz entsteht [269-274]. BMPs, Aktivin A, Wnt-Signalgeber und die FGFs sind Mitglieder der TGF- β -Superfamilie von denen bekannt ist, dass sie essentiell für die kardiale Entwicklung sind [275]. In Anlehnung an Experimente anderer Arbeitsgruppen mit ESC und MSC wurden daher in der vorliegenden Arbeit Aktivin A, FGF-2, IWP-2, BMP-4 und das *small molecule* CHIR99021 einzeln und in Kombination sowie in gestaffelter Applikation bei Variation des FCS-Anteils als potenzielle Induktoren der Kardiomyogenese von EPDC getestet. Die Substanzen waren unter den gewählten Versuchsbedingungen jedoch nicht in der Lage, die bereits vorhandene kardiale Prägung der EPDC zu steigern. Die detektierte Expression von *GATA4* und *Troponin T* fand sich sowohl in den behandelten als auch in den Kontrollgruppen auf gleichem Niveau.

Aktivin A, BMP4, FGF-2 als potenzielle Induktoren der kardiomyogenen Differenzierung

Laflamme et al. stellten fest, dass mit einer sequentiellen Applikation von Aktivin A und BMP4 die Differenzierung von hESC in Kardiomyozyten von $<1\%$ allein durch Serum [76] auf $>30\%$ erhöht werden konnte [79]. Gerade BMP4 gilt als potenter Stimulator für die Myokardformation *in vitro* und *in vivo* [276]. Die Wirksamkeit des Protokolls wurde durch andere Arbeitsgruppen bestätigt [80, 203]. Laflamme et al. wählten die Substanzen und die serielle Applikation, um gro-

be Abläufe während der frühen Kardiogenese zu imitieren. Aktivin induzierte eine mesodermale Differenzierung der ESC [204] und anschließend wurde durch BMP4 in diesen eine kardiogene Spezifizierung eingeleitet [205-207]. Mehrere Ansätze können erklären, warum dieses Protokoll die kardiomyogene Differenzierung der EPDC nicht steigern konnte und so die Expression von *GATA4* und *Troponin T* im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle konstant blieb. Mit Hinblick auf den postulierten Mechanismus des Protokolls sind EPDC in ihrer Entwicklung sehr viel weiter als ESC zum Zeitpunkt der Induktion. Eine Mesoderm-Induktion ist in den mesenchymalen EPDC also vermutlich weder möglich noch notwendig. Und auch eine kardiomyogene Teildifferenzierung liegt bereits vor, sodass der Impuls durch Aktivin A und BMP4 mutmaßlich auch deshalb erfolglos bleibt. Postuliert man jedoch, dass Aktivin A und BMP4 dennoch einen alternativen kardiomyogenen Signalweg in EPDC anstoßen können, ist eine sequentielle Applikation zumindest in der Theorie sinnvoll. Außerdem wurden in der Literatur zum Teil 10-fach höhere Konzentrationen von Aktivin A verwendet [79, 82]. Es wird immer wieder betont, dass die optimale Konzentration und Zeitpunkt der Applikation entscheidend für den Erfolg von Transdifferenzierungsprotokollen sind [277]. Auch bei ESC war die Dosis ausschlaggebend: H7-Zellen reagierten auf Aktivin A dosisabhängig, eine hohe Dosis von 100 ng/ml war besser als 25 ng/ml oder 12 g/ml [80]. Letztlich war der Erfolg des Protokolls auch bei ESC variabel zwischen den Zelllinien und sogar Versuchsdurchgängen [81]. Die Bedingungen mussten auf jede pluripotente Population neu abgestimmt werden [278-280]. Eine umfangreiche Variation der Stimulationsbedingungen, wie Änderung der Konzentration der bioaktiven Moleküle, des Induktionszeitpunktes, Dauer der Applikation oder Zusammensetzung des Kulturmediums, kann in zukünftigen Differenzierungsstudien möglicherweise erfolgreicher kardiale Gene in EPDC induzieren.

Bartunek et al. konnten unter anderem mithilfe von FGF-2 die kardiogene Spezifizierung von adulten MSC verbessern [107]. Rosenblatt-Velin beobachteten, dass die Differenzierung von neonatalen Maus-Sca-1⁺-Zellen ebenfalls FGF-2 abhängig war [208]. Da FGF-2 folglich ein potenter Induktor einer kardiomyogenen Spezifizierung sein kann, und da EPDC ebenfalls Sca-1 exprimieren können [70], wurden epikardiale Zellen auf eine Steigerung des kardialen Phänotyps durch diesen Wachstumsfaktor untersucht. Es fand sich jedoch weder bei alleinigem Einsatz, noch in Kombination mit Aktivin A, BMP4 und IWP-2 ein signifikanter Anstieg der *GATA4*- oder *Troponin T*-Expression. Die Ursache könnte erneut in den gewählten Versuchsbedingungen liegen, hier könnte insbesondere die Dosis zu niedrig gewählt worden sein. Eine andere Erklärungsmöglichkeit findet sich in der entwicklungsgeschichtlichen Wirkung von FGF-2 auf epikardiale Zellen. FGFs und BMPs treten in der Epikardentwicklung häufig gemeinsam auf und können die Entwicklung der epikardialen Zellen in divergierende Richtungen steuern. BMP2 z.B. hat während der Epikardentwicklung konzentrationsabhängige Wirkung. Niedrige Konzentrationen erhielten die Expression der epikardialen Marker *Tbx18* und *WT-1*, wohingegen hohe Konzent-

rationen die Differenzierung des Proepikards in Kardiomyozyten induzierten [276, 281]. Kruit-hof et al. experimentierten mit Proepikard-Explantaten und beobachteten, dass FGF2 eher das Wachstum der proepikardialen Kulturen steigerte. BMP4 hingegen erhöhte die Bildung von Kardiomyozyten aus dem Proepikard. Wurde FGF-2 gemeinsam mit BMP4 appliziert, wurde der Kardiomyozyten-induzierende Effekt von BMP4 blockiert [276]. Betrachtet man die Resultate von Morabito et al., welche zeigten, dass FGF-2 die EMT des Epikards *in vivo* und in PEO-Explantaten *in vitro* induzierte, aber keinen kardiogenerischen Effekt hatte [187], wäre eine Testung dieser sequenzielle Applikation von FGF-2 und BMPs auch an adulten EPDC aus infarzierten Herzen sinnvoll.

Andererseits berichteten Vega-Hernández et al., dass das Epikard in der Embryonalentwicklung selbst verschiedene Mitglieder der FGF-Familie sezerniert, auch FGF-2, welches allerdings die Bildung kardialer Fibroblasten fördert [282]. Dementsprechend ist es nicht verwunderlich, dass auch im aktivierten adulten Epikard FGF-2 keine kardiomyogene Spezifizierung induzierte. Zhou et al. experimentierten mit EPDC nach myokardialer Infarzierung und fanden heraus, dass FGF2 eine Wachstumsbeschleunigung der EPDC bewirkte [181], ähnlich wie schon in den proepikardialen Kulturen von Kruit-hof et al. [276]. FGF2 wird nach Myokardinfarkt verstärkt im Epikard produziert [181]. Dies lässt ebenfalls vermuten, dass FGF2 physiologischerweise keine kardiogenerische, sondern andere Wirkungen auf EPDC hat.

In diesem Kontext demonstrierten einige Studien, dass EPDC *in vitro* nach Stimulation mit VEGF- und FGF-2 endothelial differenzierten [142] oder nach FGF-2-Stimulation in Kombination mit BMP2 zu glatten Muskelzellen wurden [194]. Ob auch in der adulten EPDC-Kultur FGF-2 eine erhöhte Fibroblasten-, Endothel- oder Glatte-Muskelzellen-Transformation der Zellen bewirkt, muss zukünftig noch untersucht werden.

IWP-2 und CHIR99021: Modulatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs

CHIR99021 ist ein selektiver Inhibitor der Glykogen-Synthase-Kinase 3b (GSK3b) und aktiviert den kanonischen Wnt-Signalweg [209]. Dieser Signalweg ist einer der Schlüsselregulatoren der Kardiogenese *in vivo* und *in vitro* [82]: Wurde in Experimenten zunächst der Wnt-Aktivator und anschließend ein Wnt-Antagonist wie IWP-2 appliziert, war die Bildung von Kardiomyozyten aus hESC am effektivsten [209]. Die beste Ausbeute wurde erzielt, wenn nach der seriellen Applikation der Wnt-Modulatoren das oben beschriebene Aktivin A und BMP4-Prozedere zusätzlich verwendet wurde. Die serielle Applikation der Wnt-Substanzen entspricht dem physiologischen Aktivierungsmuster des Signalweges während der Embryonalentwicklung, denn der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist während der Organogenese des Herzens divergierend aktiv [217]: Zu einem frühen Zeitpunkt fördert die Aktivierung des Signalweges die kardiogene Entwicklung, später in der Organogenese ist eine Hemmung förderlich. Die Anwendung dieses Protokolls war auch bei iPSC erfolgreich [82].

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit hatte die Stimulation mit CHIR99021 und IWP-2 keinen signifikanten Effekt auf die Expression der Kardiomyozytenmarker *GATA4* und *Troponin T* in den EPDC. Die Konzentration von CHIR99021 war jedoch mit 3 μM relativ niedrig gewählt. In den Versuchen mit ESC waren 12-15 μM wirkungsvoller [82], IWP-2 war mit 5 μM ebenfalls in der Literatur höher dosiert. Folgt man jedoch den Überlegungen des ebenfalls an ESC entwickelten Aktivin A/BMP4-Protokolls, so ist die relativ fortgeschrittene Differenzierung der EPDC wahrscheinlich nicht zugänglich für Protokolle, die darauf zielen, sehr frühe Entwicklungsschritte der Kardiogenese nachzuahmen. CHIR99021 soll den Wnt-Signalweg aktivieren und damit, ebenso wie Aktivin A, die Mesoderminduktion einleiten. Dies ist ein Schritt, der bei EPDC schlicht deshalb nicht möglich sein könnte, weil sie die Fähigkeit zur Keimblattbildung hinter sich gelassen haben, es sich bereits um mesenchymale Zellen handelt und sie schon relativ reife kardiale Marker wie *Troponin T* exprimieren.

5.6 Resümee und Ausblick

EPDC haben stammzellartige Eigenschaften und mannigfaltige parakrine Effekte in der Embryonalentwicklung sowie während der Myokardregeneration von Zebrafischen und neonatalen Mäusen. Deshalb besteht die Hoffnung, dass mit einer geeigneten pharmakologischen Aktivierung fördernde Effekte auf den Heilungsprozess nach Herzinfarkt und sogar der Ersatz von Herzmuskelgewebe durch EPDC erreicht werden könnten. Ihre Ähnlichkeiten mit anderen Stammzellgruppen mit kardiomyogenem Potential wie andere CPC und MSC z.B. hinsichtlich ihrer Kulturmorphologie (siehe 5.1.1), kann ein Hinweis auf mögliche weitere gemeinsame Fähigkeiten und Überschneidungen mit diesen Gruppen sein. Ihre stabile Expression von kardiomyozytenspezifischen Markern nach Myokardinfarkt in der Ratte, auch bei Variation der Kulturzeit oder Kulturbedingungen (siehe 5.4.1), deutet außerdem auf eine kardiomyogene Vorprägung (*commitment*) hin, sodass EPDC mit einer geeigneten pharmakologischen Substanz vermutlich leichter als andere Zellpopulationen ein kardiomyozytenähnliches Schicksal einschlagen könnten. Dies ist auch mit Hinblick auf die gelegentlich beobachtete Bildung kardiomyozytenähnlicher Zellen aus EPDC in den Experimenten anderer Arbeitsgruppen wahrscheinlich [70, 191]. Der stabile Nachweis der kardiomyozytären Proteine und Transkriptionsfaktoren, der in dieser Arbeit nur auf Expressionsebene erfolgte, muss allerdings noch auf Proteinebene bestätigt werden. Dass entsprechende Transkripte bereits vorhanden sind, macht auch die Technik der Manipulation mittels miRNA für EPDC interessant.

Die beobachteten Proliferations- und Migrationseigenschaften, insbesondere ihre Fähigkeit zur chemotaktisch-gerichteten Bewegung und entsprechende Manipulierbarkeit der EPDC (siehe 5.2.2), sind ebenfalls interessante Ansatzpunkte, um Heilungsvorgänge mittels EPDC zu optimie-

ren. Dass sie wahrscheinlich Einfluss auf die purinerge Signalgebung während der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt nehmen (siehe 5.3), bietet weitere Möglichkeiten zur pharmakologischen Manipulation der EPDC.

Die direkte Differenzierung epikardialer Zellen in Kardiomyozyten würde der Idealvorstellung einer therapeutischen Intervention nach Myokardinfarkt entsprechen. Auch wenn 5-Azacytidin, Aktivin A, BMP4, FGF-2, IWP-2 und CHIR99021 mit den in dieser Arbeit getesteten Protokollen keine weitere kardiomyogene Differenzierung in den EPDC induzieren konnten (siehe 5.5), könnten diese Substanzen bei Modifikation der Isolations- oder Kulturbedingungen sowie der Zusammensetzung der Differenzierungsmedien vielleicht wirkungsvoller sein, so wie es auch bei anderen Stammzellpopulationen bei Modifikation der Transdifferenzierungsprotokolle der Fall war [64, 77-80, 82, 104-106, 114, 128, 277-280]. Es ist jedoch auch möglich, dass die Zellen durch ihre kardiomyogene Vorprägung, auch mit Hinblick auf das Verhalten der EPDC bei Myokardschädigung im Zebrafisch oder bei neonatalen Mäusen, einer spezifischeren Aktivierung bedürfen (siehe 5.5.2). Eine genauere Erforschung der Signalgebung während der Heilungsvorgänge und eine weitere Aufklärung der epikardialen Eigenschaften kann wichtige Hinweise auf wirksamere Substanzen geben. Auch Wirkstoffe, die eine kardiomyogene Differenzierung von kardialen Fibroblasten unterstützen (z.B. TGF- β [96]) sind aufgrund ihrer großen Ähnlichkeiten mit den EPDC interessant (siehe 5.1.1, 5.3). Von Autoren, die bereits Erfahrung mit der Reprogrammierung adulter Zellen durch die Übertragung von kardialen Transkriptionsfaktoren haben, wurde außerdem diese Technik explizit auch für EPDC als vielversprechend vorgeschlagen [283]. Erste Versuche konnten mit den bislang eingesetzten Transkriptionsfaktoren und -Techniken jedoch noch keine wesentlichen Erfolge erzielen [284]. Für ein breiteres Screening von Wirkstoffen oder Transkriptionsfaktoren, welches bereits in der kardiomyogenen Differenzierung von ESC und kardialen Fibroblasten Erfolge zeigte [78, 92], muss noch ein Weg gefunden werden, um durch eine Stimulation der Proliferation eine weitaus größere Zellpopulation untersuchen zu können (siehe 5.1.2). Neben einer Proliferationsstimulation ist hier auch eine Materialaquirierung aus humanem intraoperativem oder intra-PTCA-Biopsiematerial interessant, auch mit Hinblick auf Speziesunterschiede, die bei rein muriner Forschung noch überwunden werden müssten.

Die Erforschung der Biologie von epikardialen Zellen befindet sich erst am Anfang. Wünschenswert ist zukünftig auch eine Vereinheitlichung der Isolations- und Kulturmethode zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen, da bislang keine direkte Vergleichbarkeit der untersuchten EPDC-Populationen gegeben ist. Dabei sollten physiologische Gegebenheiten wie die Unversehrtheit des Perikards [186, 193] und mit Hinblick auf die klinische Realität mit PTCA als Standardeingriff, die Reperfusionphase im Mittelpunkt stehen. Bezüglich weiterer *in vitro*-Experimente sollte die Entwicklung eines standardisierten Mediums ohne FCS eine hohe Priorität

tät einnehmen. Denn die Wechselwirkungen und Einflussfaktoren bei Experimenten mit Serum bleiben durch die Menge der Bestandteile und Varianz der Zusammensetzung letztlich undurchschaubar [221]. EPDC überstanden in den Vorexperimenten der vorliegenden Arbeit den Entzug von Serum nicht. FCS könnte jedoch z.B. durch die Nukleotidaseaktivität [238] die weitere Erforschung der Rolle der EPDC im purinergen Signalsystem stören und durch andere Bestandteile die Transdifferenzierungsbereitschaft hemmen. Bei ESC und MSC, die anfänglich ebenfalls häufig unter FCS-Einfluss kultiviert wurden, war die Komposition entsprechender standardisierter Medien bereits möglich [285-287]. Letztlich sollten auch *in vivo*-Strategien mit Hinblick auf das postischämische Milieu und auch unterstützende Effekte aus der organspezifischen Umgebung erprobt werden. So könnte z.B. eine Injektion von Wirkstoffen in die perikardiale Flüssigkeit erfolgsversprechender sein als eine reine *in vitro*-Stimulation.

Epikardiale Zellen - eine lange unterschätzte Zellpopulation - haben vielversprechende Ansatzmöglichkeiten für regenerative Zelltherapien nach Myokardinfarkt. Ihre weitere Erforschung wird zeigen, ob sie sich tatsächlich in der ihnen zugeordneten Rolle als „ultimative kardiale Stammzelle“ [142] bewähren können.

6 Literaturverzeichnis

1. Alella, A., *Steuerung der Coronardurchblutung*, in *Probleme der Coronardurchblutung*. 1958, Springer. p. 10-31.
2. Cohnheim, J. and A. v. Schulthess-Rechberg, *Ueber die Folgen der Kranzarterienverschiessung für das Herz*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, 1881. **85**(3): p. 503-537.
3. Stein, B., et al., *Pathogenesis of Coronary Occlusion*. Hospital Practice, 1988. **23**(4): p. 87-99.
4. Büchner, F., *Relative Durchblutungsnot des Herzmuskels*. DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1957. **82**(26): p. 1037-1042.
5. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Regenerating the heart*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): p. 845-56.
6. Paiva, L., et al., *Universal Definition of Myocardial Infarction: Clinical Insights*. Cardiology, 2015. **131**(1): p. 13-21.
7. Murry, C.E., H. Reinecke, and L.M. Pabon, *Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair*. Journal of the American College of Cardiology, 2006. **47**(9): p. 1777-1785.
8. Boersma, E., *Primary Angioplasty Vs. Fibrinolysis: An Overview of Randomized Trials and Registry Data*. Mechanical Reperfusion for STEMI: From Randomized Trials to Clinical Practice, 2016: p. 1.
9. Chen, G.Y. and G. Nuñez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(12): p. 826-837.
10. Frangogiannis, N.G., *The immune system and cardiac repair*. Pharmacological Research, 2008. **58**(2): p. 88-111.
11. Janse, M.J. and A.L. Wit, *Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction*. Physiological reviews, 1989. **69**(4): p. 1049-1169.
12. Spach, M.S. and J.P. Boineau, *Microfibrosis produces electrical load variations due to loss of side-to-side cell connections: a major mechanism of structural heart disease arrhythmias*. Pacing Clin Electrophysiol, 1997. **20**(2 Pt 2): p. 397-413.
13. de Bakker, J.M., et al., *Fractionated electrograms in dilated cardiomyopathy: origin and relation to abnormal conduction*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1071-8.
14. Cohn, J.N., R. Ferrari, and N. Sharpe, *Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(3): p. 569-582.
15. Pfeffer, M.A. and E. Braunwald, *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications*. Circulation, 1990. **81**(4): p. 1161-1172.

16. Bernard, R., *Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature.* Circulation, 1979. **59**(3): p. 607-609.
17. Mathers, C.D. and D. Loncar, *Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030.* PLoS medicine, 2006. **3**(11): p. e442.
18. Gößwald, A., et al., *Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland.* Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 650-655.
19. Damm, K., et al., *Krankheitskosten des akuten Koronarsyndroms in Deutschland.* Der Kardiologe, 2011. **5**(2): p. 122-128.
20. Löwel, H., *Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt.* Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2006(33).
21. Stewart, S., et al., *Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century?* Heart, 2003. **89**(1): p. 49-53.
22. Smart, N., K.N. Dube, and P.R. Riley, *Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation.* Vascul Pharmacol, 2013. **58**(3): p. 164-73.
23. Stewart, S., et al., *More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure.* European journal of heart failure, 2001. **3**(3): p. 315-322.
24. Braunwald, E., *Heart failure: an update.* Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2013. **94**(4): p. 430-432.
25. McMurray, J.J., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012.* European journal of heart failure, 2012. **14**(8): p. 803-869.
26. Penn, I., *Tumors after renal and cardiac transplantation.* Hematology/oncology clinics of North America, 1993. **7**(2): p. 431-445.
27. Fishman, J.A. and R.H. Rubin, *Infection in organ-transplant recipients.* New England Journal of Medicine, 1998. **338**(24): p. 1741-1751.
28. Borg, N., *Die Rolle der Ekto-5-Nukleotidase (CD73) bei der Entzündungsreaktion nach Herzinfarkt in der Maus.* 2014, Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Diss., 2014.
29. Laflamme, M.A. and C.E. Murry, *Heart regeneration.* Nature, 2011. **473**(7347): p. 326-335.
30. Smart, N., et al., *Myocardial regeneration: expanding the repertoire of thymosin β 4 in the ischemic heart.* Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1269**(1): p. 92-101.
31. Frangogiannis, N.G., *Regulation of the inflammatory response in cardiac repair.* Circulation research, 2012. **110**(1): p. 159-173.
32. Christia, P. and N.G. Frangogiannis, *Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction.* European journal of clinical investigation, 2013. **43**(9): p. 986-995.
33. Sutton, M.G.S.J. and N. Sharpe, *Left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy.* Circulation, 2000. **101**(25): p. 2981-2988.

34. Eltzschig, H.K., M.V. Sitkovsky, and S.C. Robson, *Purinergic signaling during inflammation*. New England Journal of Medicine, 2012. **367**(24): p. 2322-2333.
35. Ravichandran, K.S., *Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways*. Immunity, 2011. **35**(4): p. 445-455.
36. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation*. Nature Medicine, 2011. **17**(11).
37. Burnstock, G. and A. Pelleg, *Cardiac purinergic signalling in health and disease*. Purinergic signalling, 2015. **11**(1): p. 1-46.
38. Marcus, A.J., et al., *The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **99**(6): p. 1351.
39. Behdad, A., et al., *Vascular smooth muscle cell expression of ectonucleotidase CD39 (ENTPD1) is required for neointimal formation in mice*. Purinergic signalling, 2009. **5**(3): p. 335-342.
40. Kukulski, F., et al., *Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8*. Purinergic signalling, 2005. **1**(2): p. 193-204.
41. Robson, S.C., J. Sévigny, and H. Zimmermann, *The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance*. Purinergic signalling, 2006. **2**(2): p. 409-430.
42. Zimmermann, H., M. Zebisch, and N. Sträter, *Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases*. Purinergic signalling, 2012. **8**(3): p. 437-502.
43. Ferrari, D., et al., *Purinergic signaling during immune cell trafficking*. Trends in immunology, 2016. **37**(6): p. 399-411.
44. Haskó, G. and B. Cronstein, *Regulation of inflammation by adenosine*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 85.
45. Cronstein, B.N., *Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent*. Journal of Applied Physiology, 1994. **76**(1): p. 5-13.
46. Fredholm, B.B., et al., *Nomenclature and classification of purinoceptors*. Pharmacological reviews, 1994. **46**(2): p. 143-156.
47. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update*. Pharmacological reviews, 2011. **63**(1): p. 1-34.
48. Blackburn, M.R., et al., *Adenosine receptors and inflammation*, in *Adenosine receptors in health and disease*. 2009, Springer. p. 215-269.
49. Milne, G.R. and T.M. Palmer, *Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor*. The Scientific World Journal, 2011. **11**: p. 320-339.
50. Glover, D.K., et al., *Reduction of infarct size and postischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A2A receptor agonist, in reperfused canine myocardium*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2005. **288**(4): p. H1851-H1858.

51. Lasley, R.D., M.S. Jahania, and R.M. Mentzer, *Beneficial effects of adenosine A2a agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2001. **280**(4): p. H1660-H1666.
52. Yang, Z., et al., *Myocardial Infarct-Sparing Effect of Adenosine A2A Receptor Activation Is due to Its Action on CD4+ T Lymphocytes*. Circulation, 2006. **114**(19): p. 2056-2064.
53. Feoktistov, I. and I. Biaggioni, *Role of adenosine A2B receptors in inflammation*. Advances in pharmacology (San Diego, Calif.), 2011. **61**: p. 115.
54. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-369.
55. Albin, A., B.C. Adelmann-Grill, and P.K. Müller, *Fibroblast chemotaxis*. Collagen and related research, 1985. **5**(3): p. 283-296.
56. Keller, H., et al., *A proposal for the definition of terms related to locomotion of leucocytes and other cells*. Cell biology international reports, 1977. **1**(5): p. 391-397.
57. Porrello, E.R., et al., *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart*. Science, 2011. **331**(6020): p. 1078-1080.
58. Go, A.S., et al., *Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2013. **127**(1): p. e6.
59. Winter, E.M., *From cardiogenesis to cardiac regeneration: focus on epicardium-derived cells*. 2009: Department of Anatomy and Embryology, Faculty of Medicine/Leiden University Medical Center (LUMC), Leiden University.
60. Hunt, S.A., *Taking Heart—Cardiac Transplantation Past, Present, and Future*. New England Journal of Medicine, 2006. **355**(3): p. 231-235.
61. Hunt, S.A. and F. Haddad, *The changing face of heart transplantation*. Journal of the American College of Cardiology, 2008. **52**(8): p. 587-598.
62. Askoxylakis, V., et al., *Long-term survival of cancer patients compared to heart failure and stroke: a systematic review*. BMC cancer, 2010. **10**(1): p. 1.
63. Leri, A., J. Kajstura, and P. Anversa, *Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration*. Physiological reviews, 2005. **85**(4): p. 1373-1416.
64. Tomita, S., et al., *Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2002. **123**(6): p. 1132-1140.
65. Potten, C.S., *Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 1998. **353**(1370): p. 821-830.
66. Anderson, D.J., F.H. Gage, and I.L. Weissman, *Can stem cells cross lineage boundaries?* Nature medicine, 2001. **7**(4): p. 393-395.
67. Segers, V.F. and R.T. Lee, *Stem-cell therapy for cardiac disease*. Nature, 2008. **451**(7181): p. 937-42.

68. Smart, N., et al., *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 640-644.
69. Wei, K., et al., *Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart*. Nature, 2015. **525**(7570): p. 479-485.
70. Smart, N., et al., *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 640-4.
71. Choi, W.-Y., et al., *In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration*. Development, 2013. **140**(3): p. 660-666.
72. Bartunek, J., et al., *The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart*. European heart journal, 2006. **27**(11): p. 1338-1340.
73. Balsam, L.B., et al., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature, 2004. **428**(6983): p. 668-673.
74. Zhang, M., et al., *Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2001. **33**(5): p. 907-921.
75. Doetschman, T.C., et al., *The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium*. Development, 1985. **87**(1): p. 27-45.
76. Xu, C., et al., *Cardiac bodies: a novel culture method for enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Stem cells and development, 2006. **15**(5): p. 631-639.
77. Xu, C., et al., *Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells*. Circulation research, 2002. **91**(6): p. 501-508.
78. Burridge, P.W., et al., *A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability*. PloS one, 2011. **6**(4): p. e18293.
79. Laflamme, M.A., et al., *Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(9): p. 1015-24.
80. Jha, R., R.-H. Xu, and C. Xu, *Efficient differentiation of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells with growth factors*. Cardiomyocytes: Methods and Protocols, 2015: p. 115-131.
81. Paige, S.L., et al., *Endogenous Wnt/ β -catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells*. PloS one, 2010. **5**(6): p. e11134.
82. Lian, X., et al., *Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(27): p. E1848-E1857.
83. Grinnemo, K.-H., et al., *Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings*. Reproductive biomedicine online, 2006. **13**(5): p. 712-724.

84. Nussbaum, J., et al., *Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response*. FASEB J, 2007. **21**(7): p. 1345-57.
85. Messina, E., et al., *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart*. Circulation research, 2004. **95**(9): p. 911-921.
86. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
87. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
88. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
89. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
90. Pera, M.F., *Stem cells: The dark side of induced pluripotency*. Nature, 2011. **471**(7336): p. 46-47.
91. Mummery, C., *Induced pluripotent stem cells--a cautionary note*. N Engl J Med, 2011. **364**(22): p. 2160-2162.
92. Jayawardena, T.M., et al., *MicroRNA-Mediated In Vitro and In Vivo Direct Reprogramming of Cardiac Fibroblasts to Cardiomyocytes*. 2012.
93. Ieda, M., et al., *Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors*. Cell, 2010. **142**(3): p. 375-86.
94. Ieda, M., *Direct reprogramming into desired cell types by defined factors*. Keio J Med, 2013. **62**(3): p. 74-82.
95. Qian, L., et al., *In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 593-598.
96. Fu, J.-D., et al., *Direct reprogramming of human fibroblasts toward a cardiomyocyte-like state*. Stem cell reports, 2013. **1**(3): p. 235-247.
97. Lewis, B.P., et al., *Prediction of mammalian microRNA targets*. Cell, 2003. **115**(7): p. 787-798.
98. Sluijter, J.P., et al., *MicroRNA-1 and-499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2010. **30**(4): p. 859-868.
99. Kanellopoulou, C., et al., *Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing*. Genes & development, 2005. **19**(4): p. 489-501.
100. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nature Reviews Immunology, 2008. **8**(9): p. 726-736.
101. Lindner, U., et al., *Mesenchymal stem or stromal cells: toward a better understanding of their biology?* Transfusion Medicine and Hemotherapy, 2010. **37**(2): p. 75-83.

102. Friedenstein, A., et al., *Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method*. *Experimental hematology*, 1973. **2**(2): p. 83-92.
103. Grigoriadis, A.E., J. Heersche, and J.E. Aubin, *Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone*. *The Journal of cell biology*, 1988. **106**(6): p. 2139-2151.
104. Makino, S., et al., *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. *The Journal of clinical investigation*, 1999. **103**(5): p. 697-705.
105. Tomita, S., et al., *Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function*. *Circulation*, 1999. **100**(suppl 2): p. II-247-II-256.
106. Wakitani, S., T. Saito, and A.I. Caplan, *Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine*. *Muscle & nerve*, 1995. **18**(12): p. 1417-1426.
107. Bartunek, J., et al., *Pretreatment of adult bone marrow mesenchymal stem cells with cardiomyogenic growth factors and repair of the chronically infarcted myocardium*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2007. **292**(2): p. H1095-H1104.
108. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. *Circulation research*, 2004. **95**(1): p. 9-20.
109. Suzuki, G., et al., *Autologous mesenchymal stem cells mobilize cKit+ and CD133+ bone marrow progenitor cells and improve regional function in hibernating myocardium*. *Circulation research*, 2011. **109**(9): p. 1044-1054.
110. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. *Nature*, 2001. **410**(6829): p. 701-705.
111. Williams, A.R., et al., *Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy functional recovery and reverse remodeling*. *Circulation research*, 2011. **108**(7): p. 792-796.
112. Reinecke, H., et al., *Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells*. *Circulation Research*, 2008. **103**(10): p. 1058-1071.
113. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. *Journal of cell science*, 2006. **119**(11): p. 2204-2213.
114. Zhu, Y., et al., *Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC*. *Cell biochemistry and function*, 2008. **26**(6): p. 664-675.
115. Hort, W., *Quantitative histologische Untersuchungen an wachsenden Herzen*. *Virchows Archiv*, 1953. **323**(2): p. 223-242.
116. Bergmann, O., et al., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. *Science*, 2009. **324**(5923): p. 98-102.
117. Kajstura, J., et al., *Myocyte turnover in the aging human heart*. *Circ Res*, 2010. **107**(11): p. 1374-86.

118. Mollova, M., et al., *Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(4): p. 1446-51.
119. Senyo, S.E., et al., *Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes*. Nature, 2013. **493**(7432): p. 433-6.
120. Beltrami, A.P., et al., *Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction*. N Engl J Med, 2001. **344**(23): p. 1750-7.
121. Hsieh, P.C., et al., *Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury*. Nature medicine, 2007. **13**(8): p. 970-974.
122. Sahara, M., F. Santoro, and K.R. Chien, *Programming and reprogramming a human heart cell*. EMBO J, 2015. **34**(6): p. 710-38.
123. Taubenschmid, J. and G. Weitzer, *Mechanisms of cardiogenesis in cardiovascular progenitor cells*. Int Rev Cell Mol Biol, 2012. **293**: p. 195-267.
124. Bearzi, C., et al., *Human cardiac stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(35): p. 14068-73.
125. Dawn, B., et al., *Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(10): p. 3766-3771.
126. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-76.
127. Bollini, S., N. Smart, and P.R. Riley, *Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 296-303.
128. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12313-8.
129. Laugwitz, K.L., et al., *Postnatal *isl1*+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature, 2005. **433**(7026): p. 647-53.
130. Tomita, Y., et al., *Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart*. The Journal of cell biology, 2005. **170**(7): p. 1135-1146.
131. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature, 2002. **418**(6893): p. 41-49.
132. DeRuiter, M., et al., *The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos*. Anatomy and embryology, 1992. **185**(5): p. 461-473.
133. Wessels, A. and R. Markwald, *Cardiac morphogenesis and dysmorphogenesis I. Normal development*, in *Developmental Biology Protocols: Volume II*. 2000, Springer. p. 239-259.
134. Drenckhahn, D., *Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. Vol. 16. 2004. XII, 876 S.
135. Virágh, S. and C. Challice, *Origin and differentiation of cardiac muscle cells in the mouse*. Journal of ultrastructure research, 1973. **42**(1-2): p. 1-24.

136. Nesbitt, T., et al., *Epicardial development in the rat: a new perspective*. Microscopy and Microanalysis, 2006. **12**(05): p. 390-398.
137. Munoz-Chapuli, R., et al., *Development of the epicardium in the dogfish (Scyliorhinus canicula)*. Acta Zoologica, 1997. **78**(1): p. 39-46.
138. Komiyama, M., K. Ito, and Y. Shimada, *Origin and development of the epicardium in the mouse embryo*. Anatomy and embryology, 1987. **176**(2): p. 183-189.
139. Kuhn, H.-J. and G. Liebherr, *The early development of the epicardium in Tupaia belangeri*. Anatomy and Embryology, 1988. **177**(3): p. 225-234.
140. Manner, J., et al., *The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review*. Cells Tissues Organs, 2001. **169**(2): p. 89-103.
141. Lie-Venema, H., et al., *Origin, fate, and function of epicardium-derived cells (EPDCs) in normal and abnormal cardiac development*. ScientificWorldJournal, 2007. **7**: p. 1777-98.
142. Wessels, A. and J.M. Perez-Pomares, *The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells*. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2004. **276**(1): p. 43-57.
143. Tesseraux, H., *Über abnorme Pleurafalten*. Virchows Archiv, 1962. **335**(1): p. 101-108.
144. Gittenberger-de Groot, A.C. and R.E. Poelmann, *Cardiac morphogenesis*, in *Fetal Cardiology: Embryology, Genetics, Physiology, Echocardiographic Evaluation, Diagnosis and Perinatal Management of Cardiac Diseases*. 2008, CRC Press. p. 9-17.
145. Koo, C.W. and A. Newburg, *Congenital absence of the right pericardium: embryology and imaging*. Journal of clinical imaging science, 2015. **5**.
146. Peeters, M.-P.V., et al., *Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo*. Anatomy and embryology, 1995. **191**(6): p. 503-508.
147. von Gise, A., et al., *WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways*. Developmental biology, 2011. **356**(2): p. 421-431.
148. Perez-Pomares, J., et al., *Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos*. Developmental dynamics, 1997. **210**(2): p. 96-105.
149. Gittenberger-de Groot, A.C., et al., *Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions*. Circ Res, 1998. **82**(10): p. 1043-52.
150. Muñoz-Chápuli, R., et al., *Development of the subepicardial mesenchyme and the early cardiac vessels in the dogfish (Scyliorhinus canicula)*. Journal of Experimental Zoology, 1996. **275**(2-3): p. 95-111.
151. Marí, J., et al., *The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study*. Developmental biology, 1998. **200**(1): p. 57-68.
152. Dettman, R.W., et al., *Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart*. Developmental biology, 1998. **193**(2): p. 169-181.

153. Gittenberger-de Groot, A.C., et al., *Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions*. *Circulation research*, 1998. **82**(10): p. 1043-1052.
154. Perez-Pomares, J.M. and J.L. de la Pompa, *Signaling during epicardium and coronary vessel development*. *Circ Res*, 2011. **109**(12): p. 1429-42.
155. Kikuchi, K., et al., *tcf21+ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration*. *Development*, 2011. **138**(14): p. 2895-2902.
156. Cai, C.L., et al., *A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 104-8.
157. Zhou, B., et al., *Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 109-13.
158. Moore, A.W., et al., *YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis*. *Development*, 1999. **126**(9): p. 1845-1857.
159. Carmona, R., et al., *Immunolocalization of the transcription factor Slug in the developing avian heart*. *Anatomy and embryology*, 2000. **201**(2): p. 103-109.
160. Carmona, R., et al., *Localization of the Wilms' tumour protein WT1 in avian embryos*. *Cell and tissue research*, 2001. **303**(2): p. 173-186.
161. Perez-Pomares, J., et al., *Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs)*. *Developmental biology*, 2002. **247**(2): p. 307-326.
162. Kreidberg, J.A., et al., *WT-1 is required for early kidney development*. *Cell*, 1993. **74**(4): p. 679-691.
163. Tomanek, R.J., *Formation of the coronary vasculature during development*. *Angiogenesis*, 2005. **8**(3): p. 273-284.
164. Red-Horse, K., et al., *Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 549-553.
165. Reese, D.E., T. Mikawa, and D.M. Bader, *Development of the coronary vessel system*. *Circ Res*, 2002. **91**(9): p. 761-8.
166. Zhou, B., et al., *Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 109-113.
167. Cai, C.-L., et al., *A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells*. *Nature*, 2008. **454**(7200): p. 104-108.
168. Christoffels, V.M., et al., *Tbx18 and the fate of epicardial progenitors*. *Nature*, 2009. **458**(7240): p. E8-E9.
169. Winter, E.M. and A.C. Gittenberger-de Groot, *Cardiovascular development: towards biomedical applicability*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2007. **64**(6): p. 692-703.

170. Eid, H., et al., *Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture*. Circulation research, 1992. **71**(1): p. 40-50.
171. Merki, E., et al., *Epicardial retinoid X receptor α is required for myocardial growth and coronary artery formation*. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(51): p. 18455-18460.
172. Gittenberger-de Groot, A.C., et al., *Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation*. Circulation research, 2000. **87**(11): p. 969-971.
173. Eralp, I., et al., *Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart*. The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2006. **288**(12): p. 1272-1280.
174. Groot, A.C., E.M. Winter, and R.E. Poelmann, *Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia*. Journal of cellular and molecular medicine, 2010. **14**(5): p. 1056-1060.
175. Poss, K.D., L.G. Wilson, and M.T. Keating, *Heart regeneration in zebrafish*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2188-90.
176. Lepilina, A., et al., *A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration*. Cell, 2006. **127**(3): p. 607-619.
177. Kikuchi, K., et al., *Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration*. Developmental cell, 2011. **20**(3): p. 397-404.
178. Kikuchi, K., et al., *Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4+ cardiomyocytes*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 601-605.
179. Jopling, C., et al., *Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation*. Nature, 2010. **464**(7288): p. 606-609.
180. Ruiz-Villalba, A., et al., *Interacting resident epicardium-derived fibroblasts and recruited bone marrow cells form myocardial infarction scar*. J Am Coll Cardiol, 2015. **65**(19): p. 2057-66.
181. Zhou, B., et al., *Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors*. J Clin Invest, 2011. **121**(5): p. 1894-904.
182. Braitsch, C.M., et al., *Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2013. **65**: p. 108-119.
183. Wagner, K.-D., et al., *The Wilms' tumor suppressor Wt1 is expressed in the coronary vasculature after myocardial infarction1*. The FASEB journal, 2002. **16**(9): p. 1117-1119.
184. Hesse, J., et al., *CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction*. The FASEB Journal, 2017: p. fj.201601307R.
185. Fang, M., et al., *Epicardium-derived fibroblasts in heart development and disease*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2016. **91**: p. 23-27.

186. Limana, F., et al., *Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium*. Circ Res, 2007. **101**(12): p. 1255-65.
187. Wada, A.M., et al., *Epicardial/mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium*. Circulation research, 2003. **92**(5): p. 525-531.
188. Bollini, S., et al., *Re-activated adult epicardial progenitor cells are a heterogeneous population molecularly distinct from their embryonic counterparts*. Stem Cells Dev, 2014. **23**(15): p. 1719-30.
189. Ruiz-Villalba, A., et al., *Characterization of epicardial-derived cardiac interstitial cells: differentiation and mobilization of heart fibroblast progenitors*. PloS one, 2013. **8**(1): p. e52694.
190. Zhou, B., et al., *Nkx2-5-and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **375**(3): p. 450-453.
191. Smart, N., et al., *Thymosin β 4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization*. Nature, 2007. **445**(7124): p. 177-182.
192. Zhou, B., et al., *Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2012. **52**(1): p. 43-47.
193. Ding, Z., et al., *Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking*. Stem cells translational medicine, 2016: p. sctm. 2015-0159.
194. van Tuyn, J., 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**(2): p. 271-278.
195. Langendorff, O., *Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1897. **66**(7): p. 355-400.
196. Miltenyi, S., et al., *High gradient magnetic cell separation with MACS*. Cytometry, 1990. **11**(2): p. 231-238.
197. Gstraunthaler, G. and T. Lindl, *Zell-und Gewebekultur*. 2013, Springer.
198. Falasca, M., C. Raimondi, and T. Maffucci, *Boyden chamber*. Cell Migration: Developmental Methods and Protocols, 2011: p. 87-95.
199. CHEMICON International, I., *QCM™ 24-Well Fluorimetric Cell Migration Assay - Data Sheet*. 2004.
200. Wang, X., et al., *The Role of the Sca-1+/CD31- Cardiac Progenitor Cell Population in Postinfarction Left Ventricular Remodeling*. Stem cells, 2006. **24**(7): p. 1779-1788.
201. Smits, A.M., et al., *Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology*. Nature protocols, 2009. **4**(2): p. 232-243.
202. Rangappa, S., et al., *Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes*. The Annals of thoracic surgery, 2003. **75**(3): p. 775-779.

203. Melkounian, Z., et al., *Synthetic peptide-acrylate surfaces for long-term self-renewal and cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells*. *Nature biotechnology*, 2010. **28**(6): p. 606-610.
204. Smith, J., et al., *Identification of a potent Xenopus mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A*. *Nature*, 1990. **345**(6277): p. 729-731.
205. Nakajima, Y., et al., *Significance of bone morphogenetic protein-4 function in the initial myofibrillogenesis of chick cardiogenesis*. *Developmental biology*, 2002. **245**(2): p. 291-303.
206. Ladd, A.N., T.A. Yatskievych, and P.B. Antin, *Regulation of avian cardiac myogenesis by activin/TGF β and bone morphogenetic proteins*. *Developmental biology*, 1998. **204**(2): p. 407-419.
207. Barron, M., M. Gao, and J. Lough, *Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative*. *Dev Dyn*, 2000. **218**(2): p. 383-93.
208. Rosenblatt-Velin, N., et al., *FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes*. *The Journal of clinical investigation*, 2005. **115**(7): p. 1724-1733.
209. Gonzalez, R., J.W. Lee, and P.G. Schultz, *Stepwise chemically induced cardiomyocyte specification of human embryonic stem cells*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011. **50**(47): p. 11181-11185.
210. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method*. *methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
211. Laboratories, B.-R., *Real-Time PCR Applications Guide 2006*.
212. International, C., *QCM™ 24-Well Fluorimetric Cell Migration Assay - Data Sheet*. 2004.
213. Taylor, S.M. and P.A. Jones, *Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine*. *Journal of cellular physiology*, 1982. **111**(2): p. 187-194.
214. Liu, Y., et al., *Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation?* *Cardiovascular research*, 2003. **58**(2): p. 460-468.
215. Bonanno, G., et al., *Human cord blood CD133+ cells immunoselected by a clinical-grade apparatus differentiate in vitro into endothelial-and cardiomyocyte-like cells*. *Transfusion*, 2007. **47**(2): p. 280-289.
216. Goumans, M.-J., et al., *TGF- β 1 induces efficient differentiation of human cardiomyocyte progenitor cells into functional cardiomyocytes in vitro*. *Stem cell research*, 2008. **1**(2): p. 138-149.
217. Tzahor, E., *Wnt/beta-catenin signaling and cardiogenesis: timing does matter*. *Dev Cell*, 2007. **13**(1): p. 10-3.
218. Ueno, S., et al., *Biphasic role for Wnt/ β -catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(23): p. 9685-9690.

219. Zhou, B. and W.T. Pu, *Isolation and characterization of embryonic and adult epicardium and epicardium-derived cells*, in *Cardiovascular Development*. 2012, Springer. p. 155-168.
220. Risebro, C.A., et al., *Characterisation of the human embryonic and foetal epicardium during heart development*. *Development*, 2015. **142**(21): p. 3630-3636.
221. Franke, J., et al., *Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts*. *BMC veterinary research*, 2014. **10**(1): p. 1.
222. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 71-74.
223. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. *Experimental biology and medicine*, 2001. **226**(6): p. 507-520.
224. Mets, T. and G. Verdonk, *In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells*. *Mechanisms of ageing and development*, 1981. **16**(1): p. 81-89.
225. Galli, R., et al., *Neural stem cells an overview*. *Circulation research*, 2003. **92**(6): p. 598-608.
226. Armstrong, M.T., D.Y. Lee, and P.B. Armstrong, *Regulation of proliferation of the fetal myocardium*. *Developmental Dynamics*, 2000. **219**(2): p. 226-236.
227. Schmitz, S., *Der Experimentator: Zellkultur*. 2011: Springer-Verlag.
228. Colter, D.C., et al., *Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(7): p. 3213-3218.
229. Conget, P.A. and J.J. Minguell, *Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells*. *Journal of cellular physiology*, 1999. **181**(1): p. 67-73.
230. Stoker, M. and H. Rubin, *Density dependent inhibition of cell growth in culture*. 1967.
231. Holley, R.W. and J.A. Kiernan, *"Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1968. **60**(1): p. 300-304.
232. Yoon, P.D., R.L. Kao, and G.J. Magovern, *Myocardial regeneration. Transplanting satellite cells into damaged myocardium*. *Texas Heart Institute Journal*, 1995. **22**(2): p. 119.
233. Chiu, R.C.-J., A. Zibaitis, and R.L. Kao, *Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation*. *The Annals of Thoracic Surgery*, 1995. **60**(1): p. 12-18.
234. Marshall, J., *Transwell® invasion assays*. *Cell Migration: Developmental Methods and Protocols*, 2011: p. 97-110.
235. Chen, T.H.-P., et al., *Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor*. *Developmental biology*, 2002. **250**(1): p. 198-207.
236. Smart, N., et al., *Thymosin β -4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007. **1112**(1): p. 171-188.

237. Smart, N., et al., *Thymosin β 4 facilitates epicardial neovascularization of the injured adult heart*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1194**(1): p. 97-104.
238. Michel, A., M. Xing, and P. Humphrey, *Serum constituents can affect 2'-& 3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP potency at P2X7 receptors*. British journal of pharmacology, 2001. **132**(7): p. 1501-1508.
239. Bours, M., et al., *Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation*. Pharmacology & therapeutics, 2006. **112**(2): p. 358-404.
240. Fredholm, B.B., *Purines and neutrophil leukocytes*. General Pharmacology: The Vascular System, 1997. **28**(3): p. 345-350.
241. Borg, N., et al., *CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming*. Circulation, 2017. **136**(3): p. 297.
242. Boeynaems, J.-M. and D. Communi, *Modulation of inflammation by extracellular nucleotides*. Journal of Investigative Dermatology, 2006. **126**(5): p. 943-944.
243. Yegutkin, G.G., et al., *Altered purinergic signaling in cd73-deficient mice inhibits tumor progression*. European journal of immunology, 2011. **41**(5): p. 1231-1241.
244. Haag, F., et al., *Extracellular NAD and ATP: partners in immune cell modulation*. Purinergic signalling, 2007. **3**(1-2): p. 71-81.
245. Lévesque, S.A., et al., *NTPDase1 governs P2X7-dependent functions in murine macrophages*. European journal of immunology, 2010. **40**(5): p. 1473-1485.
246. Zheng, L.M., et al., *Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death*. The Journal of cell biology, 1991. **112**(2): p. 279-288.
247. Rubio, R. and R.M. Berne, *Release of adenosine by the normal myocardium in dogs and its relationship to the regulation of coronary resistance*. Circulation Research, 1969. **25**(4): p. 407-415.
248. Delyani, J.A. and D. Van Wylen, *Endocardial and epicardial interstitial purines and lactate during graded ischemia*. The American journal of physiology, 1994. **266**(3 Pt 2): p. H1019-26.
249. Driver, A.G., et al., *Pericardial fluid adenosine in ischemic and valvular heart disease*. Chest, 1995. **107**(2): p. 346-351.
250. Ely, S. and R. Berne, *Protective effects of adenosine in myocardial ischemia*. Circulation, 1992. **85**(3): p. 893-904.
251. Koszalka, P., et al., *Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response*. Circulation research, 2004. **95**(8): p. 814-821.
252. Bergmann, J.F. and SpringerLink (Online service), *90. Kongress gehalten zu Wiesbaden vom 29. April bis 3. Mai 1984*, in *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*,. p. 1 online resource.
253. Che, J., E.S. Chan, and B.N. Cronstein, *Adenosine A2A receptor occupancy stimulates collagen expression by hepatic stellate cells via pathways involving protein kinase A, Src*

- and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signaling cascade or p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. Molecular pharmacology, 2007. 72(6): p. 1626-1636.*
254. Chan, E., et al., *Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma. Arthritis & Rheumatism, 2006. 54(8): p. 2632-2642.*
255. McIntosh, V.J. and R.D. Lasley, *Adenosine Receptor-Mediated Cardioprotection Are All 4 Subtypes Required or Redundant? Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics, 2012. 17(1): p. 21-33.*
256. Headrick, J.P., et al., *Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. Pharmacology & therapeutics, 2013. 140(1): p. 92-111.*
257. Molkenstin, J.D., et al., *Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. Genes & development, 1997. 11(8): p. 1061-1072.*
258. Grepin, C., et al., *Inhibition of transcription factor GATA-4 expression blocks in vitro cardiac muscle differentiation. Molecular and cellular biology, 1995. 15(8): p. 4095-4102.*
259. Grépin, C., G. Nemer, and M. Nemer, *Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the GATA-4 transcription factor. Development, 1997. 124(12): p. 2387-2395.*
260. Serbedzija, G.N., J.-N. Chen, and M.C. Fishman, *Regulation in the heart field of zebrafish. Development, 1998. 125(6): p. 1095-1101.*
261. Cirillo, L.A., et al., *Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. Molecular cell, 2002. 9(2): p. 279-289.*
262. Moretti, A., et al., *Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. Cell, 2006. 127(6): p. 1151-65.*
263. Andersen, D.C., et al., *Murine "cardiospheres" are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential. Stem Cells, 2009. 27(7): p. 1571-1581.*
264. Claycomb, W.C. and M.C. Palazzo, *Culture of the terminally differentiated adult cardiac muscle cell: a light and scanning electron microscope study. Developmental biology, 1980. 80(2): p. 466-482.*
265. Konieczny, S.F. and C.P. Emerson, *5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. Cell, 1984. 38(3): p. 791-800.*
266. Chiu, C.-P. and H.M. Blau, *5-Azacytidine permits gene activation in a previously noninducible cell type. Cell, 1985. 40(2): p. 417-424.*
267. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. Cell, 1980. 20(1): p. 85-93.*
268. Taylor, S.M. and P.A. Jones, *Multiple new phenotypes induced in 10T12 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. Cell, 1979. 17(4): p. 771-779.*
269. Arai, A., K. Yamamoto, and J. Toyama, *Murine cardiac progenitor cells require visceral embryonic endoderm and primitive streak for terminal differentiation. Developmental Dynamics, 1997. 210(3): p. 344-353.*

270. Auda-Boucher, G., et al., *Staging of the commitment of murine cardiac cell progenitors*. *Developmental biology*, 2000. **225**(1): p. 214-225.
271. Garcia-Martinez, V. and G.C. Schoenwolf, *Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos*. *Developmental biology*, 1993. **159**(2): p. 706-719.
272. Sugi, Y. and J. Lough, *Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro*. *Developmental biology*, 1995. **168**(2): p. 567-574.
273. Schultheiss, T.M., J.B. Burch, and A.B. Lassar, *A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis*. *Genes Dev*, 1997. **11**(4): p. 451-62.
274. Nakamura, T. and M.D. Schneider, *The Way to a Human's Heart Is Through the Stomach Visceral Endoderm-Like Cells Drive Human Embryonic Stem Cells to a Cardiac Fate*. *Circulation*, 2003. **107**(21): p. 2638-2639.
275. David, R. and W.-M. Franz, *From pluripotency to distinct cardiomyocyte subtypes*. *Physiology*, 2012. **27**(3): p. 119-129.
276. Kruithof, B.P., et al., *BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage*. *Dev Biol*, 2006. **295**(2): p. 507-22.
277. Kawai, T., et al., *Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2*. *Circulation Journal*, 2004. **68**(7): p. 691-702.
278. Burridge, P.W., et al., *Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming*. *Cell stem cell*, 2012. **10**(1): p. 16-28.
279. Sa, S. and K.E. McCloskey, *Stage-specific cardiomyocyte differentiation method for H7 and H9 human embryonic stem cells*. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012. **8**(4): p. 1120-1128.
280. Kattman, S.J., et al., *Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines*. *Cell stem cell*, 2011. **8**(2): p. 228-240.
281. Schlueter, J., J. Männer, and T. Brand, *BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo*. *Developmental biology*, 2006. **295**(2): p. 546-558.
282. Vega-Hernández, M., et al., *FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium*. *Development*, 2011. **138**(15): p. 3331-3340.
283. Qian, L., et al., *In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes*. *Nature*, 2012. **485**(7400): p. 593-8.
284. Yazdanyar, M., *Regeneratives Potential von EPDC - Untersuchungen hinsichtlich der Transdifferenzierungskapazität in eine Kardiomyozyten-Zelllinie*. *Master's Thesis*. 2016.
285. Chase, L.G., et al., *A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells*. *Stem cell research & therapy*, 2010. **1**(1): p. 1.
286. Müller, I., et al., *Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM*. *Cytherapy*, 2006. **8**(5): p. 437-444.

287. Chase, L.G. and M.T. Firpo, *Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells*. *Current opinion in chemical biology*, 2007. **11**(4): p. 367-372.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Abbau von ATP im purinergen Signalsystem	4
Abbildung 1.2: Embryonale Herz- und Epikardentwicklung.....	11
Abbildung 1.3: Topographie epikardialer Zellen	12
Abbildung 1.4: WT-1-positive EPDC nach Myokardinfarkt einer adulten Ratte in vitro.....	15
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Prinzips der magnetischen Zellseparation.....	31
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Boyden-Kammer zur Untersuchung chemotaktischer Eigenschaften von EPDC.....	34
Abbildung 3.3: Plattenbelegung bei Inkubation mit 5-Azacytidin.....	36
Abbildung 3.4: Plattenbelegung bei Inkubation mit einzelnen bioaktiven Molekülen.....	37
Abbildung 3.5: Plattenbelegung bei Inkubation mit mehreren bioaktiven Molekülen	38
Abbildung 4.1: Morphologie von Ratten-EPDC nach myokardialer Infarzierung in Zellkultur.....	43
Abbildung 4.2: Kugelförmig-sphärenartige Zusammenballungen von EPDC.....	44
Abbildung 4.3: Mögliche „Myotubules“ in Form von langgestreckten EPDC	45
Abbildung 4.4: Populationsverdopplungszeit von EPDC aus infarzierten Rattenherzen	46
Abbildung 4.5: Wachstumskurve von EPDC aus infarzierten Rattenherzen	46
Abbildung 4.6: Chemotaktische Migration von EPDC im Boyden-Kammer-System	48
Abbildung 4.7: Standardkurve zur Korrelation von EPDC-Anzahl und RFU.....	48
Abbildung 4.8: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von Enzymen und Rezeptoren des purinergen Signalsystems in EPDC aus infarzierten Herzen und ihre Veränderung unter Kulturbedingungen.....	49
Abbildung 4.9: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Rattenherzen und ihre Veränderung unter Kulturbedingungen	51
Abbildung 4.10: Quantitative Analyse der mRNA-Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen und ihre Veränderung in Langzeitzellkultur.....	52
Abbildung 4.11: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen nach Inkubation mit 5-Azacytidin.....	53
Abbildung 4.12: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Herzen nach Stimulation mit verschiedenen bioaktiven Substanzen.....	55
Abbildung 4.13: Expression von kardialen Strukturproteinen und Transkriptionsfaktoren in EPDC aus infarzierten Rattenherzen nach Stimulation mit bioaktiven Substanzen bei gleichzeitiger oder serieller Applikation	56

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen.....	18
Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und Typenbezeichnung.....	19
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien und Antikörper mit Bezugsquellen.....	20
Tabelle 2.4: Kits und Assays mit Herstellerangaben.	22
Tabelle 2.5: Sequenzen der Haushaltsgene β -Actin und Tbp. Spalten von links nach rechts: Zielgen, Gensequenzen des Forward- (FW) und Reverse- (RV) Primer sowie der Sonde und Sondenlabel.	22
Tabelle 2.6: TaqMan® Gene Expression Assays für kardiale Marker.....	23
Tabelle 2.7: TaqMan® Gene Expression Assays für Rezeptoren und Enzyme des purinergen Systems.....	23
Tabelle 2.8: Zusammensetzungen von Lösungen und Puffern.	24
Tabelle 2.9: Kultur- und Differenzierungsmedien.....	25
Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme.	26
Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die reverse Transkription.	40
Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die qPCR.	41

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. med. Jürgen Schrader: Danke für die Möglichkeit, an einem spannendes Thema in einem tollen Team zu arbeiten. Danke für Ihre Unterstützung, Geduld und fachliche Leitung.

Prof. Dr. Dr. med. Christian Jung: Ich bedanke mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. rer. nat. Boris Greber: Ich bedanke mich für die Beratung bezüglich der Auswahl von Substanzen für die Induktionsversuche und der Überlassung von Aliquots zur Austestung.

Dr. rer. nat. Daniela Friebe: Tausend Dank für die wunderbare Betreuung, gute Stimmung, dein geduldiges Verständnis, Ermutigung und deine Zeit.

Dr. med. Zhaoping Ding: Danke für die Durchführung der Herzinfarkt-Operationen, deine Unterstützung bei Problemen und deine Ratschläge, die mir eine große Hilfe waren.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie: Danke für eine produktive, aber auch lustige gemeinsame Zeit im Labor; sie ist wie im Flug vergangen. Danke für eure Hilfsbereitschaft, eure fachlichen Anregungen und für gute Gespräche.

Helga und Rudolf Regnery, Philipp und Gerti Even: Danke für stützende Gespräche, Korrekturlesen und euren Rückhalt.