

# **Charakterisierung muriner kardialer Fibroblasten und epikardialer stromaler Zellen nach Herzinfarkt**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Christoph Owenier**

aus Wuppertal

Düsseldorf, Mai 2020

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

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

Erstgutachter: Jürgen Schrader  
Zweitgutachter: Jürgen Scheller

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2020

## Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt führt zur Aktivierung kardialer Fibroblasten (aCF) und induziert gleichzeitig die Bildung multipotenter epikardialer stromaler Zellen (EpiSC) an der Herzoberfläche. Beide Zellpopulationen tragen nach Infarkt entscheidend zum Wundheilungsgeschehen bei, sind aber aufgrund ihrer ähnlichen entwicklungsgeschichtlichen Herkunft experimentell nur schwer voneinander zu trennen. Für den Heilungsverlauf nach Infarkt ist unter anderem die Konzentration extrazellulärer Nukleotide und deren Abbauprodukte, insbesondere das Adenosin, von Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten aCF und EpiSC charakterisiert und hinsichtlich ihrer zellulären Heterogenität sowie ihres extrazellulären Purinstoffwechsels untersucht werden. Dazu wurde ein neues Protokoll für die simultane Isolation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherzen entwickelt. Dieses beruht auf dem enzymatischen Verdau isoliert perfundierter Herzen zur Gewinnung von aCF, bei gleichzeitiger Applikation milder Scherkräfte auf die Herzoberfläche zur Isolation der EpiSC. Die erfolgreiche Anreicherung der beiden Zellfraktionen wurde durch Überprüfung verschiedener Fibroblastenmarker, mesenchymaler Marker sowie epikardialer Marker mit Hilfe von Durchflusszytometrie, Immunfärbungen und qRT-PCR bestätigt. Kardiale Fibroblasten (CF) aus gesunden Herzen dienten als Kontrolle. Die methodischen Arbeiten bildeten die Grundlage für eine vergleichende Einzelzell-Transkriptomanalyse von CF, aCF und EpiSC. Dabei zeigte sich, dass die EpiSC-Population durch insgesamt 11 Zellcluster gekennzeichnet ist, in denen bekannte epikardiale Aktivierungsmarker (*Wt-1*, *Sema3d*, *Aldh1a2*, *Tbx-18*) sehr heterogen exprimiert wurden. Ein Teil der EpiSC-Population wies eine CF/aCF-ähnliche Gensignatur auf. Lineage tracing Versuche mit  $Wt1^{CreERT2}Rosa^{tdTomato}$  Tieren offenbarten jedoch, dass diese Cluster nicht durch  $Wt-1^+$ -Progenitorzellen gebildet werden. Dies weist auf die Existenz weiterer Zellpopulationen im Herzen hin, die zum EpiSC-Pool nach Infarkt beitragen. Genexpressionsanalysen in Kombination mit funktionellen Daten erlaubten zudem einen umfassenden Einblick in den extrazellulären Purinstoffwechsel. Auffallendes Charakteristikum der drei Zellpopulationen war die starke Expression von *Enpp1/3* und die damit verbundene Fähigkeit zum Abbau von ATP zu AMP, das allerdings nicht weiter zu Adenosin hydrolysiert wurde. Es ist denkbar, dass das generierte AMP nach Infarkt durch CD73 auf umliegenden Immunzellen hydrolysiert wird, wodurch sich anti-inflammatorisch/fibrotisch-wirkendes Adenosin bildet. Als weiteres Charakteristikum von CF, aCF und EpiSC stellte sich die Expression früher kardialer Gene heraus, die entscheidende Rolle bei der Kardiomyogenese spielen und somit kardiogenes Potential der Zellen vermuten lassen.

Das neu etablierte Isolationsprotokoll erlaubt die effiziente Separation von aCF und EpiSC und eignet sich dazu, das komplexe Zusammenspiel von Myokard und Epi-/Subepikard in den verschiedenen Wundheilungsphasen nach Infarkt zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit beschreibt das Ausmaß der zellulären Heterogenität von kardialen stromalen Zellen, schildert deren kardiogenes Potential und charakterisiert ihren extrazellulären Purinstoffwechsel. Die erhobenen Daten bilden eine Grundlage, das Infarktgeschehen besser zu verstehen und zukünftig neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

## Summary

Myocardial infarction (MI) leads to activation of cardiac fibroblasts (aCF) and induces the formation of multipotent epicardial stromal cells (EpiSC) at the heart surface. Both populations importantly participate in cardiac healing after MI, but are experimentally difficult to capture. The release of nucleotides and their extracellular conversion to adenosine play a tremendous role in tissue remodeling.

Thus, the present study aimed to characterize the aCF and EpiSC populations in detail and to study their cellular composition and extracellular purine metabolism. As part of this work, a fast and efficient protocol for the simultaneous isolation and characterization of aCF and EpiSC from the infarcted mouse heart was developed. For the isolation of aCF, infarcted hearts were digested by perfusion with a collagenase-solution for only 8 min, while EpiSC were enzymatically removed from the heart surface by applying a mild shear force. Cardiac fibroblasts (CF) isolated from unstressed hearts were used as a control. The successful cell-enrichment was confirmed by flow cytometry, immunostaining and qRT-PCR.

Combination of scRNAseq and RNA *in situ* hybridization revealed new insights into the cellular composition of EpiSC and demonstrated that the post-MI epi-/subepicardium represents a highly heterogeneous cell compartment. In total, 11 individual EpiSC subpopulations were identified, which showed distinct expression patterns of the well-established epicardial progenitor markers (*Wt-1*, *Tbx-18*, *Sema3d*, *Aldh1a2*). Note, that a subset of the EpiSC population exhibited a CF/aCF-like gene signature, which was not derived from *Wt-1*<sup>+</sup>-cells suggesting that the total EpiSC-pool post MI is derived from different cellular sources.

Gene expression analysis provided a comprehensive overview of the extracellular purine metabolism of CF, aCF and EpiSC. A main feature of the three stromal cell populations was the high expression of *Enpp1/3*, which was associated with the breakdown of ATP into AMP with only minor production of Adenosine. This supports the hypothesis that AMP generated by stromal cells may serve as a substrate for CD73 on immune cells to produce anti-inflammatory/-fibrotic adenosine. Intriguingly, qRT-PCR analysis exhibited the expression of cardiogenic genes (*Mef2c*, *Gata4*, *Tbx-5* und *Hand2*) in all three fractions, offering a new perspective to regenerative therapies.

The newly established isolation protocol is well-suited for the efficient separation of aCF and EpiSC and provides a great tool for further comparative studies on their physiology and their possible interplay during cardiac healing. In summary, the better understanding of the epicardial cellular constituents, the identified enrichment of cardiogenic genes and the comprehensive analysis of the purine metabolism of the cardiac stromal cell populations may unleash novel treatment options to improve cardiac repair in near future.

## Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in den nachfolgenden Publikationen veröffentlicht:

### **Novel technique for the simultaneous isolation of cardiac fibroblasts and epicardial stromal cells from the infarcted murine heart**

Publiziert in: Cardiovascular Research

Impact Faktor: 7,014

Eigenanteil an dieser Arbeit: 85%

Etablierung der Methodik

Durchflusszytometrische Analysen

qRT-PCR

Einordnung der Microarray Daten in den wissenschaftlichen Kontext

Zellkulturexperimente

Histologie und Immunfluoreszenzfärbungen

Quantifizierung der Fluoreszenzaufnahmen

Datenauswertung

Schreiben des Manuskripts

Erstellen der Abbildungen

Owenier, C., Hesse J., Alter C., Ding Z., Marzoq A., Petzsch P., Köhrer K., Schrader J., Novel technique for the simultaneous isolation of cardiac fibroblasts and epicardial stromal cells from the infarcted murine heart. Cardiovasc Res 116, 1047–1058 (2020).

## **Epicardial hierarchy of the adult heart at single-cell resolution**

Eingereicht in: Nature Communications

Impact Faktor: 11,880

Eigenanteil an dieser Arbeit: 40%

Zellisolation und Zellsortierung

Datenauswertung

Einordnung der Einzelzell-Daten in den wissenschaftlichen Kontext

Schreiben des Manuskripts

Hesse J.\*, Owenier C.\*, Lautwein T., Zalfen R., Weber J., Ding Z., Alter C., Lang A., Grandoch M., Gerdes N., Fischer J., Klau G., Dieterich C., Köhrer K., Schrader J., Epicardial hierarchy of the adult heart at single-cell resolution – eingereichtes Manuskript. (\* geteilte Erstautorenschaft)

## Abkürzungsverzeichnis

|               |   |
|---------------|---|
| Abb.          | Abbildung   |
| aCF           | <i>activated cardiac fibroblast</i>                           |
| ADA1          | Adenon-Deaminase 1  |
| Ado           | Adenosin  |
| ADK           | Adenosin-Kinase   |
| ADP           | Adenosindiphosphat  |
| Aldh1a2       | <i>aldehyde dehydrogenase 1 family member A2</i>              |
| AKT           | Proteinkinase B   |
| AMP           | Adenosinmonophosphat  |
| ALP           | Alkalische Phosphatase  |
| ATP           | Adenosin-Triphosphat  |
| AQP-1         | Aquaporin-1   |
| AZ            | Adenylatzyklase   |
| $\alpha$ -SMA | Alpha smooth muscle actin                                     |
| BST-1         | bone marrow stromal cell antigen 1                            |
| cADPR         | zyklische ADP-Ribose  |
| cAMP          | zyklisches Adenosinmonophosphat                               |
| CDK           | Cyclin-abhängige Kinase                                       |
| cDNA          | Komplementäre DNA   |
| C/EBP         | <i>CCAAT/Enhancer-Binding-Protein</i>                         |
| CEMIP         | <i>Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein</i> |
| CF            | <i>Cardiac fibroblast</i>                                     |
| CHAD          | Chondroadherin  |
| CNT           | Konzentrierte Nukleosidtransporter                            |
| CM            | <i>Cardiomyocyte</i>  |
| COL1A1        | Collagen 1 alpha 1  |
| COMP          | <i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>                    |
| cRNA          | Komplementäre RNA   |
| Ct            | <i>Cycle threshold</i>  |
| CTHRC1        | <i>Collagen triple helix repeat-containing protein 1</i>      |
| <i>Cxcl12</i> | <i>CXC-Motiv-Chemokin 12</i>                                  |
| Cx            | Connexin  |
| DAPI          | 4',6-Diamidin-2-phenylindol                                   |

|                     |   |
|---------------------|---|
| <i>Ddah1</i>        | <i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>      |
| DMEM                | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                              |
| DMKN                | Dermokin  |
| E                   | Embryonaler Tag   |
| EDTA                | Ethylendiamintetraessigsäure                                    |
| <i>Efnb2</i>        | <i>Ephrinb2</i>   |
| EKG                 | Elektrokardiogramm  |
| EMT                 | Epithelial-mesenchymale Transition                              |
| EndoMT              | Endothelial-mesenchymale Transition                             |
| ENPP                | Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase                |
| ENT                 | Äquilibriative Nukleosidtransporter                             |
| <i>Epha2</i>        | <i>Eph receptor A2</i>  |
| EpiSC               | <i>Epicardial stromal cells</i>                                 |
| EPDC                | <i>Epicardium-derived cells</i>                                 |
| EZM                 | Extrazelluläre Matrix   |
| FCS                 | <i>Fetal calf serum</i>   |
| FGF                 | <i>Fibroblast growth factor</i>                                 |
| Flow                | Durchflusszytometrie  |
| FMO                 | <i>Fluorescence minus one</i>                                   |
| <i>Fmod</i>         | <i>Fibromodulin</i>   |
| <i fn<="" i=""></i> | <i>Fibronectin</i>  |
| FRET                | Förster-Resonanzenergietransfer                                 |
| FSTL1               | <i>Follistatin-like 1</i>                                       |
| <i>Gsn</i>          | <i>Gelsolin</i>   |
| GOrilla             | <i>Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool</i> |
| HOX                 | Homöobox  |
| HX                  | Hypoxanthin   |
| HPLC                | Hochdruck Flüssigkeitschromatographie                           |
| IF                  | Immunfluoreszenz  |
| IgG                 | Immunglobulin G   |
| IPA                 | <i>Ingenuity-Pathway-Analysis</i>                               |
| IL                  | Interleukin   |
| ILK                 | Integrin-linked Protein Kinase                                  |
| Ino                 | Inosin  |



|                  |   |
|------------------|---|
| KRT              | Keratin   |
| Ktrl             | Kontrolle   |
| KO               | Knockout  |
| LAD              | <i>Left anterior descending artery</i>                                  |
| LOX              | Lysyloxidase  |
| LV               | Linker Ventrikel  |
| LCN2             | Lipocalin2  |
| M                | Molarität   |
| <i>Maf</i>       | <i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma</i>                                  |
| mg               | Milligramm  |
| MI               | Myokardinfarkt  |
| ml               | Milliliter  |
| mM               | Millimolar  |
| mm               | Millimeter  |
| MMP              | Matrix Metalloproteinase  |
| <i>Myrf</i>      | <i>Myelin regulatory factor</i>   |
| μM               | Micromolar  |
| NAD <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinukleotid  |
| <i>Nfe2l3</i>    | <i>Nuclear factor (erythroid 2)-like factor 3</i>                       |
| NF-κB            | <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> |
| NFQ              | Nicht-fluoreszierender Quencher   |
| NG-2             | Neuron-glia antigen 2   |
| NGS              | <i>Normal Goat Serum</i>  |
| NTPDasen         | Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen                               |
| OSM              | Oncostatin-M  |
| Panx             | Pannexin  |
| Pax3             | <i>Paired box gene 3</i>  |
| PBS              | <i>Phosphate Buffered Saline</i>  |
| <i>Pcsk6</i>     | <i>Proprotein Convertase Subtilisin / Kexin Type 6</i>                  |
| PDGF             | <i>Platelet-derived growth factor</i>                                   |
| PDGFRα           | <i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>                    |
| Pfa              | Paraformaldehyd   |
| PI3K             | Phosphoinositid-3-Kinase  |
| PNP              | Purin-Nukleosid-Phosphorylase   |

|              |  |
|--------------|--|
| POSTN        | Periostin  |
| q-RT PCR     | Quantitative Real-Time <i>Polymerase Chain Reaction</i>                      |
| <i>Rgs-5</i> | <i>Regulator of G-protein signaling 5</i>                                    |
| ROS          | Reaktive Sauerstoffspezies   |
| <i>Rplp0</i> | <i>60S saures ribosomales Protein P0</i>                                     |
| Rpm          | <i>Rounds per minute</i>   |
| <i>Runx1</i> | <i>Runt-related transcription factor 1</i>                                   |
| SCA-1        | <i>Stem-cell antigen 1</i>   |
| ScRNAseq     | Single-cell RNA sequencing   |
| <i>Sema</i>  | <i>Semaphorin</i>  |
| SLC          | <i>Solute carrier</i>  |
| SPARC        | Secreted protein acidic and rich in cysteine                                 |
| T            | Tag  |
| TAC          | <i>Transverse Aortic Constriction</i>  |
| Tbx          | <i>T-box-factor</i>  |
| Tcf-21       | <i>Transcription factor 21</i>   |
| Tie2         | <i>Tyrosin kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2</i>        |
| TGF- $\beta$ | <i>Transforming growth factor beta</i>                                       |
| TNAP         | <i>tissue-nonspecific alkaline phosphatase</i>                               |
| TNC          | Tenascin-C   |
| TNF          | <i>Tumor necrosis factor</i>   |
| TNI          | Troponin I   |
| TSP1         | Thrombospondin 1   |
| T $\beta$ 4  | Thymosin beta-4  |
| U            | Unit   |
| UMAP         | <i>Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction</i> |
| UMI          | <i>Unique Molecular Identifier</i>   |
| VEGF         | <i>Vascular endothelial growth factor</i>                                    |
| VIM          | Vimentin   |
| WB           | Western Blot   |
| WT1          | Wilms-Tumor-Protein 1  |
| %            | Prozent  |

## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Zusammenfassung .....   | I   |
| Summary .....   | II  |
| Publikationen.....  | III |
| Abkürzungsverzeichnis .....   | V   |
| Inhaltsverzeichnis.....   | IX  |
| Einleitung.....   | 1   |
| 1.1    Bildung von kardialen Fibroblasten während der Embryonalentwicklung des Herzens.....       | 1   |
| 1.2    Der Myokardinfarkt.....  | 2   |
| 1.2.1    Wundheilung nach Myokardinfarkt.....   | 3   |
| 1.3    Epikardaktivierung und Bildung epikardialer stromaler Zellen nach Myokardinfarkt .....     | 6   |
| 1.4    Ursprung und Heterogenität der aktivierten kardialen Fibroblasten nach Myokardinfarkt..... | 8   |
| 1.5    Techniken zur Isolation von CF/aCF und EpiSC .....   | 9   |
| 1.6    Regeneratives Potential von CF/aCF und EpiSC .....   | 10  |
| 1.7    Extrazellulärer Purinstoffwechsel .....  | 10  |
| 1.7.1    ATP Kanäle und die Freisetzung von Nukleotiden .....                                     | 11  |
| 1.7.2    Nukleotidrezeptoren (P2-Rezeptoren).....   | 12  |
| 1.7.3    Extrazellulärer Nukleotidabbau .....   | 13  |
| 1.7.4    Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren).....   | 14  |
| 1.7.5    Adenosin-Abbau und Aufnahme .....  | 16  |
| 1.8    Zielsetzung .....  | 17  |
| 2    Material .....   | 18  |
| 2.1    Geräte und Apparaturen .....   | 18  |
| 2.2    Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien .....  | 18  |
| 2.3    Puffer und Medien.....   | 19  |
| 2.4    Antikörper .....   | 19  |
| 2.5    Taqman Assays.....   | 20  |
| 2.6    Software.....  | 22  |
| 3    Methoden.....  | 23  |
| 3.1    Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....  | 23  |
| 3.1.1    Nicht transgene Versuchstiere .....  | 23  |
| 3.1.2    Globale CD39 Verlustmutante .....  | 23  |
| 3.1.3    Wt-1 <sup>CreERT2</sup> Rosa <sup>tdTomato</sup> Maus.....                               | 23  |
| 3.2    Induktion des Herzinfarkts (Ischämie-Reperfusion) .....                                    | 24  |
| 3.3    Zellisolation.....   | 24  |
| 3.3.1    Perfusions-Protokoll .....   | 24  |
| 3.3.2    Mincing-Protokoll .....  | 26  |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 3.4    | Durchflusszytometrie .....  | 26 |
| 3.4.1  | Durchflusszytometrische Messung.....  | 26 |
| 3.4.2  | Analyse und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten.....  | 27 |
| 3.5    | Zellsortierung .....  | 27 |
| 3.5.1  | Durchflusszytometrische Zellsortierung.....   | 27 |
| 3.5.2  | Magnetische Zellsortierung und Zellkultur .....   | 27 |
| 3.6    | Histologie .....  | 28 |
| 3.7    | Immunfluoreszenz .....  | 28 |
| 3.8    | Genexpressionsanalysen.....   | 29 |
| 3.8.1  | Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....   | 29 |
| 3.8.2  | Microarray-Analyse.....   | 32 |
| 3.8.3  | Einzelzell-Sequenzierung .....  | 33 |
| 3.9    | RNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....  | 35 |
| 3.10   | Western Blot.....   | 35 |
| 3.11   | Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC) .....  | 36 |
| 3.11.1 | Messung des ATP-Abbaus .....  | 37 |
| 3.11.2 | Messung der ATP-Freisetzung .....   | 37 |
| 3.12   | Statistische Auswertung .....   | 37 |
| 4      | Ergebnisse .....  | 38 |
| 4.1    | Etablierung einer neuen Methode zur simultanen Isolation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherzen ..... | 38 |
| 4.2    | Validierung der Methodik .....  | 39 |
| 4.3    | Zelluläre Zusammensetzung der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion .....   | 43 |
| 4.4    | Expression Fibrose-assoziiierter Gene, kardialer Gene und mesenchymaler Marker in CF, aCF und EpiSC.....          | 44 |
| 4.5    | Microarray Transkript Expressionsanalyse von CF, aCF und EpiSC .....  | 47 |
| 4.5.1  | Transkriptanalyse von EpiSC und aCF .....   | 48 |
| 4.5.2  | Validierung des Microarrays .....   | 50 |
| 4.5.3  | Proteinexpression ausgewählter Marker im Epi-/Subepikard infarzierter Herzen .....                                | 51 |
| 4.5.4  | Transkriptanalyse von aCF und CF .....  | 54 |
| 4.5.5  | Proteinexpression ausgewählter Marker im Myokard infarzierter Herzen.....   | 56 |
| 4.6    | Einzelzell-Sequenzierung zur Analyse der Zellheterogenität von aCF und EpiSC.....                                 | 57 |
| 4.6.1  | Heterogenität von EpiSC nach Infarkt.....   | 58 |
| 4.6.2  | Analyse transkriptioneller Ähnlichkeiten der EpiSC- und aCF-Cluster.....  | 65 |
| 4.6.3  | Lineage tracing <i>Wt-1</i> <sup>+</sup> -Zellen nach Infarkt.....  | 69 |
| 4.6.4  | Kombinierte Clusteranalyse von CF, aCF und EpiSC .....  | 70 |
| 4.7    | Analyse des Purinstoffwechsels in CF, aCF und EpiSC .....   | 72 |
| 4.7.1  | Genexpressionsanalyse des extrazellulären Purinstoffwechsels .....  | 72 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.7.2 | Extrazellulärer ATP-Abbau in kultivierten CF, aCF und EpiSC .....                        | 77  |
| 5     | Diskussion .....   | 80  |
| 5.1   | Methode zur simultanen Isolation von aCF und EpiSC .....                                 | 80  |
| 5.2   | Heterogenität kardialer stromaler Zellen nach Infarkt .....                              | 83  |
| 5.2.1 | Zelluläre Heterogenität des infarzierten Epi-/Subepikards.....                           | 83  |
| 5.2.2 | Zelluläre Heterogenität des infarzierten Myokards .....                                  | 85  |
| 5.3   | Expression kardialer Gene in CF/aCF und EpiSC.....                                       | 86  |
| 5.4   | Purinstoffwechsel kardialer stromaler Zellen vor (CF) und nach Infarkt (aCF, EpiSC)..... | 87  |
| 5.4.1 | Das purinerge Signalsystem kardialer Fibroblasten vor (CF) und nach Infarkt (aCF)..      | 88  |
| 5.4.2 | Das purinerge Signalsystem von aCF und EpiSC .....                                       | 89  |
| 5.5   | Ausblick.....  | 90  |
| 6     | Literaturverzeichnis.....  | 92  |
| 7     | Appendix .....   | 106 |
| 8     | Danksagung.....  | 109 |
| 9     | Eidesstattliche Erklärung.....   | 111 |

## Einleitung

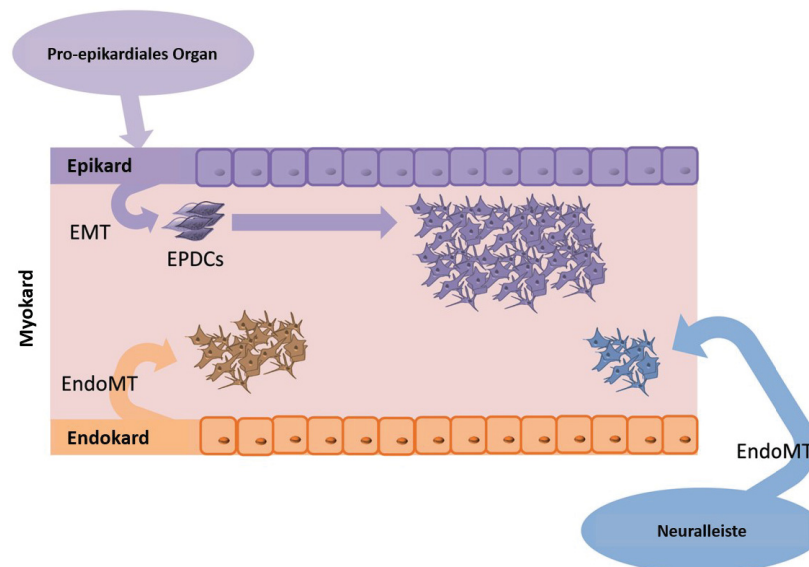
### 1.1 Bildung von kardialen Fibroblasten während der Embryonalentwicklung des Herzens

Das Herz ist eines der ersten Organe, das während der Embryogenese seine Pumpfunktion aufnimmt, um den Embryo mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. In der Maus beginnt die Herzentwicklung während der Gastrulation am embryonalen Tag (E) 6.5<sup>1</sup>. Während das embryonale Herz zunächst nur einen primitiven Schlauch darstellt, der sich aus dem ersten und zweiten Herzfeld entwickelt<sup>1</sup>, teilt sich das reife Herz in vier durch Herzklappen separierte Kammern auf<sup>2</sup>.

Auf zellulärer Ebene setzt sich das ausdifferenzierte Herz aus Kardiomyozyten (CM), kardialen Fibroblasten (*cardiac fibroblasts*, CF), Endothelzellen sowie einer kleinen Zahl an Immunzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen zusammen<sup>2</sup>. Teilweise bilden sich diese Zellen aus extrakardialen Zellpopulationen wie dem Proepikard, dessen Zellen während der Embryogenese in CF<sup>3</sup>, Endothelzellen<sup>4</sup> sowie glatte Muskelzellen<sup>5</sup> differenzieren. Neben dem Proepikard tragen auch Zellen des Endokards sowie der Neuralleiste zu der CF-Population des Herzens bei<sup>6</sup>. Der Großteil der CF wird dabei aus epikardialen Strukturen gebildet. Moore-Morris et al. zeigte, dass etwa 80% aller *Collagen 1 alpha 1* (Col1a1) - positiven CF im Myokard von epikardialen *Wilms-Tumor-Protein 1* (Wt-1) - positiven Zellen abstammen, während sich nur etwa 15% aus *Tyrosin kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2* (Tie2) - positiven Zellen des Endokards herleiten<sup>7</sup>. Ali et al. bestätigte diese Ergebnisse und zeigte, dass sich darüber hinaus auch ein kleiner Teil der CF aus *Paired box gene 3* (Pax3) - positiven Zellen der Neuralleiste bildet<sup>8</sup>. An Tag E9.5 beginnen Progenitorzellen des Proepikards mit der Migration zum primitiven Herzen und umspannen dessen Oberfläche vom Apex beginnend, um somit das Epikard auszubilden<sup>9</sup>. Daraufhin durchlaufen einige Zellen des Epikards eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), bei dem sich Epithelzellen des Epikards zu mesenchymalen Vorläuferzellen, den sogenannten *epicardium derived cells* (EPDC), differenzieren. EPDC migrieren daraufhin in das Myokard und differenzieren dort zu adventitialen und interstitiellen CF sowie Endothel und glatten Muskelzellen<sup>4,9,10</sup>. Die zuvor erläuterten Prozesse sind schematisch in Abb. 1 illustriert.

In der Literatur sind verschiedene Transkriptionsfaktoren beschrieben, die als proepikardiale Markergene gelten. Dazu gehören unter anderem Wt-1<sup>11</sup>, *T-box-factor 18* (Tbx-18)<sup>11,12</sup>, sowie *transcription factor 21* (Tcf-21)<sup>13</sup>. Wt-1 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung mesothelialer Gewebe sowie beim EMT-Prozess<sup>14,15</sup>. Eine genetische Deletion von Wt-1 resultiert im Mausmodell in einer reduzierten Expression von  $\alpha$ -4-Integrin im Herzen, wodurch die Adhäsion von Myokard- und Epikard-Zellen beeinträchtigt wird<sup>16</sup>. Darüber hinaus weisen Wt-1-Verlustmutanten ein verdünntes Myokard auf und sterben zwischen Tag E12-14<sup>17</sup>. Neben Wt-1 spielt auch Tcf-21 eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von epikardialen Zellen zu CF. Die Epikardzellen Tcf-21-defizienter Mäuse durchlaufen keinen EMT Prozess, wodurch CF epikardialen Ursprungs nicht mehr gebildet werden<sup>18</sup>.

Auch für Tbx-18 defiziente Mausmutanten werden in der Literatur strukturelle und funktionelle Defekte des Epikards beschrieben. Darüber hinaus ist in den transgenen Tiere die embryonale Gefäßbildung gestört<sup>19</sup>.



**Abbildung 1: Embryonale Entwicklung kardialer Fibroblasten (CF).** Während der Herzentwicklung bilden sich CF aus drei verschiedenen Progenitorzellpopulationen. Der Großteil an CF (80-85%) wird von Zellen des Epikards durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) gebildet. Der Rest der CF-Population wird von Zellen des Endokards und der Neuralleiste gebildet, die eine endothelial-mesenchymale Transition (EndoMT) durchlaufen. Die schematische Abb. wurde nach Doppler et al.<sup>6</sup> modifiziert.

## 1.2 Der Myokardinfarkt

Das adulte Herz transportiert durch rhythmische Kontraktion kontinuierlich Blut durch den Körper, um ihn mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Um diese enorme Leistung aufrecht zu erhalten, muss das Myokard selbst mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden. Die Bereitstellung verläuft dabei durch die über der Aortenklappe entspringenden Koronararterien, welche sich über das Herz kranzartig verteilen und sich in die Peripherie weiter verzweigen<sup>2</sup>.

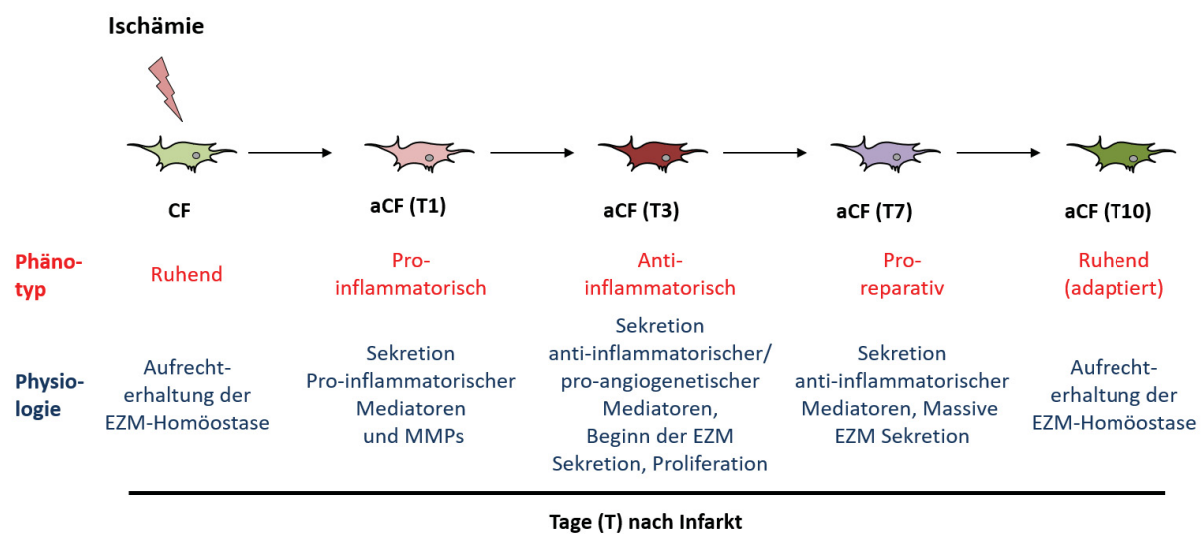
Kommt es durch einen Thrombus zur Okklusion einer Koronararterie, wird das nachgeschaltete Herzareal nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt und eine Ischämie ist die Folge. Bleibt die Okklusion über einen längeren Zeitraum bestehen, kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels zum Zelltod von Kardiomyozyten und somit zum Myokardinfarkt<sup>20</sup>. Die Therapie der Wahl zur Reduktion der Gewebsschädigung nach akutem Myokardinfarkt stellt die Reperfusion des betroffenen Koronargefäßes durch perkutane transluminale Koronarangioplastie dar<sup>21</sup>. Durch frühzeitige Wiedereröffnung des Gefäßes wird das ischämische Gebiet erneut mit Sauerstoff versorgt, wodurch die Größe des Infarkts reduziert wird<sup>22,23</sup>. Die Reperfusion selbst induziert jedoch zunächst weitere Gewebsschädigungen im Herzen (Reperfusionsschaden), da die schlagartige Reoxygenierung

zahlreiche zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen, in Gang setzt, die zur Zellschädigung beitragen und die Apoptose einleiten<sup>23</sup>.

Ischämische Herzkrankheiten stellen die häufigste Todesursache weltweit dar<sup>24</sup>. Trotz erheblicher Fortschritte bei der Behandlung des akuten Myokardinfarkts steigt durch den Verlust von kontraktilem Herzgewebe langfristig das Mortalitätsrisiko des Patienten durch Ausbildung einer Herzinsuffizienz<sup>25</sup>. Die Tragweite der funktionellen Einschränkung wird dabei maßgeblich durch die Größe des Infarkts sowie die Wundheilung des Herzens bestimmt<sup>26,27</sup>.

### 1.2.1 Wundheilung nach Myokardinfarkt

Nach Myokardinfarkt kann zwischen drei Phasen der Wundheilung unterschieden werden. Dazu zählt die durch Kardiomyozytenschädigung eintretende Entzündungsreaktion, die Proliferationsphase sowie die abschließende Narbenreifung<sup>28</sup>. CF bzw. aktivierte kardiale Fibroblasten (*activated cardiac fibroblasts*, aCF) spielen in allen drei Phasen eine entscheidende Rolle und durchlaufen während des dynamischen Prozesses der Wundheilung phänotypische Veränderungen<sup>29</sup>. Abb. 2 illustriert die phänotypischen Änderungen der CF in Folge eines Myokardinfarkts.



**Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Differenzierung von kardialen Fibroblasten (CF) nach Myokardinfarkt.** Unter basalen Bedingungen sind CF an der Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix-Homöostase beteiligt und liegen als ruhender Phänotyp vor. In Folge der Ischämie werden CF aktiviert (aCF) und beginnen mit der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren sowie von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Tag 1 (T1)). Ab Tag 3 (T3) schütten aCF anti-inflammatorische sowie pro-angiogenetische Faktoren aus, proliferieren und beginnen mit der Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen (EZM). Etwa an Tag 7 (T7) setzt die pro-reparative Phase ein in der Massiv EZM-Proteine sekretiert werden. Ab Tag 10 (T10) kommt die Proliferation zum Erliegen und aCF sind wieder an der Aufrechterhaltung der EZM-Homöostase beteiligt, jedoch nun an die neue Umgebung adaptiert. Die Abb. wurde nach Ma et al.<sup>29</sup> modifiziert.



### 1.2.1.1 Kardiomyozytenschädigung und Entzündungsreaktion

Die Okklusion einer Koronararterie resultiert in einer Sauerstoff - Unterversorgung der Zellen, wodurch die oxidative Phosphorylierung zum Erliegen kommt und nicht mehr ausreichend ATP für den Energiestoffwechsel der Zelle gebildet werden kann<sup>30</sup>. Die Abnahme der intrazellulären ATP-Konzentration stimuliert die anaerobe Glykolyse, welche die aerobe ATP-Gewinnung jedoch nicht kompensieren kann<sup>31</sup>. Die verminderte Energieversorgung und die Anhäufung anaerober Stoffwechselprodukte führen zur Änderung des intrazellulären Ionenhaushaltes und der Ausbildung einer Gewebsazidose, welche schließlich zum Zelltod führen<sup>32</sup>. Durch Reperfusion des Gefäßes kann das ischämische Gewebe wieder mit dem für die ATP-Bildung benötigten Sauerstoff versorgt werden, wodurch ein Schaden reduziert werden kann<sup>33</sup>. Gleichzeitig induziert die Reperfusion jedoch zunächst aufgrund der sprunghaften Änderung des pH-Wertes<sup>34</sup>, der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)<sup>35</sup>, sowie der Schädigung der Mitochondrien-Membran<sup>36</sup> einen zusätzlichen Gewebsschaden<sup>37</sup>. In den ersten 24 Stunden nach Infarkt sterben die Zellen im betroffenen Areal hauptsächlich durch Nekrose, während die Zellen in den darauffolgenden Tagen durch Apoptose untergehen<sup>38</sup>. Nekrotische sowie apoptotische Zellen schütten intrazelluläre Gefahrensignale, die sogenannten *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) aus, die eine sterile Entzündungsreaktion auslösen<sup>39,40</sup>. Die Entzündung wird durch eine Reihe komplexer, sich teilweise überlappender Signalwege eingeleitet<sup>41</sup>.

Eine wesentliche Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen CF, die in Folge der Ischämie aktiviert werden (aCF) und während der ersten drei Tage pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine sezernieren, die als Signalstoffe für Immunzellen dienen<sup>29</sup>. Faktoren, die einen pro-inflammatorischen Phänotypen der aCF induzieren, sind vielfältig und noch nicht vollständig verstanden<sup>42</sup>. Zu diesen zählen unter anderem die von umliegenden Zellen ausgeschütteten Cytokine wie beispielsweise Interleukin (IL) -1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF) - $\alpha$  oder Oncostatin-M (OSM)<sup>29,42</sup>. *In vitro* Experimente zeigen, dass die Stimulation von humanen aCF mit TNF- $\alpha$  zur Produktion der pro-inflammatorischen Cytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6 führt<sup>43</sup>. Ein Stimulus mit IL-1 $\alpha$  induziert ebenfalls die Expression von pro-inflammatorischer Cytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , CXCL1 sowie CXCL2<sup>44</sup>. Ähnliche Einflüsse werden auch durch IL-1 $\beta$  in aCF vermittelt<sup>45</sup>, das darüber hinaus auch vorübergehend die Zellproliferation durch modulatorische Wirkung auf Cyclin und Cyclin-abhängige Kinasen hemmt<sup>46</sup>.

Neben Cytokinen sind auch extrazelluläre Matrixfragmente an der Entstehung eines pro-inflammatorischen Phänotyps beteiligt. Diese führen durch Bindung an Toll-like-Rezeptoren zur Expression des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), welcher wiederum die Expression von Chemokinen und Cytokinen fördert<sup>47</sup>. Darüber hinaus wird durch die Anwesenheit von DAMPS das Inflammasom in aCF aktiviert, wodurch Caspasen pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  spalten<sup>48</sup>. Zu den DAMPs gehört unter anderem ATP, das auch durch direkte Bindung an ATP-Rezeptoren (P2-Rezeptoren) die Sekretion von Cytokinen einleiten kann<sup>49</sup>. Ein weiterer pro-inflammatorischer Stimulus stellen auch die durch Hypoxie entstehenden, reaktiven Sauerstoffspezies

(ROS) dar, welche ebenfalls die Aktivierung des Inflammasoms induzieren<sup>42</sup>. An der Initiation der Entzündungsreaktion sind neben aCF auch Endothelzellen<sup>50</sup> und Mastzellen<sup>51</sup> beteiligt.

Durch die massive Ausschüttung von Cytokinen und Chemokinen werden Immunzellen aus dem Blutstrom in das infarzierte Herzareal rekrutiert, die ihrerseits die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und modulieren<sup>42</sup>. Die ersten Immunzellen, die in das Gewebe einwandern, sind neutrophile Granulozyten, welche tote Zellen und Zelldebris phagozytieren, proteolytische Enzyme zur Beseitigung von Matrixbestandteilen ausschütten sowie weitere chemotaktische Proteine sezernieren<sup>52</sup>. Danach akkumulieren Monozyten und Makrophagen in zwei aufeinanderfolgenden Wellen<sup>53</sup>. Die erste Welle bilden pro-inflammatorische Ly6C<sup>hi</sup>-Monozyten und M1-Makrophagen, die pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-6 und Tnf- $\alpha$  ausschütten<sup>54</sup>. Die zweite Welle bilden reparative Ly6c<sup>low</sup>-Monozyten sowie M2-Makrophagen, die durch Ausschüttung von anti-inflammatorischen Mediatoren sowie Wachstumsfaktoren die Entzündungsreaktion hemmen und die proliferative Phase einleiten<sup>52,55</sup>. Darüber hinaus infiltrieren auch T-Lymphozyten das Gewebe, die etwa eine Woche nach Infarkt ihren Höhepunkt erreichen<sup>56</sup> und ebenfalls anti-inflammatorische Signale vermitteln<sup>57</sup>.

### 1.2.1.2 Proliferationsphase

Die Proliferationsphase zeichnet sich durch die Bildung eines stark vaskularisierten Granulationsgewebes aus, welches aCF, Endothelzellen, Makrophagen sowie neu synthetisierte EZM-Moleküle enthält<sup>52</sup>. Charakteristisch für diese Phase ist die starke Proliferation von aCF und Endothelzellen, wodurch fibrotische Prozesse und die Angiogenese gefördert werden<sup>58</sup>. Den dominierenden Zelltyp im Granulationsgewebe stellen aCF dar, welche zur Grenzregion des Infarktareals migrieren und dieses schließlich infiltrieren. Dieser Prozess ist spezieübergreifend in Modellen von Kaninchen<sup>59</sup>, Ratte<sup>60</sup>, Maus<sup>61</sup> und darüber hinaus auch für den Menschen beschrieben<sup>62</sup>. Proliferierende aCF zeichnen sich durch die Expression des kontraktiven Proteins  *$\alpha$ -smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) aus, das sie zur Kontraktion befähigt<sup>63</sup>. Gleichzeitig beginnen sie mit der Sekretion zahlreicher EZM-Moleküle wie Periostin (POSTN), Tenascin-C (TNC), COL1A1 oder COL3A1, wodurch das Infarktareal zunehmend umstrukturiert und stabilisiert wird<sup>64</sup>. Für die Stabilität ist insbesondere das Kollagen von Bedeutung, von dem in frühen Phasen insbesondere COL3A1 gebildet wird, das zunächst ein lockeres elastisches Netzwerk bildet<sup>60</sup>. Zu späteren Zeitpunkten wird es durch dicht-gepacktes, mechanisch stabileres und wenig elastischeres COL1A1 ersetzt<sup>60</sup>.

Wie die Proliferation der aCF im Detail reguliert wird und welche Signalwege daran beteiligt sind, ist noch nicht vollständig aufgeklärt<sup>42</sup>. Man geht jedoch davon aus, dass das Zusammenspiel abnehmender pro-inflammatorischer Signale und die gleichzeitige Zunahme von ausgeschütteten Wachstumsfaktoren die Proliferation der Zellen einleitet<sup>42</sup>. Einer der wesentlichen Regulatoren für die Transdifferenzierung von aCF zu einem proliferativen, matrixproduzierenden Phänotypen stellt *Transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) dar<sup>29</sup>. Neben TGF- $\beta$  fördern aber auch *Fibroblast growth factor* (FGF)<sup>65</sup>, Angiotensin II

oder *Platelet derived growth factor* (PDGF) die aCF Proliferation<sup>66,67</sup>. TGF- $\beta$  kann entweder über den SMAD - abhängigen oder den SMAD - unabhängigen Signalweg die Transkription involvierter Gene vermitteln<sup>68,69</sup>. Weitere, die Proliferation fördernde Signalwege stellen der durch Endothelin-1 aktivierte PI3K / AKT - Signalweg<sup>70</sup> sowie die durch FGF-2 induzierten p38 MAPK- und der Protein Kinase C $\delta$ -Signalwege dar<sup>71</sup>. Neben aCF ist auch die Proliferation der Endothelzellen von großer Bedeutung für den Wundheilungsprozess. Diese wird jedoch größtenteils über Wachstumsfaktoren aus der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) - Familie und zahlreiche Mitglieder der FGF - Familie vermittelt<sup>72,73</sup>.

### 1.2.1.3 Narbenreifung

Die Bildung einer Kollagen-reichen Matrix beendet die proliferative Phase und leitet die Reifephase ein<sup>42</sup>. Während dieser Phase gehen Immunzellen sowie ein Teil der Endothelzellen und aCF in Apoptose über, wodurch sich die Zellzahl im Infarktareal wieder reduziert<sup>74</sup>. Gleichzeitig steigt die Aktivität von Enzymen, welche die Quervernetzung von EZM Molekülen induzieren. Dazu zählt unter anderem die Lysyloxidase (LOX), die fibrilläres Kollagen quervernetzt und zur Bildung des kompakten, dicht gepackten Narbengewebes beiträgt<sup>75</sup>. Durch den Umbau des Gewebes nimmt die Steifigkeit des Ventrikels zu, was eine Einschränkung der Pumpfunktion zur Folge hat<sup>76</sup>. Fu et al. beschreibt, dass die proliferative Kapazität der aCF etwa 7-10 Tage nach Infarkt zum Erliegen kommt und bezeichnet die im Infarktareal verbleibenden aCF als sogenannte Matrifibrozyten<sup>77</sup>. Diese sind besser an die neue Umgebung adaptiert, exprimieren ein außergewöhnliches Muster an Matrixmolekülen (*cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), *chondroadherin* (CHAD) und sind insgesamt unempfindlicher gegenüber proliferativer Stimuli<sup>77</sup>.

Welche Signale über das Zellschicksal der aCF nach der Proliferationsphase entscheiden, ist bislang nicht bekannt<sup>42</sup>. Es wird jedoch angenommen, dass die abnehmende Sekretion von Wachstumsfaktoren sowie der Abbau matrizellulärer Proteine eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung dieser Prozesse spielen<sup>78</sup>. Darüber hinaus wird vermutet, dass der erneute Übergang zum ruhenden Phänotypen nach Infarkt auch über aktive STOP-Signale vermittelt wird. Hierzu zählt z.B. die negative Regulation des TGF- $\beta$  Signalwegs, der durch Phosphatasen, die Expression von Pseudorezeptoren sowie die Aktivierung inhibitorischer SMAD Moleküle, gehemmt wird<sup>42</sup>.

## 1.3 Epikardaktivierung und Bildung epikardialer stromaler Zellen nach Myokardinfarkt

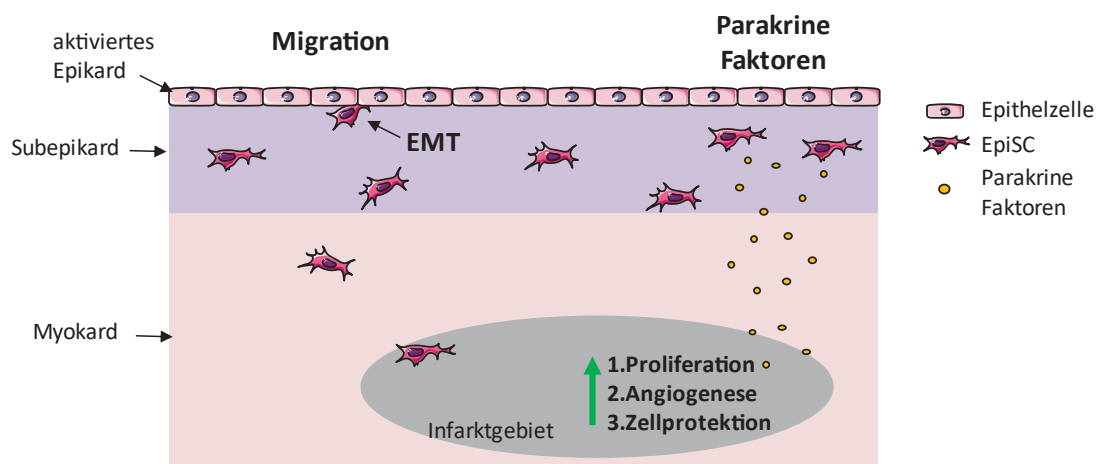
Das Epikard eines nicht-ischämischen Herzens besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel, welches das Myokard vollständig umspannt und das Herz vom Perikard abgrenzt<sup>79</sup>. In Folge eines Infarkts werden neben den aCF des Myokards auch Zellen des Epikards aktiviert. Letztere rekapitulieren ein embryonales Programm, das durch die Expression embryonaler, epikardialer Gene wie *Wt-1*, *Tbx-18*, und *Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A2* (*Aldh1a2*) gekennzeichnet ist. Die Expression dieser

Gene erreicht ihren Höhepunkt an Tag 5 nach Infarkt und nimmt zu späteren Zeitpunkten wieder ab<sup>80,81</sup>. Die genauen Mechanismen, die zur Aktivierung des Epikards beitragen, sind nicht im Detail geklärt. Eine Rolle spielen dabei höchstwahrscheinlich spezifische Faktoren, die durch die Ischämie in die Perikardflüssigkeit ausgeschüttet werden<sup>82</sup>. Eine regulative Funktion wird dabei dem Transkriptionsfaktor *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP) zugeschrieben, der in Kombination mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren (HOX, MEIS, *Grainyhead transcription factors*) die Expression embryonaler Gene fördert<sup>83</sup>. Laut Literatur kommt es nach Infarkt bei vollständiger Ligatur der LAD (*left anterior descending artery*) zunächst zum Untergang der unmittelbar über dem Infarkt liegenden Epikardschicht, die innerhalb von drei Tagen aus dem verbliebenen epikardialen Gewebe regeneriert wird<sup>80</sup>. Nach Aktivierung durchlaufen Zellen des Epikards den EMT-Prozess und exprimieren spezifische Marker wie SMAD1, SNAIL, SLUG und TWIST<sup>84</sup>. Durch EMT werden schließlich Zellen mit mesenchymalem Charakter gebildet, die als adulte EPDC bezeichnet werden<sup>84</sup>. Diese Zellen proliferieren massiv nach Infarkt, wodurch es zu einer Verdickung der unter dem Epikard befindlichen subepikardialen Schicht kommt<sup>80,81</sup>.

Die neu gebildeten Zellen epikardialer Abstammung weisen starke Unterschiede hinsichtlich ihrer Markerexpression auf und werden deshalb als heterogene Population beschrieben<sup>82,85</sup>. Bollini et al. konnten über durchflusszytometrische Analysen insgesamt drei EPDC-Subpopulationen identifizieren, welche sich hinsichtlich der Expression von CD90.2, SCA-1 und CD44 stark unterschieden<sup>85</sup>. Temme et al. beschreiben darüber hinaus die Expression kardialer Gene (*Gata4* und *Nkx2.5*) und wiesen das Protein Phosphokreatin in EPDC nach, welches ein energiereiches Metabolit des Kardiomyozytenstoffwechsels darstellt<sup>86</sup>. Aufgrund der hohen Heterogenität der Fraktion wird im Folgenden kollektiv von epikardialen stromalen Zellen (*epicardial stromal cells*, EpiSC) gesprochen, unter denen alle stromalen Zellen des Epi-/Subepikards zusammengefasst werden.

Adulte EpiSC besitzen das Potential, sich in andere Zelltypen wie CF/aCF sowie glatte Muskelzellen zu differenzieren<sup>84</sup>. Durch *Priming* mit Thymosin beta-4 (Tβ4) konnte zudem eine Differenzierung in Kardiomyozyten beobachtet werden<sup>87</sup>. Inwiefern Zellen der EpiSC-Population jedoch aktiv in das infarzierte Areal migrieren und dort zur Regeneration beitragen, wurde in der Vergangenheit kontrovers diskutiert. Während manche Studien von einer Migration der EpiSC in das infarzierte Areal berichten<sup>80,87</sup>, zeigen aktuellere Lineage tracing Studien, dass der Beitrag adulter EpiSC nur sehr gering ist<sup>81,84</sup>. Aus diesem Grund geht man derzeit davon aus, dass die Rolle der Zellen hinsichtlich ihres regenerativen Potentials beschränkt ist. Vielmehr werden EpiSC als Quelle parakriner Faktoren angesehen, die modulatorisch auf das Infarktgeschehen wirken können<sup>81,88</sup>. So ist nach Infarkt eine Vaskularisierung in der verdickten Epi-/Subepikardschicht zu erkennen, die auf die Ausschüttung pro-angiogenetischer Faktoren zurück zu führen ist<sup>81,89</sup>. Zahlreiche Studien belegen die parakrinen Eigenschaften der EpiSC: In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Kokultivierung von EpiSC und neonatalen Kardiomyozyten zur vermehrten Proliferation der Kardiomyozyten führte<sup>90</sup>. In

einem *in vivo* Modell wurde darüber hinaus durch Injektion von konditioniertem EpiSC-Medium in das Infarktareal, eine Erhöhung der Gefäßdichte und eine Reduktion der ventrikulären Remodelierung erzielt<sup>81</sup>. Eine verbesserte Herzfunktion nach Infarkt konnte ebenfalls durch eine direkte Injektion der Zellen in das Infarktareal erreicht werden<sup>91</sup>. Ein wichtiger parakriner Faktor ist dabei das in EpiSC angereicherte *Follistatin-like 1* (FSTL1), dessen Applikation nach Infarkt die Proliferation von Kardiomyozyten anregt und somit die Herzfunktion verbessert<sup>92</sup>. Ein weiterer Faktor mit ähnlicher Funktion stellt epikardiales Clusterin dar, welches protektiv auf Kardiomyozyten wirkt und im Tiermodell nach Injektion in die Perikardflüssigkeit zu einer verbesserten Herzfunktion führte<sup>93</sup>. Abb. 3 zeigt die möglichen Beiträge, die EpiSC nach Infarkt am Wundheilungsgeschehen leisten können.



**Abbildung 3: Mögliche Beiträge der adulten epikardialen stromalen Zellen (EpiSC) zum Wundheilungsprozess nach Infarkt.** Aktivierte Epikardzellen durchlaufen den EMT-Prozess und bilden EpiSC. Diese können im geringen Maße in das Infarktgebiet migrieren und zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen differenzieren. Darüber hinaus können EpiSC parakrine Faktoren sezernieren, die zur Heilung nach Infarkt beitragen, indem sie die Zellproliferation und Angiogenese stimulieren sowie protektiv auf Kardiomyozyten wirken. Die Abb. wurde nach Smits et al.<sup>82</sup> modifiziert.

#### 1.4 Ursprung und Heterogenität der aktivierten kardialen Fibroblasten nach Myokardinfarkt

Obwohl bereits früh davon berichtet wurde, dass Fibroblasten sich hinsichtlich ihrer Proteinexpression, der Zellgröße, dem Proliferationsverhalten sowie ihrer entwicklungsgeschichtlichen Herkunft unterscheiden<sup>94-98</sup>, wurde die Bezeichnung „Fibroblast“ lange Zeit als Sammelbegriff für alle in den Interstitialräumen ansässigen Zellen mit der Fähigkeit zur EZM-Produktion verwendet<sup>99</sup>. Erst in den letzten Jahren rückt die Heterogenität dieser Zellen in den Fokus und wird derzeit intensiv erforscht<sup>100</sup>. Fibroblasten des Herzens sind in diesem Kontext immer noch unzureichend charakterisiert.

Als Erklärung für die starke Heterogenität der aCF wurde lange Zeit die zelluläre Herkunft vermutet, welche noch bis vor kurzem kontrovers diskutiert wurde<sup>101</sup>. In zahlreichen Studien wurde von verschiedensten Zelltypen berichtet, die durch Transdifferenzierung zur aCF-Population beitragen,

darunter: Endothelzellen<sup>102,103</sup>, Perizyten<sup>104</sup>, epikardiale Zellen<sup>80,81</sup> sowie Progenitorzellen aus dem Knochenmark<sup>105-107</sup>. Zusammengefasst kamen die Studien jedoch zu keinem einheitlichen Ergebnis, was in der Literatur durch technische Probleme sowie den Mangel an spezifischen Markern erklärt wurde<sup>101</sup>. Kanisicak et al. demonstrierten kürzlich anhand einer groß angelegten Lineage tracing Studie, dass der Beitrag der oben genannten Zellpopulationen zur aCF-Population nur sehr gering ist und der Großteil der Zellen nach Infarkt, aus residenten Tcf-21-positiven CF hervorgeht<sup>108</sup>. Vor diesem Hintergrund wird derzeit angenommen, dass zum einen die Kompartimentierung (Atrien, Ventrikel, Septum etc.) des Herzens<sup>101</sup> und zum anderen die Mikroumgebung<sup>74</sup> den Phänotyp der aCF entscheidend beeinflussen und so zur Heterogenität der Population beitragen.

Ein weiteres Problem stellt in diesem Zusammenhang die mangelnde Spezifität bisher bekannter CF/aCF - Marker dar. In der Literatur sind zahlreiche Marker beschrieben, die entweder unspezifisch sind oder nur eine Subpopulation der CF/aCF erfassen<sup>101</sup>.  $\alpha$ -SMA, der wohl meist genutzte Marker zur Identifikation von aCF, wird beispielsweise auch von glatten Muskelzellen und Perizyten des Myokards exprimiert<sup>101</sup>. Gleich zwei Studien haben in diesem Zusammenhang gezeigt, dass CF/aCF - Kulturen, die über die üblichen Techniken isoliert wurden (siehe 1.5), zu einem beachtlichen Anteil (20 - 40%) durch andere Zellpopulationen wie Endothel- und Immunzellen kontaminiert sind<sup>64,109</sup>. Der Tatsache, dass auch EpiSC eine ganze Reihe von aCF-Markern exprimieren, wurde bislang jedoch kaum Beachtung geschenkt. Neben gängigen CF-Markern wie CD90.2 und *platelet-derived growth factor  $\alpha$*  (PDGFRA)<sup>85</sup> exprimieren EpiSC auch verschiedene Aktivierungsmarker wie Tenascin-C (TNC) oder  $\alpha$ -SMA<sup>101,110</sup>. Eine mögliche Kontamination der aCF Population durch EpiSC-Derivate ist nicht ausgeschlossen, wurde bisher jedoch nicht untersucht.

## 1.5 Techniken zur Isolation von CF/aCF und EpiSC

Bei näherer Betrachtung der bisher publizierten Isolationsprotokolle für CF/aCF kann zwischen zwei Verfahren unterschieden werden. Das erste Isolationsverfahren basiert auf der mechanischen Zerkleinerung des Gewebes und einer anschließenden Kultivierung ganzer Gewebestücke, aus denen die Zellen über den Kultivierungszeitraum aktiv heraus migrieren (Explantatkultur)<sup>111</sup>. Bei dem zweiten Verfahren wird das Gewebe nach mechanischer Zerkleinerung zusätzlich enzymatisch verdaut und die daraus resultierende Einzelzellsuspension anschließend kultiviert (Mincing-Protokoll)<sup>112</sup>. Aufgrund der höheren Effizienz des Mincing-Protokolls wird in den aktuelleren Studien größtenteils der enzymatische Verdau des Gewebes zur Isolation verwendet. Die publizierten Protokolle nutzen hierbei Verdauzeiträume von 30 bis 60 Minuten<sup>64,77,109,113-116</sup>, die einen potentiellen Einfluss auf den Phänotypen der Zellen haben können. Für CF/aCF sind darüber hinaus auch transgene Modelle beschrieben, in denen die Zellen über Lineage tracing mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und nach Gewebeverdau durchflusszytometrisch sortiert werden<sup>108,117</sup>.

Für die Isolation von EpiSC wurden ebenfalls Protokolle beschrieben, die auf Explantatkultur<sup>118</sup> oder enzymatischem Verdau<sup>85</sup> beruhen. Zhou et al. machte darüber hinaus Gebrauch vom Cre-LoxP System, um  $Wt1^+$ -Zellen genetisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren und anschließend darüber durchflusszytometrisch zu sortieren<sup>119</sup>. Ein Protokoll, das für die simultane Isolation von EpiSC und aCF aus dem Herzen geeignet ist und ohne die Verwendung genetisch veränderter Tiermodelle auskommt, wurde bislang nicht publiziert.

## 1.6 Regeneratives Potential von CF/aCF und EpiSC

Zur Verbesserung der Herzfunktion nach Myokardinfarkt wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv an zellbasierten Therapieansätzen geforscht<sup>120</sup>. Das Hauptaugenmerk lag dabei lange Zeit auf Stammzellen, welche das Narbengewebe durch funktionsfähiges Myokard ersetzen sollten. Trotz vielversprechender Ergebnisse im Tiermodell<sup>121</sup> erwies sich die klinische Anwendung von Stammzellen bislang jedoch als ernüchternd<sup>101,122</sup>. Hierdurch fiel der Fokus der regenerativen Forschung in den vergangenen Jahren immer mehr auf bereits differenzierte, lokal im Gewebe ansässige Zellen wie aCF und EpiSC<sup>101</sup>.

Die aCF stellen nach Infarkt eine vielversprechende Ausgangspopulation für regenerative Therapien dar, weil sie: 1) in hoher Zahl im Myokard vertreten sind<sup>101</sup>, 2) durch Sekretion parakriner Faktoren die Wundheilungsprozesse modulieren können<sup>113,123,124</sup> und 3) das Potential besitzen, sich durch Reprogrammierung in Kardiomyozyten zu differenzieren<sup>123,125,126</sup>. Für die Reprogrammierung wurden in der Vergangenheit verschiedenste Substanzen verwendet<sup>127</sup>. Dazu zählen Reprogrammierungscocktails, die aus einer Kombination verschiedener Transkriptionsfaktoren bestehen<sup>125,128,129</sup>, unterschiedliche microRNAs<sup>130,131</sup> sowie bioaktive Moleküle<sup>132-134</sup>. Trotz der bewiesenen positiven Einflüsse dieser Substanzen auf das Differenzierungspotential von CF/aCF, sind die bisher bekannten Therapieansätze immer noch wenig effizient<sup>127</sup>.

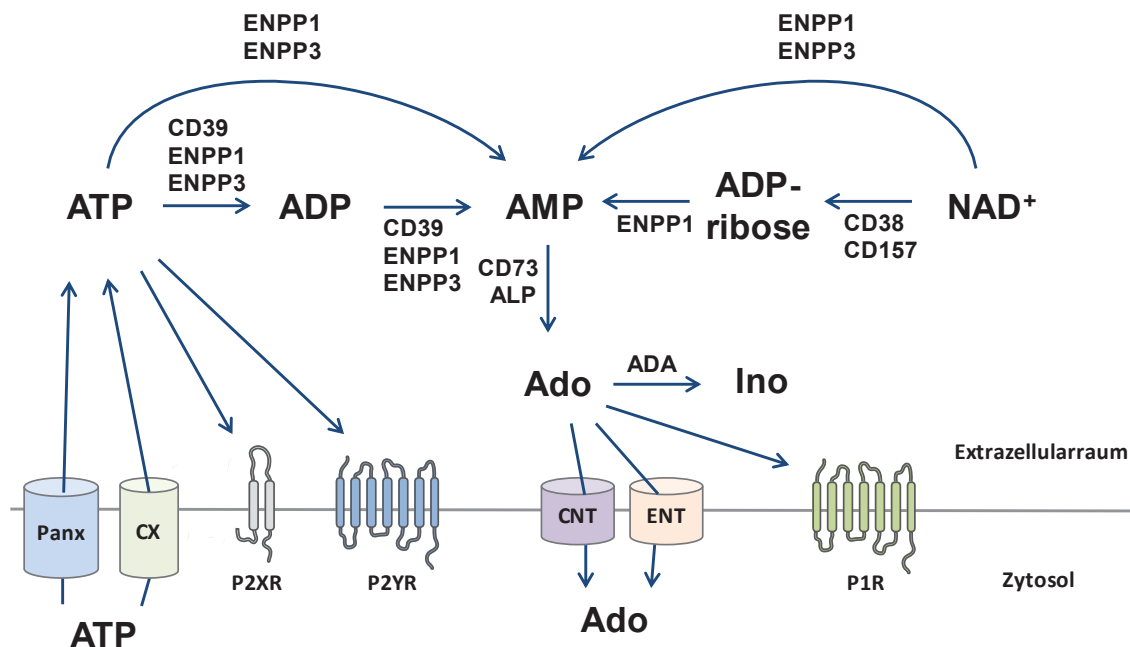
Auch die EpiSC-Population stellt im Zusammenhang mit regenerativen Therapien eine interessante Zellpopulation dar, da sie zum einen ähnlich wie aCF durch Sekretion parakriner Faktoren in der Lage sind, den Wundheilungsprozess zu modulieren<sup>81</sup> und zum anderen das Potential bergen, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren<sup>87</sup>. Smart et al. zeigten bereits, dass eine Behandlung der EpiSC mit T $\beta$ 4 die Differenzierung in die Kardiomyozyten begünstigt, wobei die Effizienz in diesem experimentellen Ansatz jedoch stark begrenzt war<sup>87</sup>. Ein besseres Verständnis beider Zellpopulationen ist folglich von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze.

## 1.7 Extrazellulärer Purinstoffwechsel

Nach Infarkt entscheidet eine ganze Reihe verschiedener Faktoren über den Verlauf der Entzündungsreaktion des damit verbundenen Wundheilungsprozesses. Einen großen Einfluss haben hierbei extrazelluläre Nukleotide und Nukleoside<sup>135</sup>. Beide sind die Grundbausteine der Nukleinsäuren und spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel und der Signaltransduktion<sup>136</sup>. Insbesondere

extrazellulär gebildete Nukleotide und Nucleoside sind an einer Reihe physiologischer aber auch pathophysiologischer Prozesse beteiligt und agieren dort als Signalmoleküle<sup>135,137,138</sup>.

Der extrazelluläre Purinstoffwechsel ist sehr komplex und umfasst zahlreiche Kanäle, Transporter, Enzyme und Rezeptoren, die nachfolgend näher beschrieben werden. Abb. 4 illustriert die wesentlichen Elemente des extrazellulären Purinstoffwechsels. Die Nucleotide ATP und NAD<sup>+</sup> können zum einen durch passive lytische Prozesse als auch aktiv über Transporter in den Extrazellularraum gelangen (siehe 1.7.1). Extrazelluläres ATP stimuliert P2-Rezeptoren auf der Zellmembran und setzt so Signalkaskaden in Gang (siehe 1.7.2) oder wird unmittelbar durch membranständige Enzyme abgebaut (siehe 1.7.3), wodurch Adenosin entsteht. Extrazelluläres NAD<sup>+</sup> wird ebenfalls durch membranständige Enzyme zu Adenosin abgebaut (siehe 1.7.3). Das gebildete Adenosin bindet in Folge dessen entweder an P1-Rezeptoren (siehe 1.7.4) oder wird enzymatisch degradiert. Adenosin kann aber auch durch Transporter in die Zelle gelangen und dort wieder zu Nucleotiden aufgebaut werden (siehe 1.7.5).



**Abbildung 4: Extrazellulärer Purinstoffwechsel.** Illustriert ist der extrazelluläre Abbau der Nucleotide ATP und NAD<sup>+</sup>. Die abgebildeten Kanäle, Transporter, Rezeptoren und Ektoenzyme wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Panx: Pannexin; Cx: Connexin; CNT: Konzentrierte Nucleosidtransporter, ENT: Aquilibrative Nucleosidtransporter.

### 1.7.1 ATP Kanäle und die Freisetzung von Nucleotiden

Unter basalen Bedingungen ist die Konzentration von ATP und NAD<sup>+</sup> im Extrazellularraum nur sehr gering. Für ATP liegt die Konzentration bei etwa 1-10 nM<sup>139</sup>, während die von NAD<sup>+</sup> etwa 0,1 – 0,3 µM beträgt<sup>140,141</sup>. Der Efflux von ATP aus der Zelle ist unter basalen Bedingungen ebenfalls gering und wurde in *in vitro* Studien auf etwa 20 - 200 fmol·min<sup>-1</sup> pro 10<sup>6</sup> Zellen geschätzt<sup>142</sup>. Nach Infarkt steigt die Konzentration extrazellulärer Nucleotide stark an, da nekrotische sowie apoptotische Zellen ihren Zellinhalt samt der Nucleotide in die Umgebung freigeben<sup>39</sup> und des Weiteren Nucleotide über



Membrankanäle der intakten Zellen in den Extrazellularraum transportiert werden<sup>143,144</sup>. Die Freisetzung durch Kanäle wird über Connexin - (Cx) oder Pannexin (Panx) - Hemikanäle<sup>139,145</sup> vermittelt. Ein Hemikanal setzt sich aus jeweils sechs Cx bzw. sechs Panx zusammen und bildet so eine zentrale Pore<sup>146</sup>. Eine Öffnung der Pore und eine damit verbundene Freisetzung von Nukleotiden in den Extrazellularraum kann durch verschiedene Stimuli, wie die Veränderung der intra-/extrazellulären Ionenkonzentration, die Depolarisierung der Membran, mechanische Reize oder eine posttranslationale Modifikationen erfolgen<sup>147</sup>.

Im Herzen wurde die Expression zahlreicher Cx nachgewiesen, während von den drei bekannten Panx-Isoformen lediglich Panx1 im Herzen exprimiert wird<sup>146</sup>. Nach Infarkt exprimieren aCF die Kanalproteine Cx43, Cx45 und Panx1. Eine signifikante Rolle für die Freisetzung von ATP wird jedoch nur für Cx vermutet<sup>146</sup>. So zeigte Lu et al., dass ein Gen-Knockdown von Panx1 in CF nur geringen Einfluss auf die ATP Ausschüttung hat, während der Knockdown von Cx43 und Cx45 die ATP-Freisetzung um knapp 50% reduzierte<sup>49</sup>. Neben der Freisetzung von ATP spielen Cx auch eine Rolle bei der Vermittlung von Signalen zwischen Zellen, indem sie als Zell-Zell-Kontakte fungieren<sup>146</sup>. Quinn et al. konnten belegen, dass aCF über sogenannte *Nanotubes* mit Kardiomyozyten in Verbindung stehen, wodurch eine elektrotonische Kopplung der beiden Zelltypen besteht, die durch Cx vermittelt wird<sup>148</sup>. Weiterhin zeigten Experimente mit Cx43-defizienten Mäusen, dass defiziente Zellen in Folge einer Schädigung eine erhöhte Proliferationsrate aufweisen, was eine regulatorische Rolle der Cx im Proliferationsprozess vermuten lässt<sup>149</sup>. Welche Rolle Cx und Panx in adulten EpiSC nach Infarkt spielen, ist bislang nicht beschrieben. Für das embryonale Epikard ist jedoch bekannt, dass Cx Einfluss auf die Zellpolarität und das Migrationsverhalten von Wt-1<sup>+</sup>-Zellen haben<sup>150</sup>.

### 1.7.2 Nukleotidrezeptoren (P2-Rezeptoren)

Nukleotide im Extrazellularraum sind in der Lage an membranständige P2-Rezeptoren zu binden, die sich in zwei Subgruppen unterscheiden lassen: Die P2X-Rezeptoren (Liganden-aktivierte Ionenkanäle) und die P2Y-Rezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren)<sup>151</sup>. Insgesamt sind sieben P2X-Rezeptoren (P2X1-7) in der Maus bekannt, die durch ATP aktiviert werden können, aber eine unterschiedlich hohe Affinität für den Liganden haben<sup>152</sup>. Die Bindung von ATP an einen Rezeptor führt zur Konformationsänderung, wodurch Ionen ausströmen<sup>153</sup> und die Plasmamembran depolarisiert wird. Die Depolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und somit zum Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup> Konzentration, die in einer Aktivierung verschiedener Signalwege resultiert<sup>154</sup>.

Insgesamt sind acht P2Y-Rezeptoren bekannt, die nicht nur durch ATP sondern auch durch weitere Nukleotide aktiviert werden können<sup>154</sup>. Durch Bindung eines Nukleotids an einen P2Y-Rezeptor kommt es zur Aktivierung eines heterotrimeren G-Proteins, das daraufhin in seine Untereinheiten dissoziiert. Diese Untereinheiten interagieren wiederum mit anderen Proteinen und können so zur Aktivierung verschiedener Signalwege führen<sup>154</sup>.

In neonatalen CF wurde die Expression der P2Y1-, P2Y2-, P2Y4-, und P2Y6-Rezeptoren beschrieben<sup>135</sup>. *In vitro* führte die Stimulation humaner CF mit ATP zu einer erhöhten Proliferations- sowie Migrationsrate, welche durch P2X4-, P2X7- und P2Y2-Rezeptor vermittelte Effekte erklärt wurden<sup>155</sup>. Ähnliche Ergebnisse wurden in adulten aCF der Ratte beobachtet, die jedoch auf die Aktivität des P2Y1-Rezeptors zurückgeführt wurde<sup>156</sup>. In EpiSC der Ratte konnte die Expression der P2X3-, P2X4-, P2X5- und P2X7-Rezeptoren nachgewiesen werden, wobei der P2X4-Rezeptor den vorherrschenden Rezeptor darstellte<sup>110</sup>. Darüber hinaus exprimierten EpiSC folgende P2Y-Rezeptoren: P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y12, P2Y13, P2Y14. Der P2Y2-Rezeptor zeigte in diesem Zusammenhang die stärkste Expression in den EpiSC. Die Stimulation mit verschiedenen unselektiven P2-Rezeptor Agonisten bewirkte eine vermehrte Sekretion der Cytokine IL-6 und IL-11<sup>110</sup>.

### 1.7.3 Extrazellulärer Nukleotidabbau

Die in den Extrazellulärraum freigesetzten Nukleotide werden durch Ektoenzyme abgebaut. Dabei bestimmt die Geschwindigkeit des ATP-Abbaus das Ausmaß der P2-Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion<sup>157</sup>. Nachfolgend sind die Enzyme des ATP- und NAD-Abbaus im Detail erklärt.

#### 1.7.3.1 ATP-Abbau

Nukleotidtri- (z.B. ATP) sowie -diphosphate (z.B. ADP) werden durch Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen (NTPDasen) abgebaut<sup>158,159</sup>. Extrazellulär werden die NTPDasen 1-3 sowie 8 exprimiert<sup>160</sup>. Davon hydrolysiert lediglich die NTPDase 1 (CD39) extrazelluläres ATP auf direktem Wege zu AMP, ohne dass große Mengen ADP entstehen, während die anderen Mitglieder zunächst ADP als Zwischenprodukt bilden<sup>158,160</sup>. Die CD39 Aktivität hat enormen Einfluss auf den Verlauf fibrotischer Prozesse<sup>161</sup>. So ist die Nukleotidkonzentration im Extrazellulärraum CD39-defizienter Mäuse in Folge einer Gewebsschädigung signifikant erhöht, wodurch eine verstärkte inflammatorische und fibrotische Antwort durch Aktivierung der P2-Rezeptoren induziert wird<sup>161-163</sup>. Die Hydrolyse extrazellulärer Nukleotide kann außerdem durch die Ekto-Nukleotid-Pyrophosphatasen /Phosphodiesterasen (ENPPs) erfolgen, von denen sieben Mitglieder bekannt sind. An der äußeren Seite der Zellmembran sind jedoch nur ENPP1 und ENPP3 lokalisiert<sup>157</sup>. Beide Isoformen hydrolysieren ATP zu AMP, wobei für Isoform 1 eine höhere Effizienz beschrieben wurde<sup>164</sup>. Neben ATP katalysieren ENPP1 und ENPP3 auch die Spaltung von anderen Nukleotiden wie NAD<sup>+</sup><sup>165,166</sup>.

Der Abbau von ATP wurde in CF/aCF bislang nicht vollständig untersucht. Eine *in vitro* Studie an CF der Ratte belegt den Abbau von ATP durch CD39, geht aber in diesem Zusammenhang nicht auf die funktionelle Rolle weiterer Ektoenzyme des Purinstoffwechsels ein<sup>167</sup>. Die Hydrolyse von ATP wurde auch für EpiSC bestätigt. So zeigten Hesse et al., dass EpiSC der Ratte, die essentiellen Ektoenzyme zur Hydrolyse des ATPs exprimieren und extrazelluläres ATP aktiv bis zur Stufe des Adenosins abbauen<sup>110</sup>.

### 1.7.3.2 NAD<sup>+</sup>-Abbau

Der Abbau von NAD<sup>+</sup> erfolgt durch die Ektoenzyme CD38 und CD157 (BST-1), welche das Substrat zunächst zu zyklischer ADP-Ribose (cADPR) umbauen<sup>168</sup>. Das cADPR kann entweder weiter abgebaut oder unmittelbar in die Zelle transportiert werden, wo es an Ryanodinrezeptoren bindet und die Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum initiiert<sup>169</sup>. cADPR kann aber auch unmittelbar zu ADP-Ribose (ADP-Ribose) hydrolysiert werden<sup>168</sup> und an P2Y1-Rezeptoren binden oder durch ENPP1 und ENPP3 weiter zu AMP verstoffwechselt werden<sup>170</sup>. Die Substrataffinität für NAD<sup>+</sup> liegt bei CD38 ca. 400-mal höher als bei CD157<sup>171,172</sup>.

In CF/aCF wurde der NAD<sup>+</sup>-Abbau bisher nicht untersucht. In EpiSC hingegen ist die Expression der NAD<sup>+</sup>-abbauenden Ektoenzyme bekannt<sup>110</sup>. EpiSC der Ratte bauen extrazelluläres NAD<sup>+</sup> *in vitro* innerhalb von 60 Minuten vollständig bis zur Stufe des Adenosins ab<sup>110</sup>.

### 1.7.3.3 AMP-Abbau

Sowohl ATP als auch NAD<sup>+</sup> werden durch Ektoenzyme zu Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut, welches anschließend durch die membranständige Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) oder durch alkalische Phosphatasen (ALP) zu Adenosin diphosphoryliert wird<sup>160,173</sup>. In der Maus sind vier verschiedene ALP-Isoformen bekannt, wovon die gewebeunspezifische Form *tissue nonspecific alkaline phosphatase* (TNAP, auch als ALP1 bekannt) am weitesten verbreitet ist<sup>160</sup>. Während CD73 bevorzugt AMP abbaut und mit einem K<sub>m</sub>-Wert von 1-50 µM eine vergleichsweise hohe Spezifität aufweist<sup>173,174</sup>, zeigt ALP deutlich geringere Spezifität (K<sub>m</sub>-Wert 441 µM)<sup>175</sup> und katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphatverbindungen wie ATP, ADP, AMP sowie cAMP<sup>157</sup>. Da CD73-Verlustmutanten jedoch deutlich geringere extrazelluläre Adenosinspiegel aufweisen, wird davon ausgegangen, dass die Aktivität der ALP bei der Degradation im Extrazellulärraum eine eher untergeordnete Rolle spielt<sup>117</sup>.

Lu et al. beschreibt, dass extrazelluläres ATP von kultivierten Ratten CF bis zur Stufe des Adenosins abgebaut wird<sup>167</sup>. Entgegen dieser Beobachtung berichtet Borg et al., dass die CD39 Expression in CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen (CF, glatte Muskelzellen, Perizyten) des Mäuseherzens relativ hoch ist, während CD73 nicht exprimiert wird<sup>176</sup>. Im Detail wurde der extrazelluläre Abbau von AMP in CF und aCF noch nicht untersucht. Für EpiSC der Ratte ist die Expression von CD73 und ALP bekannt. Zudem bauen Ratten EpiSC die Substrate ATP, ADP sowie NAD vollständig zu Adenosin ab<sup>110</sup>.

## 1.7.4 Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren)

Die Aktivierung membranständiger Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) durch Adenosin spielt eine wichtige Rolle in einer ganzen Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen<sup>177</sup>. Insgesamt sind vier Subtypen der G-Protein-gekoppelten Adenosinrezeptoren bekannt: A1, A2A, A2B und A3<sup>178</sup>. Den Effektor aller vier Rezeptoren stellt die Adenylatzyklase (AZ) dar, welche abhängig vom

Rezeptor-Subtyp entweder aktiviert oder inhibiert wird. Die Gi/o-Protein-gekoppelten A1- und A3-Rezeptoren vermitteln über die Hemmung der AZ eine Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration<sup>177,179</sup>. Die Gs-Protein-gekoppelten A2A- und A2B-Rezeptoren hingegen aktivieren die AZ, wodurch die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt<sup>177,179</sup>.

Über den A1-Rezeptor werden sowohl pro-inflammatorische<sup>180</sup> als auch anti-inflammatorische Effekten vermittelt<sup>181</sup>. Hinsichtlich fibrotischer Prozesse wurden ebenfalls sowohl Fibrose-fördernde als auch hemmende Effekte beobachtet<sup>182</sup>.

Im Gegensatz zum A1-Rezeptor wirkt der A2A-Rezeptor überwiegend anti-inflammatorisch<sup>183</sup> sowie anti-fibrotisch<sup>182</sup>. Die Aktivierung des A2A-Rezeptors führt zu einer Verminderung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 und TNF- $\alpha$ <sup>184</sup>. Eine Überexpression des A2A-Rezeptors resultiert in einer verminderten fibrotischen Reaktion und einer verbesserten kardialen Funktion<sup>185</sup>. Darüber hinaus konnte im Modell des Herzinfarkts gezeigt werden, dass eine Stimulation des A2A-Rezeptors mit spezifischen Agonisten die Infarktgröße reduziert<sup>180,186,187</sup>.

Für die Aktivierung des A2B-Rezeptors sind deutlich höhere Adenosin-Konzentrationen notwendig als es bei den restlichen Adenosinrezeptoren der Fall ist<sup>188</sup>. Es wird aus diesem Grund angenommen, dass der A2B-Rezeptor erst unter pathophysiologischen Bedingungen eine funktionelle Rolle spielt<sup>189</sup>. Der Rezeptor kann sowohl an Gs- als auch an Gq-Proteine gekoppelt sein, wodurch unterschiedliche Signalwege induziert werden können<sup>177</sup>. Die durch den A2B-Rezeptor vermittelten Effekte sind vielseitig und werden in der Literatur kontrovers diskutiert<sup>182</sup>. Für den A2B-Rezeptor sind sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Effekte bekannt<sup>180,190</sup> und auch bezüglich fibrotischer Prozesse wurden pro-fibrotische<sup>191-193</sup> sowie anti-fibrotische<sup>194-197</sup> Effekte beschrieben.

Der A3-Rezeptor ist bislang der am wenigstens erforschte Adenosin-Rezeptor<sup>182</sup>. Während A1, A2A und A2B hohe Sequenzhomologien innerhalb der Säugetierfamilien aufweisen (86-93%), zeigt der A3-Rezeptor starke Speziesunterschiede<sup>178</sup>. Die Signaltransduktion des A3-Rezeptors kann über Gi- oder Gq-Proteine erfolgen<sup>198</sup>. Auch für den A3-Rezeptor wurden in der Vergangenheit vereinzelt sowohl pro-inflammatorische/fibrotische als auch anti-inflammatorische/fibrotische Effekte beschrieben<sup>182,199</sup>.

CF exprimieren alle vier Rezeptor-subtypen, wobei die beiden A2-Rezeptoren dominierend sind<sup>135</sup>. Nach Infarkt ist der A2B-Rezeptor vorherrschend auf aCF<sup>196</sup> und wirkt bei Aktivierung inhibitorisch auf die Proliferation<sup>200</sup> und die Kollagensynthese<sup>201,202</sup> der Zellen. Die inhibitorischen Signale werden dabei über den Gs-adenylyl-zyclase-cAMP-Epac-PI3K-abhängigen, PKA-unabhängigen Signalweg vermittelt<sup>194,203</sup>. In einem *in vivo*-Infarktmodell führte die langzeitige Stimulation des A2B-Rezeptors zur Reduktion der Fibrose und verbesserte die kardiale Funktion<sup>195</sup>. Im Kontrast dazu berichtet eine weitere *in vivo*-Studie, dass die Hemmung des A2B-Rezeptors in einer reduzierten Caspase-1 Aktivität und somit in einer verbesserten Remodulierung des Herzens resultiert<sup>191</sup>. In welchem Ausmaß die Hemmung bzw. Aktivierung des A2B-Rezeptors das Wundheilungsgeschehen nach Infarkt beeinflusst,

ist noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen<sup>182</sup>. Bezüglich der EpiSC konnte in vorangegangenen Studien gezeigt werden, dass EpiSC der Ratte den A2A- und A2B-Rezeptor dominant exprimieren<sup>110</sup>. Die Stimulation des A2B-Rezeptors stimulierte in EpiSC die Sekretion von IL-10 und IL-6, während die Stimulation des A2A-Rezeptors keine Cytokinfreisetzung induzierte<sup>110</sup>.

### 1.7.5 Adenosin-Abbau und Aufnahme

Extrazelluläres Adenosin wird über die Adenosin-Desaminase 1 (ADA1) zu Inosin und anschließend weiter über die Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) zu Hypoxanthin abgebaut<sup>157</sup>, wobei die PNP überwiegend intrazellulär lokalisiert ist<sup>204</sup>. Alternativ dazu kann Adenosin auch direkt über konzentrationale (CNTs, Kationen-abhängig) oder äquilibriumale (ENTs; Kationen-unabhängig) Nukleosidtransporter in die Zelle aufgenommen werden<sup>205</sup>. Die Transportmechanismen sind jedoch verschieden: Während CNTs durch Kotransport von  $\text{Na}^{2+}$ -Ionen und Nukleosiden entgegen eines Konzentrationsgradienten arbeiten, stellen ENTs bidirektionale Transporter dar, welche den Transport der Nukleoside entlang des bestehenden Konzentrationsgradienten erleichtern. Insgesamt sind drei konzentrationale (Slc28a1-3) und vier äquilibriumale (Slc29a1-a4) Transporter bekannt<sup>205</sup>. Das aufgenommene Adenosin kann innerhalb der Zelle entweder weiter zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut werden oder durch die Adenosin-Kinase (ADK) zu AMP phosphoryliert werden<sup>206</sup>.

## 1.8 Zielsetzung

Nach Infarkt sind sowohl aCF als auch EpiSC an den Prozessen der Wundheilung beteiligt und können diesen durch Ausschüttung verschiedenster Mediatoren entscheidend beeinflussen<sup>74,82</sup>. Aus diesem Grund bergen beide Zellpopulationen das Potential für Therapieansätze, lassen sich jedoch wegen ihrer entwicklungsgeschichtlichen Abstammung über herkömmliche Marker und Methoden nur unzureichend voneinander unterscheiden<sup>85,101</sup>. In den bisher publizierten Studien wurde die Anwesenheit von EpiSC in aCF Isolaten aufgrund ihrer im Vergleich zur aCF-Population geringen Zellzahl vernachlässigt. Der individuelle Beitrag der beiden Populationen zur Wundheilung wurde bislang nicht untersucht. Ein wesentlicher Faktor, der über den Wundheilungsverlauf nach Infarkt entscheidet, ist die Konzentration von Nukleotiden und Nukleosiden im Extrazellularraum<sup>135</sup>. Vergleichende Studien des extrazellulären Purinstoffwechsel von aCF und EpiSC gibt es bis dato noch nicht. Vor diesem Hintergrund wurden folgende Themeninhalte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht:

### 1. Entwicklung einer Methode zur simultanen Isolation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherz

- Wie kann eine effiziente Isolation mit möglichst minimalem Einfluss auf die Zellphysiologie gewährleistet werden?
- Wie lässt sich eine erfolgreiche Trennung der aCF- und EpiSC-Population realisieren?

### 2. Analyse der zellulären Heterogenität von aCF und EpiSC mittels Einzelzell-Sequenzierung

- Bestimmung der zellulären Zusammensetzung von aCF- und EpiSC-Population und Einordnung der identifizierten Subpopulationen in einen funktionellen Kontext.
- Systematischer Vergleich der aCF und EpiSC Population. Welche Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten bestehen zwischen den Populationen?

### 3. Charakterisierung des extrazellulären Purinstoffwechsels in CF, aCF und EpiSC

- Analyse des Purinstoffwechsels kardialer Fibroblasten vor (CF) und nach (aCF) Infarkt.
- Vergleichende Analysen der aCF und EpiSC Population hinsichtlich des extrazellulären Purinstoffwechsels.

## 2 Material

### 2.1 Geräte und Apparaturen

**Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen.**

| Gerät   | Hersteller mit Typenbezeichnung  |
|---|--|
| Affymetrix GeneChip-System                        | Affymetrix (Santa Clara, USA)  |
| Analysenwaage                                     | Ohaus Europe, PA214 (Greifensee, Schweiz)  |
| Autoklav  | F. & M. Lautenschläger, 5169 (Köln, Deutschland)   |
| Bioanalyser                                       | Agilent Technologies, 2100 (Santa Clara, USA)  |
| Durchflusszytometer                               | BD Biosciences, FACSCanto™ II (San Jose, USA)  |
| Gelelektrophoresesysteme                          | Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA)   |
| Heizblock   | Eppendorf, Thermomixer compact (Hamburg, Deutschland)  |
| HPLC System                                       | Waters (Milford, USA)  |
| Inkubator   | Thermo Fisher Scientific, Heracell 150 i (Waltham, USA)  |
| Kryostat  | Leica Biosystems, CM 1850 (Nußloch, Deutschland)   |
| Langendorffapparatur                              | Werkstatt der Physiologie, Universität Düsseldorf<br>Datenaufzeichnung: ADInstruments Powerlab/16SP (Spechbach, Deutschland)<br>Schlauchpumpe: Abimed, Minipuls3 (Langenfeld, Deutschland) |
| Mikroskop   | Olympus, MX 61 (Hamburg, Deutschland)  |
| MojoSort™ Magnet                                  | Biologend (San Diego, USA)   |
| Nanodrop  | Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000 (Waltham, USA)   |
| pH-Meter  | Knick, 766 Calimatic (Berlin, Deutschland)   |
| Pipetten  | Eppendorf, Research (Hamburg, Deutschland)   |
| Plattenschüttler                                  | IKA Werke, MTS 2/4 (Staufen, Deutschland)  |
| Realtime PCR Gerät                                | Thermo Fisher Scientific, StepOnePlus™ und ViiA 7 (Waltham, USA)   |
| Scanner   | Li-Cor Biosciences, Odyssey® CLx Imaging System (Linco)  |
| Sterile Werkbank                                  | Labogene, Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2 (Lillerod, Dänemark)   |
| Vortexer  | VWR International (Darmstadt, Deutschland)   |
| Zellsortierer                                     | Beckman Coulter, MoFlo XDP (Brea, USA)   |
| Zentrifugen                                       | Beckman Coulter, Allegra X-30R (Brea, USA)<br>Eppendorf, 5415R and 5424R (Hamburg, Deutschland)<br>Thermo Fisher Scientific, Heraeus Megafuge 16R (Waltham, USA)                           |
| 10X Chromium Single Cell Gene Expression Solution | 10X Genomics (Pleasanton, USA)   |

### 2.2 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Darmstadt) bezogen. Zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurde autoklaviertes bidestilliertes Wasser verwendet.

## 2.3 Puffer und Medien

Tabelle 2: Puffer und Medien die für die Versuche genutzt wurden.

| Medium / Puffer                           | Zusätze  | Konzentration                               | Hersteller                                    |
|---|--|---|---|
| <b>DMEM High Glucose</b>                  | FCS<br>Penicillin / Streptomycin   | 20%<br>1%                                   | Sigma Aldrich<br>(Darmstadt, Deutschland)     |
| <b>Einfriermedium (Cellbanker 1)</b>      | Keine  | -   | Amsbio LLC (Abingdon, Vereinigtes Königreich) |
| <b>FACS Puffer</b>                        | PBS<br>BSA<br>EDTA   | -<br>2%<br>1mM                              | -   |
| <b>Ladepuffer in dH<sub>2</sub>O</b>      | Tris-HCL (pH 6,8)<br>Glycerol<br>10% SDS<br>β-Mercaptoethanol<br>Bromphenolblau                    | 125mM<br>40%<br>1%<br>10%<br>0,1%           | -   |
| <b>PBS</b>                                | Keine  | -   | Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)            |
| <b>Puffer A</b>                           | Kaliumdihydrogenphosphat<br>Kaliumchlorid  | 150mM<br>150mM                              | -   |
| <b>Puffer B</b>                           | Acetonitril in Puffer A  | 20%   | -   |
| <b>RIPA Puffer</b>                        | EDTA<br>Natriumdeoxycholat<br>NP-40<br>Natriumorthovanadat<br>Natriumfluorid<br>Protease Inhibitor | 5mM<br>0,5%<br>0,5%<br>1mM<br>10mM<br>1:100 | -   |
| <b>Transfer Puffer in dH<sub>2</sub>O</b> | Glycin<br>Tris (Base)<br>Methanol  | 192mM<br>25mM<br>20%                        | -   |

## 2.4 Antikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper (anti-Maus) für die Durchflusszytometrie (Flow), Western Blot Analysen (WB) und Immunfluoreszenz-färbungen (IF).

| Spezifität    | Klon       | Herkunft  | Anwendung | Verdünnung | Hersteller               |
|---------------|------------|-----------|-----------|------------|--------------------------|
| <b>CD31</b>   | Mec 13.3   | Ratte     | Flow      | 1:100      | BD Biosciences           |
| <b>CD39</b>   | 5F2        | Maus      | Flow      | 1:100      | Thermo Fisher Scientific |
| <b>CD44</b>   | IM7        | Ratte     | Flow, IF  | 1:50       | Biologend                |
| <b>CD45</b>   | 30-F11     | Ratte     | Flow      | 1:400      | BD Biosciences           |
| <b>CD73</b>   | TY/23      | Ratte     | Flow      | 1:100      | BD Biosciences           |
| <b>CD90.2</b> | 30-H12     | Ratte     | Flow, IF  | 1:100      | Miltenyi Biotec          |
| <b>CD105</b>  | MJ7/18     | Ratte     | Flow, IF  | 1:80       | Biologend                |
| <b>α-SMA</b>  | Polyklonal | Kaninchen | Flow      | 1:100      | Abcam                    |



|                    |            |           |      |        |                             |
|--------------------|------------|-----------|------|--------|-----------------------------|
| <b>AQP-1</b>       | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:100  | Abcam                       |
| <b>CEMIP</b>       | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:50   | MyBioSource Inc.            |
| <b>CTHRC1</b>      | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:50   | Invitrogen                  |
| <b>ENPP1</b>       | YE1/19.1   | Ratte     | Flow | 1:100  | Biolegend                   |
| <b>LCN2</b>        | 29         | Ratte     | IF   | 1:100  | Abcam                       |
| <b>MEFSK-4</b>     | mEF-SK4    | Ratte     | Flow | 1:50   | Miltenyi Biotec             |
| <b>NG-2</b>        | Polyklonal | Kaninchen | Flow | 1:100  | Abcam                       |
| <b>Pan-KRT</b>     | C-11       | Maus      | IF   | 1:100  | Abcam                       |
| <b>Panx1</b>       | D9M1C      | Kaninchen | WB   | 1:1000 | Cell Signaling              |
| <b>PDGFRA</b>      | APA5       | Ratte     | Flow | 1:100  | eBioscience                 |
| <b>POSTN</b>       | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:100  | OriGene Technologies        |
| <b>SCA-1</b>       | D7         | Ratte     | Flow | 1:100  | Miltenyi Biotec             |
| <b>TNC</b>         | 4C8MS      | Maus      | IF   | 1:50   | IBL International           |
| <b>TNI</b>         | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:100  | Cell Signaling              |
| <b>VIM</b>         | EPR3776    | Kaninchen | IF   | 1:200  | Abcam                       |
| <b>WT-1 (C-19)</b> | Polyklonal | Kaninchen | IF   | 1:50   | Santa Cruz<br>Biotechnology |

Tabelle 4: Verwendete Lebendtdfarbstoffe für die Durchflusszytometrie.

| Lebendtdfarbstoff                       | Verdünnung | Hersteller  |
|---|------------|-------------|
| <b>7AAD</b>                             | 1:50       | Biolegend   |
| <b>Fixable viability Dye eFluor 780</b> | 1:2000     | eBioscience |

Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper für die Durchflusszytometrie (Flow), Western Blot (WB) und Immunfluoreszenzfärbungen (IF).

| Spezifität                  | Fluorochrom | Klon       | Herkunft | Anwendung | Verdünnung | Hersteller |
|-----------------------------|-------------|------------|----------|-----------|------------|------------|
| <b>Goat anti rabbit IgG</b> | AF488       | Polyklonal | Ziege    | IF, Flow  | 1:1000     | Invitrogen |
| <b>Goat anti rabbit IgG</b> | AF594       | Polyklonal | Ziege    | IF        | 1:1000     | Invitrogen |
| <b>Goat anti rabbit IgG</b> | 800CW       | Polyklonal | Ziege    | WB        | 1:10000    | Li-cor     |
| <b>Goat anti mouse IgG</b>  | AF488       | Polyklonal | Ziege    | IF        | 1:1000     | Invitrogen |

## 2.5 Taqman Assays

Die quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) Messungen wurden über *Microfluidic Cards*- sowie im 96-Well Format mit separaten Taqman Gen Expressions Assays (Thermo Fisher Scientific, USA) durchgeführt. Das Assay besteht aus Primerpaaren und einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Am 5'-Ende

ist die Sonde mit dem Reporterfarbstoff FAM markiert und am 3'-Ende trägt sie einen nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ).

**Tabelle 6: Verwendete Taqman Gen Expressions Assays für qRT-PCR im 96-Well Format.**

| Assay-ID      | Gensymbol | Genprodukt   |
|---------------|-----------|--|
| Mm00487425_m1 | fos       | c-fos  |
| Mm07296811_s1 | jun       | c-jun  |
| Mm00435956_m1 | Map2k3    | Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase 3             |
| Mm00803694_m1 | Map2k6    | Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinase 6             |
| Mm01301009_m1 | Mapk14    | Mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 (p-38 $\alpha$ ) |

**Tabelle 7: Verwendete Taqman Gen Expressions Assays für die qRT-PCR mit *Microfluidic Cards*.**

| Assay-ID      | Gensymbol | Genprodukt  |
|---------------|-----------|---|
| Mm00725412_s1 | Acta2     | Alpha smooth muscle aktin                                 |
| Mm01308023_m1 | Adora1    | Adenosin A1 Rezeptor                                      |
| Mm00802075_m1 | Adora2a   | Adenosin A2a Rezeptor                                     |
| Mm00839292_m1 | Adora2b   | Adenosin A2b Rezeptor                                     |
| Mm00802076_m1 | Adora3    | Adenosin A3 Rezeptor                                      |
| Mm00475834_m1 | Alpl      | Alkalische Phosphatase                                    |
| Mm00477672_m1 | Bst-1     | bone marrow stromal cell antigen 1                        |
| Mm01220906_m1 | Cd38      | CD38 Antigen  |
| Mm00801666_g1 | Col1a1    | Kollagen, Typ I alpha 1                                   |
| Mm00802300_m1 | Col3a1    | Kollagen, Typ III alpha 1                                 |
| Mm00515447_m1 | Entpd1    | Ektonukleosid Triphosphat Diphosphohydrolase 1            |
| Mm01193761_m1 | Enpp1     | Ektonukleotid Pyrophosphatase /Phosphodiesterase 1        |
| Mm01193723_m1 | Enpp3     | Ektonukleotid Pyrophosphatase /Phosphodiesterase 3        |
| Mm00501910_m1 | Nt5e      | Ekto-5' nukleotidase                                      |
| Mm01256744_m1 | Fn1       | Fibronectin 1   |
| Mm00484689_m1 | Gata4     | GATA binding protein 4                                    |
| Mm00439247_m1 | Hand2     | Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2 |
| Mm01179639_s1 | Gja1      | Connexin 43   |
| Mm00433610_s1 | Gja4      | Connexin 37   |
| Mm01309813_s1 | Nkx2.5    | NK2 Homeobox 5  |
| Mm00450900_m1 | Panx1     | Pannexin 1  |
| Mm01284919_m1 | Postn     | Periostin   |
| Mm00501787_m1 | P2rx4     | P2X4 - Rezeptor   |
| Mm01199500_m1 | P2rx7     | P2X7 - Rezeptor   |
| Mm02619978_s1 | P2ry2     | P2Y2 - Rezeptor   |
| Mm00725448_s1 | Rplp0     | 60S saures ribosomales Protein P0                         |
| Mm01270577_m1 | Slc29a1   | Äquibrativer Nukleosid Transporter 1                      |
| Mm00451515_m1 | Tbx20     | T-box 20  |
| Mm00803518_m1 | Tbx5      | T-box 5   |
| Mm00470177_m1 | Tbx18     | T-box18   |
| Mm00495662_m1 | Tnc       | Tenascin-C  |
| Mm00448961_m1 | Tcf21     | Transkriptions Faktor 21                                  |
| Mm01337048_m1 | Wt1       | Wilms Tumor 1   |

## **2.6 Software**

Für die Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden die Programme Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Powerpoint, sowie Inkscape verwendet. Zur Erstellung schematischer Abb. wurden teilweise Powerpoint Vorlagen von der Firma Smart Sevier Medical ART genutzt. Alle weiteren Computerprogramme werden nachfolgend im unmittelbaren Zusammenhang mit der jeweiligen Methode unter Abschnitt 3. aufgeführt.

## 3 Methoden

### 3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und dort mit Standardfutter sowie Wasser *ad libitum* versorgt. Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt. Die Experimente wurden mit 9-13 Wochen alten Mäusen durchgeführt und waren konform der Tierschutzverordnung.

#### 3.1.1 Nicht transgene Versuchstiere

Alle Versuche an nicht-transgenen Tieren wurden an C57Bl/6J Tieren durchgeführt, welche von der Firma Janvier (Le Genest Isle, Frankreich) bezogen wurden und bis zum Beginn des Versuchs in der ZETT gehalten wurden.

#### 3.1.2 Globale CD39 Verlustmutante

Die für die Analyse des extrazellulären Purinstoffwechsels von CF verwendeten CD39-Verlustmutanten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Florian Wirsdörfer (Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen) zur Verfügung gestellt. Die verwendete CD39-Verlustmutante wurde in der Vergangenheit bereits charakterisiert<sup>207</sup>.

#### 3.1.3 Wt-1<sup>CreERT2</sup>Rosa<sup>tdTomato</sup> Maus

Für die *Lineage tracing* Versuche wurden über das Cre/loxP-Rekombinationssystem<sup>208</sup> Wt-1-Reporterermäuse generiert. Dazu wurde ein transgener Mausstamm, welcher die CreERT-Rekombinase unter dem Wt-1 Promotor exprimiert, mit einem Mausstamm verpaart, der ein tdTomato-Gen trägt vor dessen Position ein mit loxP-Seiten flankiertes Stop-Codon geschaltet ist. Die Cre-Rekombinase trägt einen Östrogen-Rezeptor, welcher ohne Anwesenheit von Tamoxifen den Eintritt der Cre-Rekombinase in den Zellkern verhindert. Durch die Verpaarung der beiden Mauslinien werden Nachkommen generiert, welche sowohl die Cre-Rekombinase als auch das loxP-flankierte Stop-Codon vor dem TdTomato Gen tragen. Wird diesen Mäusen Tamoxifen injiziert, kommt es zur Abspaltung des Östrogen-Rezeptors von der Cre-Rekombinase, wodurch diese in den Zellkern gelangt und das Stop-Codon herausschneidet<sup>208</sup>. Hierdurch kommt es zur Transkription des tdTomato-Gens in Wt-1<sup>+</sup>-Zellen, die daraufhin durch das fluoreszierende tdTomato Signal markiert werden. Die Zucht der Tiere erfolgte in der ZETT der Heinrich-Heine-Universität. Für die Zucht wurden Wt1<sup>tm2(cre/ERT2)Wtp/J</sup> Tiere (stock nr: 010912 Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) mit B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze/J</sup> Tieren (stock no. 007908; Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) verpaart. Nach Genotypisierung

wurden heterozygote  $Wt1^{CreERT2}Rosa^{tdTomato}$  für die Versuche genutzt. Die Induktion der Cre-Rekombinase Aktivität erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Tamoxifen (2 mg/ml in Sesamöl) fünf und drei Tage vor Infarkt entsprechend eines publizierten Protokolls<sup>87</sup>.

### 3.2 Induktion des Herzinfarkts (Ischämie-Reperfusion)

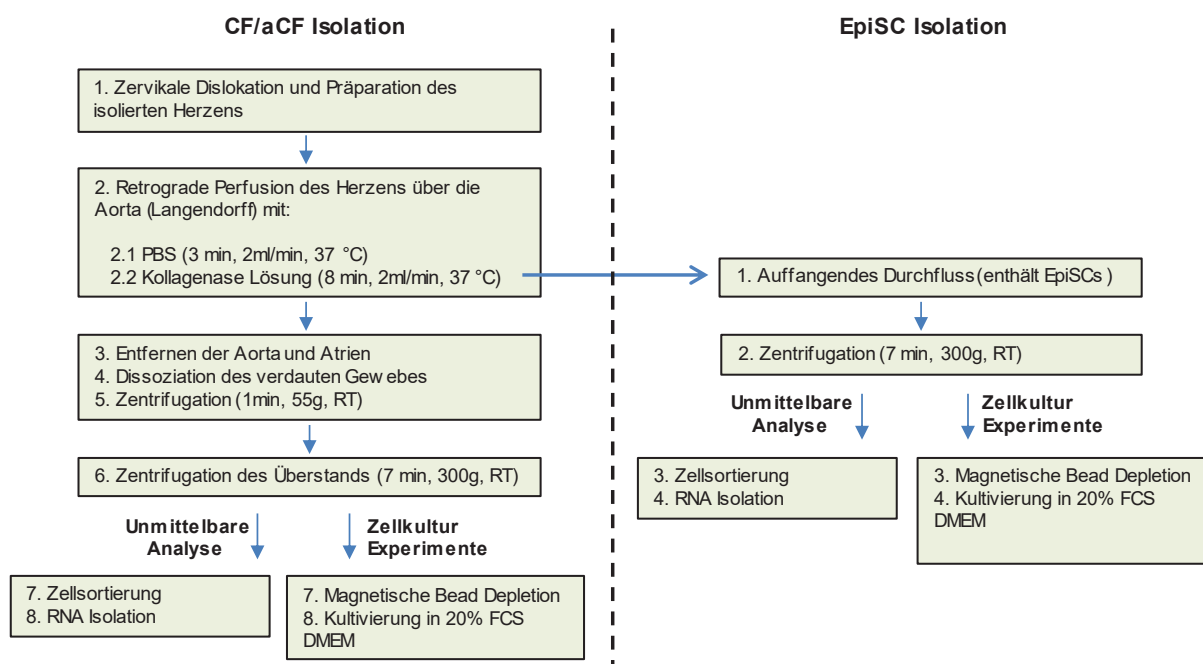
Zur Induktion des Herzinfarkts in den Mäusen wurden die Tiere vor Beginn mit Hilfe von Isofluran (Actavis GmbH, Wien, Österreich) sediert und intubiert, um sie während der Operation bei einer Atemfrequenz von 150 Atemzügen pro Minute künstlich zu beatmen. Während der Operation erfolgte eine konstante Zufuhr von 1,5% Isofluran über die Atemluft zur Aufrechterhaltung der Narkose. Für die Induktion des Herzinfarkts wurde die Maus auf einer Wärmeplatte fixiert und ein Elektrokardiogramm (EKG) durch Anbringung von Elektroden an den Pfoten angeschlossen. Anschließend wurde der Brustraum geöffnet und die linke Koronararterie (*left anterior descending coronary artery* – LAD) mit einem 8-0 Polypropylenfaden für 50 Minuten ligiert. Die Ischämie wurde dabei über die ST-Streckenhebung des EKGs überprüft. Nach Ablauf der Zeit wurde die Ligation der LAD gelöst und die Reperfusion eingeleitet, welche durch Rotfärbung des infarzierten Areals und einer Normalisierung der ST-Strecke überprüft wurde. Anschließend wurde der Brustraum durch eine Naht geschlossen und der betroffene Bereich desinfiziert. Die Operationen der Tiere wurden freundlicherweise von Dr. med. Zhaoping Ding durchgeführt.

### 3.3 Zellisolation

#### 3.3.1 Perfusions-Protokoll

Zur Charakterisierung von aCF und EpiSC aus dem Infarktherzen wurde eine Methode zur simultanen Isolation sowie Separation beider Zelltypen etabliert. Da die Methode ein Ergebnis der Arbeit darstellt, wird das Prinzip erst im Ergebnisteil näher erläutert, während an dieser Stelle ausschließlich die technische Durchführung erläutert wird. Abb. 5 zeigt die grundlegenden Arbeitsschritte in Form eines Flussdiagramms. Für die Isolation wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, der Bauch- sowie der Brustraum eröffnet, das Herz unmittelbar entnommen und in eine Schale mit kaltem PBS überführt. Reste von Thymus, Fettgewebe und Lunge wurden entfernt und das Herz über die Aorta kanüliert. Durch retrograde Perfusion mit vorgewärmtem PBS wurden die Koronarien anschließend bei konstantem Fluss (2 ml/min bei 37 °C) frei von Blut gespült und darauffolgend für 8 Minuten mit einer Kollagenase-Lösung (1200 U/ml, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) perfundiert, um das Gewebe enzymatisch zu verdauen. Gleichzeitig wurde das Herz in einem mit 2 ml Kollagenaselösung gefüllten 5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert, welches während des Gewebeerdaus bei 80 *rounds per minute* (rpm) kontinuierlich angestoßen wurde, um EpiSC durch Scherkräfte von der Herzoberfläche abzutragen. Wegen des konstanten Zuflusses von Kollagenase steigt der Flüssigkeitsspiegel (enthält die abgetragenen EpiSC) innerhalb des Reaktionsgefäßes, tritt durch die Öffnungen (Durchmesser: 2 mm)

an der oberen Kante des Gefäßes aus und kann schließlich aufgefangen werden. Für die Reproduzierbarkeit der Methode wurde darauf geachtet, dass die Herzen immer in gleicher Orientierung und auf gleicher Höhe an der 1,5 ml Marke des Gefäßes platziert wurden. Nach Verdau wurde der aufgefangene Durchfluss bei 300 g für 7 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert und die Zellen bis zur weiteren Nutzung bei 4 °C aufbewahrt. Zur Isolation der aCF wurde das Herz nach dem Verdau von der Kanüle abgenommen und in eine Petrischale überführt, in der Vorhöfe und Aorta entfernt wurden. Durch vorsichtiges Auseinanderziehen mit Pinzetten wurde das verdaute Gewebe dissoziiert und in 4 ml 20% FCS in DMEM überführt. Die Zellen wurden anschließend durch wiederholtes Auf- und Ab-pipettieren in Einzelzellsuspension gebracht und über ein 100 µm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) gefiltert. Die Einzelzellsuspension wurde danach bei 55 g für 1 Minute zentrifugiert, um die deutlich größeren Kardiomyozyten zu pelletieren. Der Überstand (enthält die Nicht-Kardiomyozyten Fraktion) wurde abgenommen, über ein 40 µm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) gegeben und danach für 7 Minuten bei 300g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in MACS-Puffer resuspendiert und für die Folgeanalysen genutzt. Für die Isolation von CF aus gesunden Kontrollherzen wurde das Herz ohne Nutzung der Schüttelapparatur perfundiert, da das Epikard unter basalen Bedingungen nur eine einzelne Zellschicht über dem Myokard bildet<sup>209</sup> und die Gefahr besteht, dass tiefere Gewebeschichten abgetragen werden. Entsprechend der geplanten Versuche wurden die Zellpopulationen aus diesem Grund entweder direkt durchflusszytometrisch untersucht (3.4) oder über durchflusszytometrische Zellsortierung (3.5.1) für Genexpressionsstudien bzw. magnetische Zellsortierung (3.5.2) für Zellkulturversuche weiter aufgereinigt.



**Abbildung 5: Illustration der wesentlichen Versuchsabläufe zur Isolation und Aufreinigung von CF, aCF und EpiSC. RT = Raumtemperatur.**

### 3.3.2 Mincing-Protokoll

Für den Vergleich des neu etablierten Perfusions-Protokolls mit einem bereits publizierten Mincing-Protokoll wurden aCF entsprechend eines kürzlich publizierten Protokolls isoliert<sup>77</sup>. Dazu wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet, der Brustraum geöffnet und das infarzierte Herz entnommen. Anschließend wurden die Herzen mit einem Skalpell in ca. 1-2mm große Gewebstücke zerkleinert und in DMEM mit 0,75 U/ml Kollagenase D (Roche, Basel, Schweiz), 1,0 U/ml Dispase II (Roche, Basel, Schweiz) und 1mM CaCl<sub>2</sub> bei 37°C für 40 Minuten enzymatisch verdaut. Die daraus resultierende Suspension wurde über ein 100µm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) und danach nochmals über ein 40µm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) gegeben, um Zellaggregate zu entfernen. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 300g für 7 Minuten zentrifugiert, das Zellpellet in MACS Puffer resuspendiert und entsprechend den unter 3.5 beschriebenen Protokoll für die durchflusszytometrische Zellsortierung vorbereitet.

## 3.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt eine gängige Methode zur quantitativen Charakterisierung von Zellen bzw. ganzer Zellpopulationen dar. Für die durchflusszytometrische Analyse werden Zellen mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert und anschließend über das von ihnen ausgesendete Streu- und Fluoreszenzlicht charakterisiert. Dafür müssen die Zellen in Einzelzellsuspension in einem linearen Probenstrom einzeln an einem monochromatischen Laserstrahl vorbei geleitet werden, wodurch das daraus resultierende Streu- und Fluoreszenzlicht der Zellen detektiert werden kann. Über das detektierte Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht können somit Aussagen zur Größe sowie Granularität der Zellen getätigt werden und über das Fluoreszenzsignal kann die Zellsuspension hinsichtlich der Expression des zu untersuchenden Proteins charakterisiert werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist proportional der Menge des gebundenen Antikörpers. Diese Methode ermöglicht die Analyse einzelner Zellen hinsichtlich Morphologie und Antigenexpression. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um die CF, aCF und EpiSC hinsichtlich Zellzahl, Vitalität und ausgewählter Oberflächenmarker zu charakterisieren.

### 3.4.1 Durchflusszytometrische Messung

Die für die Durchflusszytometrie isolierten Proben wurden für die Messung in MACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Für die jeweilige Antikörperfärbung wurden Zellen für 15 Minuten bei 4 °C mit dem entsprechenden Antikörper und in Anwesenheit des Lebendtodfarbstoffs 7AAD inkubiert. Da im Rahmen dieser Arbeit zahlreiche Antikörper verwendet wurden, findet sich die eingesetzte Konzentration des jeweiligen Antikörpers in Tabelle 3. Nach der Antikörperfärbung wurden 500 µl MACS-Puffer zu jedem Ansatz hinzugegeben und die Zellen bei 300 g für 7 Minuten zentrifugiert. Für die genutzten unkonjugierten Antikörper war die Inkubation mit einem

sekundären Fluoreszenzgekoppelten Antikörper (siehe Tab. 5) notwendig. Dieser wurde ebenfalls für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert und anschließend mit 500 µl MACS-Puffer verdünnt und zentrifugiert. Intrazelluläre Färbungen wurden in Anwesenheit von 0,2% Saponin mit fixierten Zellen (4% Paraformaldehyd (PFA), 15 Minuten bei RT) durchgeführt. Für die Messung wurden die Zellen in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte an einem FACSCanto™ II Durchflusszytometer (BD Biosciences, San Jose, USA).

### **3.4.2 Analyse und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten**

Die erhobenen durchflusszytometrischen Daten wurden mit Hilfe der FACSDiva™ Software (BD Biosciences, San Jose, USA) ausgewertet. Für die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Signalen innerhalb der Multiparameter-Analyse wurden sogenannte FMO (*Fluorescence minus one*) Kontrollen mitgeführt. Anhand der Signale der FMO-Kontrolle wurden die Analysefenster (*Gate*) ausgerichtet, um die positive Fraktion zu identifizieren.

## **3.5 Zellsortierung**

Für die Aufreinigung der stromalen Zellpopulationen (CF aus Kontrollherzen sowie aCF und EpiSC aus Infarkt Herzen) nach Isolation wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Durchführung von Genexpressionsanalysen über quantitative real-time-PCR (qRT-PCR), Microarray-Analyse oder Einzelzell-Sequenzierung wurden die Zellen mit Hilfe eines Hochgeschwindigkeits-Zellsortierers (Beckman Coulter, Brea, USA) durchflusszytometrisch sortiert (3.5.1). Für die Zellkulturexperimente hingegen wurden die Zellen durch magnetische Depletion aufgereinigt (3.5.2).

### **3.5.1 Durchflusszytometrische Zellsortierung**

Für die Genexpressionsanalysen isolierter Zellen (qRT-PCR, Microarray) wurden vitale (7AAD<sup>-</sup>) Zellen sortiert, die negativ für die Marker CD31 (Endothelzellen) und CD45 (Immunzellen) aber positiv für die Marker CD90.2, MEFSK-4 und PDGFRA waren. Für die Einzelzell-Sequenzierung zur Untersuchung der Zellheterogenität wurden 7AAD<sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen sortiert, um eine mögliche Positivselektion durch die Verwendung bestimmter Marker auszuschließen. Für die Lineage tracing Versuche wurde statt 7AAD, der Lebendtodfarbstoff Fixable Viability Dye eFluor 780 (eBioscience, USA) verwendet, um eine Überlappung von Fluoreszenzsignalen zu vermeiden.

### **3.5.2 Magnetische Zellsortierung und Zellkultur**

Um Kontaminationen durch Mikroorganismen zu vermeiden, wurden alle Zellkulturexperimente an einer sterilen Werkbank (LaboGene, Lillerod, Dänemark) unter Nutzung steriler Glas- und Plastikwaren durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Zur Kultivierung von Primärzellen wurden sterile T25 bzw. T75



Zellkulturflaschen oder 6-, 24-, 48- und 96-Well-Platten (Greiner Bio-One, Essen, Deutschland) verwendet.

Für die Kultivierung wurden die Primärzellen nach Isolation (siehe 3.3) über Mojosort Nanobeads (Biolegend, San Diego, USA) durch magnetische Depletion von CD31<sup>+</sup>- sowie CD45<sup>+</sup>-Zellen aufgereinigt. Die Depletion erfolgte entsprechend des vom Hersteller angegebenen Protokolls. Die daraus resultierende CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Fraktion wurde bei 300 g für 7 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in frischem vorgewärmtem Zellkulturmedium (20% FCS DMEM) resuspendiert und in 6-Well Zellkulturplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen dreimal exzessiv mit PBS gewaschen, um restlichen Zell-Debris zu entfernen. Anschließend wurde 3 ml frisches vorgewärmtes Zellkulturmedium hinzugegeben, welches täglich gewechselt wurde. Ausnahme bildeten EpiSC, die aufgrund ihrer limitierten Zellzahl gleich nach dem Verdau in 6-Well überführt und erst magnetisch depletiert wurden, sobald sie später in T25 Zellkulturflaschen konfluent gewachsen waren. Sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie schnellstmöglich für die geplanten Experimente verwendet oder in größere Zellkulturflaschen überführt. Da längere Kultivierungszeiträume zur Aktivierung der Zellen führen<sup>210</sup>, wurden alle Experimente an Zellkulturen  $\leq$  Passage 2 durchgeführt.

### 3.6 Histologie

Zur Anfertigung histologischer Kryoschnitte des gesunden und infarzierten Herzgewebes wurden Herzen nach der Entnahme aus der Maus mit PBS gewaschen und in KP-Cryo Compound (Klinipath, Duiven, Niederlande) eingebettet und in -40 °C Isopentan weggefroren. Bis zur Nutzung der kryokonservierten Herzen wurden diese bei -80 °C gelagert. Schnitte des Herzens wurden mit einem Kryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden vom Apex bis zur Herzbasis angefertigt und die Schnittdicke betrug 10  $\mu$ m. Bis zur Antikörperfärbung wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert.

Für die Antikörperfärbungen von kultivierten Primärzellen auf Deckgläschen wurden diese nach erfolgreicher Kultivierung trypsiniert, über eine Neubauerzählkammer gezählt und anschließend auf Deckgläschen ausgesät. Dabei wurden jeweils 35.000 Zellen pro Deckgläschen ausplattiert und diese über Nacht im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendet.

### 3.7 Immunfluoreszenz

Zur Anfertigung von Immunfluoreszenzfärbungen wurden kultivierte Zellen oder kryokonservierte Herzschnitte zunächst mit 4% PFA oder Aceton für 15 Minuten bei RT fixiert und anschließend dreimal mit 0,2% Saponin in PBS gewaschen. Saponin führt zur Permeabilisierung der Probe und macht diese zugänglich für die nachfolgende Antikörperfärbung. Anschließend wurde das Probenmaterial für 1 Stunde mit 10% *Normal Goat Serum* (NGS) in 0,2% Saponin in PBS geblockt, um mögliche

unspezifische Bindungen durch anschließend verwendete Antikörper zu minimieren. Danach wurde die Probe mit dem jeweiligen Primärantikörper in der gewünschten Konzentration über Nacht bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Am Morgen des Folgetages wurden die Proben dreimal mit 0,2% Saponin in PBS gewaschen, um sie von nicht gebundenen AK Rückständen zu befreien. Anschließend wurden die Proben mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für 2 Stunden bei RT inkubiert und erneut dreimal gewaschen. Daraufhin wurden die Proben mit ProLong Gold Antifade Mounting Medium mit DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingebettet, womit gleichzeitig Zellkerne angefärbt werden.

Die Aufnahmen der Proben wurden mit einem BX61 Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt und die daraus resultierenden Bildaufnahmen mit der ImageJ/Fiji Software prozessiert<sup>211</sup>. Für die Quantifizierung von Wt-1<sup>+</sup> Zellkernen in kultivierten aCF und EpiSC wurden von jeder Probe drei Aufnahmen an verschiedenen Positionen des Objektträgers mit dem 20x Objektiv aufgenommen. Die Zählung von Wt-1<sup>+</sup> Zellkernen erfolgte über die Anwendung der „*Analyze particles*“ Funktion von ImageJ.

### 3.8 Genexpressionsanalysen

#### 3.8.1 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Über die qRT-PCR kann die relative mRNA Expression innerhalb einer Probe quantifiziert und zu einer Referenzprobe verglichen werden, um Aussagen über die Regulation des betrachteten mRNA-Transkripts zu treffen. Für die Messung wird isolierte mRNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Ausgehend von der cDNA können anschließend spezifische DNA-Fragmente über PCR zyklisch amplifiziert werden<sup>212</sup>. Bei der qRT-PCR kann die Amplifikation über interkalierende Farbstoffe, wie beispielsweise *SYBR-Green* oder fluoreszierende DNA-Sonden (*TaqMan*), sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich sequenzspezifische *TaqMan*-Sonden verwendet. Bei diesem Verfahren hybridisieren die beiden PCR-Primer an einem bestimmten Abschnitt der DNA. Die Sonde trägt einen Reporterfarbstoff am 5'-Ende, welcher durch Laserlicht angeregt werden kann. Durch einen Quencher am 3'-Ende wird gewährleistet, dass die durch die Anregung erzeugte Energie am Reporterfarbstoff aufgrund der räumlichen Nähe strahlungsfrei an den Quencher übertragen wird (Förster-Resonanzenergietransfer), wodurch die Sonde kaum Fluoreszenz emittiert. Wird während der PCR durch die DNA-Polymerase ausgehend vom 3'-Ende des Primers ein neuer DNA-Strang synthetisiert, kommt es durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase zum Abbau der Sonde. Hierdurch wird Fluoreszenz vom Reporterfarbstoff emittiert, da sich kein Quencher mehr in räumlicher Nähe befindet. Das emittierte Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Vervielfältigung der DNA, wodurch die Amplifikation der cDNA visualisiert werden kann. Zu Beginn der PCR liegen nur geringe Mengen cDNA in der Reaktion vor, wodurch das Fluoreszenzsignal zu Beginn geringer als das Hintergrundsignal ist. Durch den exponentiellen Anstieg des Fluoreszenzsignals aufgrund der

voranschreitenden Amplifikation wird das Fluoreszenzsignal detektierbar. Die Zyklenzahl, bei der die gemessene Fluoreszenz erstmalig über dem gesetzten Grenzwert liegt, wird als Ct-Wert (*cycle threshold*) beschrieben. Demzufolge ist der gemessene Ct-Wert bei einer höheren cDNA-Menge zu Beginn der PCR-Reaktion gering, während er bei geringen cDNA-Mengen entsprechend höher ist.

### 3.8.1.1 RNA Isolation, Reverse Transkription und Prä-Amplifikation

Die Isolation der RNA aus CF, aCF und EpiSC erfolgte unmittelbar nach durchflusszytometrischer Sortierung (3.5.1) mit dem RNeasy Microkit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die Isolation erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls.

Aufgrund der begrenzten Zahl an isolierten Zellen, war die isolierte RNA-Konzentration relativ niedrig (~5-20 ng/µl). Aus diesem Grund wurde vor den qRT-PCR-Messungen eine Prä-Amplifikation der RNA mit dem TaqMan™ PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Für die Prä-Amplifikation der Proben wurde eine RNA-Menge von 15 ng pro Probe eingesetzt. Die Durchführung erfolgte entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Lagerung der amplifizierten Proben erfolgte bei -20 °C.

### 3.8.1.2 Genexpressionsanalyse mit *TaqMan* Gen Expressions Assays (96-Well Format)

Für die Messung von mRNA-Transkripten mit einzelnen *TaqMan* Assays wurden die prä-amplifizierten Proben 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die für diese Versuche genutzten *TaqMan* Assays sind in Abschnitt 2.5 in Tabelle 6 gelistet. Pro PCR-Reaktion wurden die Reagenzien entsprechend des Pipettierschemas in Tabelle 8 auf Eis pipettiert. Die Messungen erfolgten mit technischen Duplikaten jeder gemessenen Probe.

**Tabelle 8: Pipettierschema für die Durchführung der qRT-PCR**

| Reagenz                                 | Volumen        |
|---|----------------|
| Master Mix                              | 5 µl           |
| 20x <i>TaqMan</i> Gen Expressions Assay | 0,5 µl         |
| ddH <sub>2</sub> O                      | 3,5 µl         |
| cDNA                                    | 1,0 µl         |
| <b>Gesamtvolumen</b>                    | <b>10,0 µl</b> |

Die Messung der qRT-PCR im 96-Well Format wurde mit dem StepOnePlus™ Real-time PCR Gerät (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. Für die Aktivierung der hitzeabhängigen Meteor Taq-Polymerase wurden die Reaktionsansätze 10 Minuten bei 95 °C erhitzt. Darauf folgend wurde die cDNA bei 95°C für 15 Sekunden denaturiert. Anschließend wurde die Primerhybridisierung bei 60°C für 1 Minute initiiert. Die beiden letzten Schritte wurden zyklisch 40-mal wiederholt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der StepOnePlus™-Software.

### 3.8.1.3 Genexpressionsanalyse mit *TaqMan Microfluidic Cards* (384-Well Format)

Die *TaqMan Microfluidic Cards* mit 384 Reaktionskammern ermöglichen es, bis zu 51 mRNA-Transkripte gleichzeitig zu messen. Die Reaktionskammern der *Microfluidic Card* haben ein Fassungsvermögen von 1 µl und enthalten bereits lyophilisierte Sonden und Primerpaare der zu untersuchenden Gene. Unter Abschnitt 2.5 in Tabelle 7 sind die verwendeten *TaqMan* Assays sowie die endogene Kontrolle tabellarisch aufgeführt. Pro Karte wurden drei Proben mit je zwei technischen Duplikaten gemessen. Für die Analyse wurde die prä-amplifizierte cDNA 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:1 (100 µl + 100 µl) mit dem *TaqMan* Gen Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemischt. Davon wurden jeweils 100 µl des Gemischs in eine Befüllungskammer pipettiert und anschließend bei 331 g zentrifugiert, um eine gleichmäßige Verteilung der Proben über das Kapillarsystem in die Reaktionskammern zu gewährleisten. Anschließend wurden die Platten mit dem *TaqMan* Array Microfluidic Card Sealer versiegelt und mit dem *ViiA 7* Real-Time-PCR-Gerät (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemessen. Die Auswertung wurde mit der *ExpressionSuite* Software v1.0.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

### 3.8.1.4 Auswertung

Für die Auswertung wurde die relative mRNA Expression in der Probe durch Bildung des  $\Delta\text{Ct}$ -Werts über die  $\Delta\text{Ct}$ -Methode<sup>213</sup> genutzt. Dabei wird die gemessene Expression eines Zielgens zu einer gewählten endogenen Kontrolle normalisiert, welche zwischen den Proben unverändert bleiben sollte. Für beide Arten der qRT-PCR (*Microfluidic Cards* sowie *TaqMan* Expressions Assays) wurde *Rplp0* (60S saures ribosomales Protein P0) als endogene Kontrolle gewählt. Zur Quantifizierung wurde von jeder Probe der Ct-Wert für die Zielgene sowie für das Referenzgen bestimmt. Dabei wurde jeweils der Mittelwert aus den Ct-Werten der technischen Duplikate ermittelt. Anschließend wurde die Differenz beider Gene bestimmt, indem der Ct-Wert des Zielgens vom Ct-Wert des Referenzgens subtrahiert wurde, wodurch sich der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert ergab:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Referenzgen}} - \text{Ct}_{\text{Zielgen}}$$

Bei optimaler Effizienz der qRT-PCR-Reaktion verdoppelt sich der DNA-Gehalt bei jedem neuen Reaktionszyklus. Ein Ct-Wert, der um eine Einheit kleiner ist als ein zweiter Ct-Wert, entspricht demnach der doppelten Menge an DNA. Zur Berücksichtigung des exponentiellen Anstiegs wird die relative Expression eines Zielgens zur endogenen Kontrolle demnach als  $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Wert angegeben.

### 3.8.2 Microarray-Analyse

Mit Hilfe eines Microarrays ist es möglich, tausende mRNA-Transkripte innerhalb einer Probe gleichzeitig zu analysieren und diese zu einer bestimmten Bedingung zu vergleichen. Das Prinzip der Microarray-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Dabei wird zunächst die Proben-RNA in cDNA umgeschrieben, bei der fluoreszenzmarkierte Nukleotide in die neu synthetisierte cDNA eingebaut werden. Die somit markierte Proben-cDNA wird anschließend auf den Array gegeben, welcher selbst mit unterschiedlichen Fragmenten einzelsträngiger, fluoreszenzmarkierter DNA beschichtet ist. Durch Bindung der Proben-cDNA an der auf dem Array befindlichen immobilisierten Zielsequenz (Hybridisierung) entsteht eine „Mischfarbe“ beider Fluoreszenzfarbstoffe, die über einen Laserscanner oder einer CCD-Kamera hinsichtlich ihrer Wellenlänge, Fluoreszenzintensität sowie Position auf der Arrayplatte untersucht werden kann. Für jeden Spot erhält man somit einen individuellen Intensitätswert, der in seiner numerischen Größe die relative Menge an gebundener cDNA angibt. Die Intensitätswerte der Spots können im Verhältnis zueinander gesetzt werden, was einen semiquantitativen Vergleich der Genexpression von betrachteter Probe und deren Referenz ermöglicht. Die Durchführung des Microarrays wurde von Herrn Dr. rer. nat. Patrick Petzsch, einem Mitarbeiter des Biologisch-medizinischen Forschungszentrums (BMFZ), durchgeführt.

#### 3.8.2.1 Qualitätskontrolle

Vor der Durchführung des Microarrays wurden die isolierten RNA Proben einer Qualitätskontrolle (QC) durch Kapillarelektrophorese mit dem 2100 Bioanalyzer Assay (Eukaryote Total RNA Pico, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) unterzogen. Die Messung erfolgte entsprechend des vom Hersteller angegebenen Versuchsprotokolls. Der Mittelwert der erhobenen RNA-Integritätsnummern lag bei 9,8 und bestätigte somit eine sehr gute RNA Qualität der Proben. Die individuellen QC-Ergebnisse der einzelnen Proben können der ergänzenden Abb. 2 im Appendix entnommen werden.

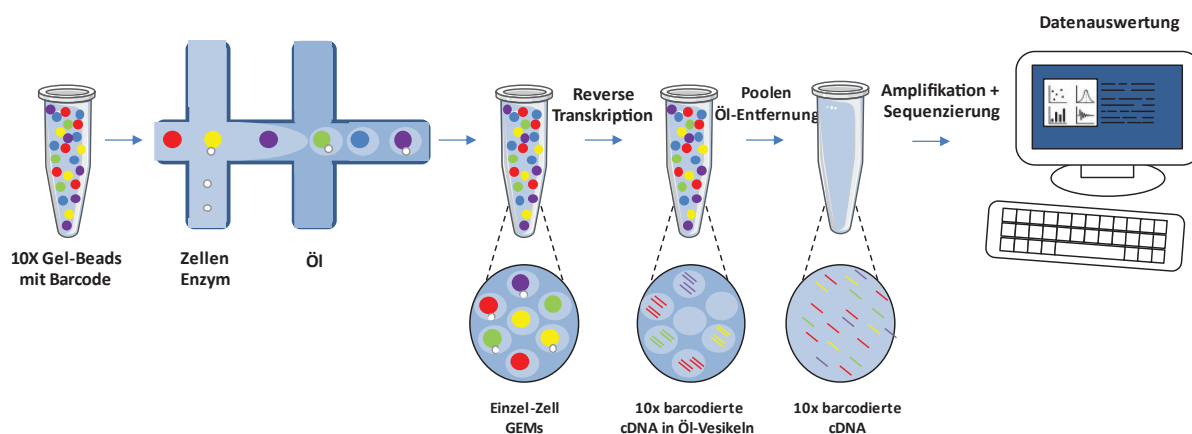
#### 3.8.2.2 Durchführung und Datenverarbeitung

Nach der Qualitätskontrolle wurden die RNA Proben für die Durchführung des Microarrays vorbereitet. Dabei wurde die Synthese der cDNA sowie anschließende Markierung der komplementären RNA (cRNA) mit Biotin entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde 1 ng RNA zunächst in cDNA und anschließend zu cRNA umgeschrieben. Diese wurde daraufhin durch *in vitro* Transkription und Biotin-Markierung zu Biotin-markierter doppelsträngiger cDNA synthetisiert. Nach Fragmentierung wurde die Hybridisierung der markierten cDNA an die Applied Biosystems™ Clariom™ S Mouse Gene Expression Microarrays (Applied Biosystems, Foster City, USA) eingeleitet, welche über 16 Stunden bei 45 °C erfolgte. Anschließend wurden die Arrays mit Streptavidin/Phycoerythrin-Konjugaten inkubiert und der Scan des Arrays entsprechend des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Die anschließende Datenanalyse erfolgte mit der GeneSpring GX Software (Vers. 12.5; Agilent technologies, Santa Clara, USA). Zur Reduktion der Interarray-Variabilität wurde eine Quantil-Normalisierung der Signalintensitäten der Sonden über alle Proben hinweg mit Hilfe des ExonRMA16 Algorithmus der GeneSpring Software durchgeführt. Die Datenprozessierung erfolgte durch Transformation der Basislinie (*Baseline*) zum Median aller Proben. Nach Gruppierung der biologischen Replikate wurden nur Sondenpaare über einen paarweisen Test miteinander verglichen, die in einer der drei Bedingungen (CF, aCF, EpiSC) ein Fluoreszenzsignal zeigten, das über dem detektierten Hintergrundsignal lag. Differentielle Genexpression wurde statistisch über Durchführung des Student's t-Test bestimmt. Die resultierenden p-Werte wurden anschließend über die Bonferroni-Korrektur korrigiert. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant definiert. Weitere Analysen der Daten wurden mit Hilfe der Ingenuity Pathway Analysis Software durchgeführt (Qiagen Inc. 2016).

### 3.8.3 Einzelzell-Sequenzierung

Bei der Einzelzell-Sequenzierung werden zuvor isolierte Einzelzellsuspensionen gemeinsam mit Gel-Beads in einer Öl-haltigen Emulsion (Gel-Bead in Emulsion, GEM) inkubiert. Hierdurch bilden sich separate Reaktionsvesikel, die je einen Gel-Bead und eine Zelle enthalten. Der Gel-Bead ist mit Oligonukleotiden beladen, welche aus Primern für die cDNA-Synthese und individuellen Barcodes bestehen. Innerhalb der Reaktionsvesikel wird durch Reverse Transkription cDNA generiert, die mit den individuellen Barcodes des Gel-Beads markiert ist. Zur Nachverfolgung der generierten Sequenzen ist jede synthetisierte cDNA einer Zelle mit zwei Barcodes markiert. Dazu zählt ein Zell-spezifischer Barcode, über den alle generierten cDNAs einer Zelle nachverfolgt werden können sowie eine zweite Sequenz, welche die cDNAs mit Abstammung vom gleichen mRNA Molekül markiert. Diese Markierungssequenzen werden *Unique Molecular Identifier* (UMI) genannt. Die markierte cDNA wird anschließend amplifiziert und sequenziert. Das Prinzip ist in Abb. 6 zusammengefasst.



**Abbildung 6: Prinzip der Einzelzell-Sequenzierung über das 10X Genomics Chromium System.** Als Vorlage für die Abb. wurde eine Illustration auf der Firmenwebsite von 10x Genomics verwendet, die nach Salomon et al. modifiziert<sup>214</sup> wurde. GEM = Gel-Bead in Emulsion.

### 3.8.3.1 Probenaufbereitung und Datenprozessierung

Die Sequenzierung der durchflusszytometrisch sortierten Einzelzell-Suspensionen erfolgte über das 10X Genomics Chromium System (10X Genomics Inc., Pleasanton, USA). Vor Durchführung der Sequenzierung wurde die Zellvitalität und Zellzahl über Trypanblau-Färbungen bestimmt. Anschließend wurden abhängig von der Zellvitalität jeweils 2.000 - 20.000 Zellen als Inputmenge für das System genutzt. Über das Chromium Single Cell 3' Reagent Kit v3 wurden anschließend die Einzelzell-Genbibliotheken generiert. Der Versuchsablauf erfolgte dabei entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Sequenzierung wurde mit dem HiSeq 3000 Sequencing System (Illumina Inc., San Diego, USA) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die durchschnittliche Sequenzierungsdichte betrug ~70.000 Reads/Zelle für CF und aCF und ~90.000 Reads/Zelle für EpiSC. Die unterschiedlichen Readzahlen waren notwendig um eine vergleichbare Sequenzierungs-Sättigung von etwa ~70 % zu erreichen. Die Rohdaten der Sequenzierung wurden anschließend mit der 10X Genomics CellRanger Software (v.3.0.3) prozessiert. Die daraus resultierenden BCL-Dateien wurden über ihre Barcodes wieder den ursprünglichen Proben zugeteilt und daraufhin über die CellRanger *mkfastq* Pipeline zu Fastq-Dateien verarbeitet. Ausrichtung der Reads an dem mm10 Genom und Zählung der *Unique Molecular Identifiers* (UMI) wurden über die CellRanger *count* Pipeline durchgeführt, um eine Gen-Barcode Matrix zu generieren.

### 3.8.3.2 Filterung und Clustering der Datensätze

Die weitere Analyse wurde mit dem Seurat v3.0 R Paket<sup>215</sup> durchgeführt. Bei der Qualitätskontrolle wurden alle Zellen mit weniger als 200 detektierten Genen sowie Gentranskripte, die in weniger als drei Zellen detektiert wurden, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Zellen mit einer unverhältnismäßig hohen Kartierungsrate zum mitochondrialen Genom ausgeschlossen, da diese geschädigte bzw. tote Zellen repräsentieren. Die Normalisierung der Daten erfolgte durch die *SCTransform* Funktion. Die biologischen Replikate wurden gemeinsam in einen Datensatz integriert indem sogenannte "*anchors*" identifiziert wurden, welche paarweise Übereinstimmungen zwischen zwei Zellen des individuellen Datensatzes darstellen. Diese "*anchors*" wurden anschließend dazu genutzt, die Datensätze zu harmonisieren und Informationen des einen Datensatzes auf den anderen zu transferieren. Die Dimensionsreduktion erfolgte durch eine Hauptkomponentenanalyse bei der unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert und unmittelbar in einen UMAP-Plot (*Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*) eingebettet wurden. Die Zellen wurden über einen Graph-basierten Clustering Ansatz der Seurat v3.0 Software geclustert. Differentielle Genexpression zwischen den Clustern wurde über die Nutzung eines in der Seurat Software integrierten zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test kalkuliert. Dubletten wurden über das „*DoubletFinder*“ Tool (v2.0.2)<sup>216</sup> identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen. Die Erstellung der Heatmaps erfolgte über die Nutzung von Morpheus

(<https://software.broadinstitute.org/morpheus>). Die Suche nach GO-Annotation erfolgte über die Nutzung der *Gene ontology enrichment analysis and visualization* (GORilla) Plattform<sup>217</sup>.

### 3.8.3.3 Suche neuer Transkriptionsfaktoren

Für die Identifikation neuer Transkriptionsfaktoren wurde zunächst eine Referenzliste aller bekannten Transkriptionsfaktoren der Maus von der *Animal transcription factor data base* (AnimalTFDB 3.0)<sup>218</sup> bezogen, um anschließend die Expression der Transkriptionsfaktoren manuell im Datensatz der EpiSC und aCF zu überprüfen. Zur Vereinfachung wurden die individuellen Expressionswerte jedes Clusters entsprechend der Populationsgröße gewichtet und daraus Mittelwerte gebildet. Anschließend wurden anhand dieser Mittelwerte *Foldchanges* zwischen den Mittelwerten der EpiSC und der aCF Fraktion generiert. Transkriptionsfaktoren mit starken *Foldchanges* zwischen EpiSC und aCF wurden anschließend auf ihre individuelle Expression in den einzelnen Clustern überprüft.

## 3.9 RNA *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung können Nukleinsäuren in einem histologischen Präparat nachgewiesen werden. Dabei werden Sonden eingesetzt, die eine komplementäre Sequenz zu der Ziel-RNA aufweisen und somit an diese binden (Hybridisierung). Durch die Markierung mit der Sonde kann anschließend die Lokalisation der RNA im Schnitt über Mikroskopie untersucht werden.

Die Detektion ausgewählter Marker Gene wurde mit Hilfe der RNA *in situ* Hybridisierung über das RNAscope 2.5 HD Detection Kit Assay – RED (Advanced Cell Diagnostics, USA) durchgeführt<sup>219</sup>. Hierzu wurden kryokonservierte Herzschnitte von infarzierten Herzen 5 Tage nach Infarkt mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt. Die darauffolgende Fixierung und Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Inkubationszeit für die Hybridisierung wurde auf 120 Minuten erhöht, um eine Signalverstärkung zu erzielen. Die Aufnahmen der Hybridisierungsproben wurden mit einem Durchlichtmikroskop (BX61 Olympus, Deutschland) durchgeführt und die Bilder anschließend mit der ImageJ/Fiji Software<sup>211</sup> prozessiert.

## 3.10 Western Blot

Die Western Blot Analyse ermöglicht einen immunologischen Nachweis von Proteinen innerhalb einer Probe nach Durchführung einer Gelelektrophorese. Die aufgetrennten Proteine werden dabei von dem Polyacrylamid-Gel mit Hilfe von Elektroblothing auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und anschließend über Primärantikörper, die gegen das Protein von Interesse gerichtet sind, nachgewiesen. Die eigentliche Detektion erfolgt daraufhin durch einen Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Anschließend kann das Fluoreszenzsignal in einem Imaging System erfasst werden und über die gemessenen Signalintensitäten Aussagen über die



Proteinkonzentration des jeweiligen Proteins getroffen werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals hängt dabei von der Menge des gebundenen Sekundärantikörpers an den Primärantikörper ab. Diese ist wiederum abhängig von der Menge des an die Membran gebundenen, untersuchten Proteins. Somit lassen sich von der detektierten Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf die Menge des in der Probe enthaltenen Proteins ziehen.

Zum Nachweis des Panx1 Proteins wurde ein Western Blot mit isolierten Proteinlysaten aus kultivierten CF und aCF durchgeführt. Dazu wurden CF bzw. aCF in 6-Well-Platten ausgesät und nach dem Erreichen der Konfluenz dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 300 µl RIPA-Puffer bei 4°C unter Schwenken für 30 Minuten. Durch darauffolgende Zentrifugation bei 14.000g für 5 Minuten wurden Zelltrümmer entfernt und der Überstand als Lysat abgenommen. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde mit einem BCA-Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt, anschließend jeweils 5 µg jeder Probe reduziert und dann in die Kammern der SDS-PAGE aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet, die anschließend mit dem Odyssey® Blocking Buffer (Li-cor, Lincoln, USA) für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert wurde. Die Inkubation mit dem Panx1 Antikörper (1:1000) erfolgte über Nacht bei 4 °C in der Blockierlösung. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 mal mit PBS-T gewaschen und mit einem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (1:10000) in der Blockierlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden danach mit dem Odyssey® CLx Imaging System (Li-cor, Lincoln, USA) detektiert. Die detektierten Signalintensitäten wurden zur Gesamtproteinkonzentration in der aufgetragenen Probe normalisiert. Dazu wurde nach dem Nachweis des Proteins die totale Proteinkonzentration über Anwendung des Revert™ 700 Total Protein Stain Kits (Li-cor, Lincoln, USA) bestimmt. Die Nutzung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Auswertung erfolgte mit der Image Studio Lite Software (Li-cor, Lincoln, USA).

### **3.11 Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (HPLC)**

Zur Bestimmung der extrazellulären ATP Konzentration im Zellkulturmedium wurde die Hochdruck Flüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) genutzt. Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz (in diesem Falle das Kulturmedium) gemeinsam mit einem Elutionsmittel (mobile Phase) über eine Trennsäule (stationäre Phase) läuft. Die in dem Kulturmedium beinhaltenen Moleküle wechselwirken unterschiedlich stark mit der stationären Phase, wodurch sich für die einzelnen Moleküle unterschiedliche Zeiten für das Durchlaufen der Säule (Retentionszeit) ergeben. Am Ende der Säule können die Eluate dann über einen Detektor erfasst und über ihre spezifische Retentionszeit zugeordnet werden.

### 3.11.1 Messung des ATP-Abbaus

Zur Messung des extrazellulären ATP-Abbaus wurden CF, aCF sowie EpiSC in 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert (35.000 Zellen pro Well). Am Folgetag wurden die Zellen zunächst dreimal vorsichtig mit 500 µl vorgewärmten HBSS Puffer gewaschen, um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Danach wurden 300 µl HBSS-Puffer mit 20 µM ATP (Sigma-Aldrich) auf die Zellen gegeben und diese bei 37°C inkubiert. Nach 5, 10, 20 und 40 Minuten wurden jeweils 20 µl des Überstands abgenommen und dieser in der HPLC gemessen. Das Injektionsvolumen für die HPLC Messung betrug 5 µl. Die Separierung der Purinverbindungen erfolgte entsprechend eines publizierten Protokolls<sup>220</sup> durch einen linearen Gradienten von Puffer A und Puffer B (siehe 2.3; Tabelle 2) unter Nutzung eines niedrig-Druck-Gradienten-Misch-Systems. Die Absorption wurde vom Detektor bei 254 nm gemessen.

### 3.11.2 Messung der ATP-Freisetzung

Zur Messung der ATP-Freisetzung aus CF und aCF wurden Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert (35.000 Zellen pro Well). Am Folgetag wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit 500 µl vorgewärmten HBSS-Puffer gewaschen, um Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Danach wurden 300 µl HBSS-Puffer, in dem 40 µM Spironolactone bzw. DMSO gelöst waren auf die Zellen gegeben und diese bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert, damit möglicherweise durch den Mediumswechsel freigesetztes ATP von den purinergen Enzymen degradiert wird. Nach 20 Minuten wurden jedem Versuchsansatz 100 µM POM-1 zugesetzt, welches den ATP-Abbau durch Hemmung der ENTPDase Aktivität blockiert. Nach weiteren 20 Minuten Inkubationszeit wurden von jeder Probe 150 µl des Überstands abgenommen, um die Basalrate des ATPs im Überstand zu bestimmen. Anschließend wurden die Zellen durch tropfenweise Zugabe von 150 µl frischem HBSS-Puffer mechanisch stimuliert und erneut 150 µl des Überstands für die Messungen abgenommen. Anschließend wurden die Proben der unstimulierten und stimulierten Zellen in der HPLC gemessen. Das Injektionsvolumen für die HPLC Messung betrug 5 µl. Die Separierung der Purinverbindungen erfolgte entsprechend eines publizierten Protokolls<sup>220</sup> durch einen linearen Gradienten von Puffer A und Puffer B (siehe 2.3; Tabelle 2) unter Nutzung eines niedrig-Druck-Gradienten-Misch-Systems. Die Absorption wurde vom Detektor bei 254 nm gemessen.

## 3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Datenauswertung wurde mit den Programmen Graphpad Prism, Microsoft Excel 2007, Seurat 3.0 oder Genespring durchgeführt. Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Die zur Ermittlung signifikanter Unterschiede angewendeten Tests werden direkt im Zusammenhang mit dem Versuch in der dazugehörigen Legende angegeben. p-Werte  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen

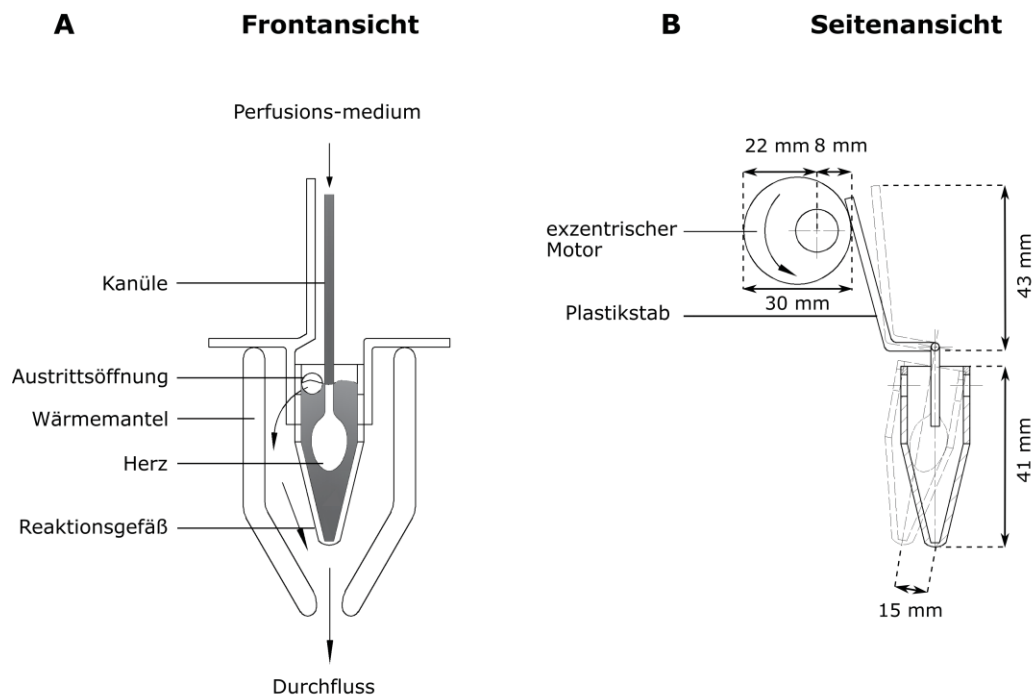
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung einer neuen Methode zur simultanen Isolation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherzen

Zur Charakterisierung von aCF und EpiSC wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode etabliert, die erstmals die simultane Isolation beider Zelltypen aus dem infarzierten Mäuseherzen ermöglichte. Der schematische Aufbau der Isolations-Apparatur ist in Abb. 7 illustriert. Um eine effiziente Separation von aCF und EpiSC zu erzielen, wird bei der Methode die unterschiedliche anatomische Lokalisation der beiden Zelltypen im Herzen genutzt. Dazu wird das Herz mit einer Langendorff-Apparatur retrograd für 8 Minuten über die Koronargefäße mit Kollagenase-Lösung (1200 U/ml) bei konstantem Fluss (2 ml/Minute) perfundiert, um somit Zell-Zell-Kontakte enzymatisch aufzulösen. Gleichzeitig wird das Herz in einem 5 ml Reaktionsgefäß platziert, das mit 2 ml Kollagenaselösung gefüllt ist und während des Verdauzeitraums kontinuierlich über ein motorbetriebenes System geschwenkt wird (80 rpm). Durch die kontinuierliche Bewegung werden moderate Scherkräfte auf die Herzoberfläche ausgeübt und die stromalen Zellen des Epi-/Subepikards (EpiSC) schonend abgelöst. Durch den ständigen Zufluss von neuer Kollagenase über eine Rollerpumpe, kommt es während der Perfusion zum Anstieg des Flüssigkeitsspiegels innerhalb des Reaktionsgefäßes, welcher schließlich über die Öffnungen an der Oberkante des Gefäßes austritt und aufgefangen werden kann. Der aufgefangene Durchfluss enthält die von der Oberfläche abgetragenen EpiSC und kann für die geplanten Versuche genutzt werden.

Um nach dem enzymatischen Verdau und der Depletion von EpiSC auch aCF aus dem Myokard zu isolieren, wird das Herz von der Apparatur genommen und frei von Vorhöfen und Aorta präpariert. Anschließend wird das verdaute Gewebe in 20% FCS DMEM überführt, dissoziiert und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren in Einzelzellsuspension gebracht. Durch darauffolgende Zentrifugation (1 Minute, 55 g) werden die Kardiomyozyten pelletiert, wodurch die Nicht-Kardiomyozyten-Fraktion (enthält die aCF) im Überstand angereichert wird und für Analysen zur Verfügung steht. CF aus nicht infarzierten Herzen dienten als Kontrollen und wurden ebenfalls durch retrograde Perfusion und anschließende Zentrifugation der erhaltenen Einzelzellsuspension isoliert. Da das Epikard unter basalen Bedingungen lediglich eine Einzelzellschicht darstellt, wurden in Kontrollherzen keine Scherkräfte auf die Herzoberfläche ausgeübt, um das Risiko zu minimieren, dass tiefer liegende Gewebsschichten abgelöst werden.

Vor den Versuchen wurden die Zellisolate (CF, aCF, EpiSC) entsprechend des unter 3.3.1 geschilderten Protokolls entweder durch magnetische Bead-Depletion oder Fluoreszenzaktivierte-Zellsortierung aufgereinigt, um Immunzellen (CD45<sup>+</sup>) und Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>) zu entfernen. Detaillierte Angaben zum Versuchsablauf sowie Illustrationen des Langendorff-Aufbaus sind im Material und Methodenteil (Punkt 3.3) sowie im Appendix (ergänzende Abb. 1) erläutert.

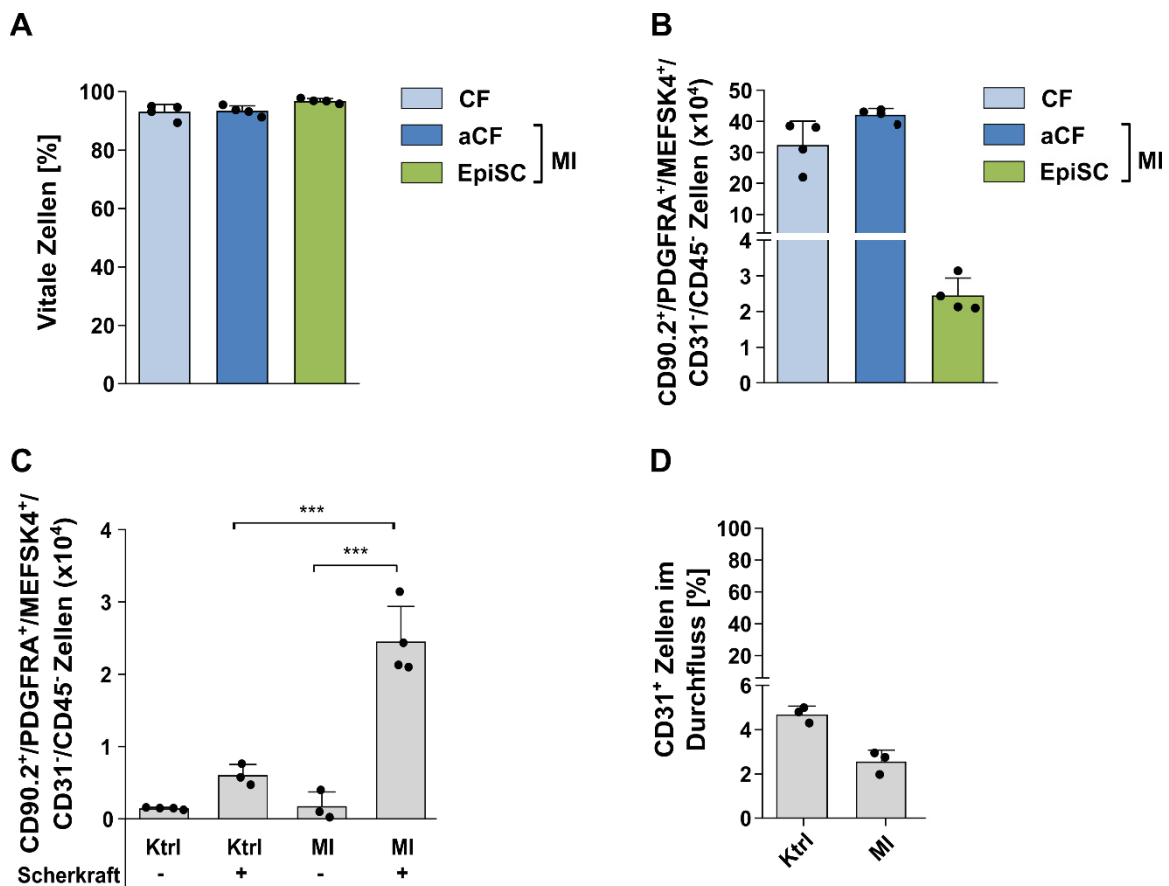


**Abbildung 7: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Isolation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherzen.** (A) Front- und (B) Seitenansicht des experimentellen Aufbaus. Während der Perfusion wird das isolierte Herz in einem mit Kollagenaselösung gefüllten 5 ml Reaktionsgefäß platziert, das von einem Wärmemantel umgeben ist (37 °C). Dabei wird ein an dem Gefäß platzierter Plastikstab kontinuierlich (80 rpm) von einem exzentrischen Motor angestoßen (schematisch in der Seitenansicht (B) gezeigt), wodurch das Gefäß sich etwa 15 mm von seiner Ursprungsposition entfernt und durch die erzeugte Bewegung, Scherkräfte auf das Herz ausübt und die EpiSC ablöst. Durch konstanten Zufluss des Perfusionsmedium tritt die Flüssigkeit, in der sich die abgelösten EpiSC befinden, durch die beiden Austrittslöcher (Durchmesser: 2 mm) an der oberen Kante des Gefäßes aus und wird zur Isolation der Zellen aufgesammelt. Das Herz wird nach Verdau entfernt, um auch die aCF aus dem myokardialen Gewebe zu isolieren. Die Anfertigung des Motors und des Reaktionsgefäßes erfolgte durch Herrn Stefan Schätz aus der Werkstatt der Physiologie an der HHU. Fotoaufnahmen des Aufbaus finden sich im Appendix (ergänzende Abb. 1).

## 4.2 Validierung der Methodik

Um sicher zu stellen, dass die Isolationstechnik eine effiziente Anreicherung von aCF und EpiSC gewährleistet, wurde die Methode zunächst durchflusszytometrisch validiert. Für die Versuche wurden stromale Zellen des nicht-infarzierten myokardialen Gewebes (CF), des infarzierten myokardialen Gewebes (aCF) sowie Zellen des infarzierten epikardialen Gewebes (EpiSC) analysiert, die positiv für die Marker CD90.2, *Platelet-derived growth factor receptor alpha* (PDGFRA), MEFSK-4 und negativ für den Lebendtod-Farbstoff 7AAD sowie für CD31 (Endothelzellen) und CD45 (Immunzellen) waren (siehe 3.4).

Die Analyse zeigte, dass über 90% der isolierten Zellen innerhalb der Populationen vital waren: CF:  $93,1 \pm 1,3\%$ , aCF:  $93,5 \pm 0,8\%$ , EpiSC:  $96,8 \pm 0,4\%$  (Abb. 8A). Insgesamt konnten mit dem Protokoll  $323.800 \pm 38.600$  CF aus dem nicht-infarzierten Herzen sowie  $420.500 \pm 10.500$  aCF aus dem Myokard und  $24.500 \pm 2.430$  EpiSC aus dem Epi-/Subepikard isoliert werden (Abb. 8B).

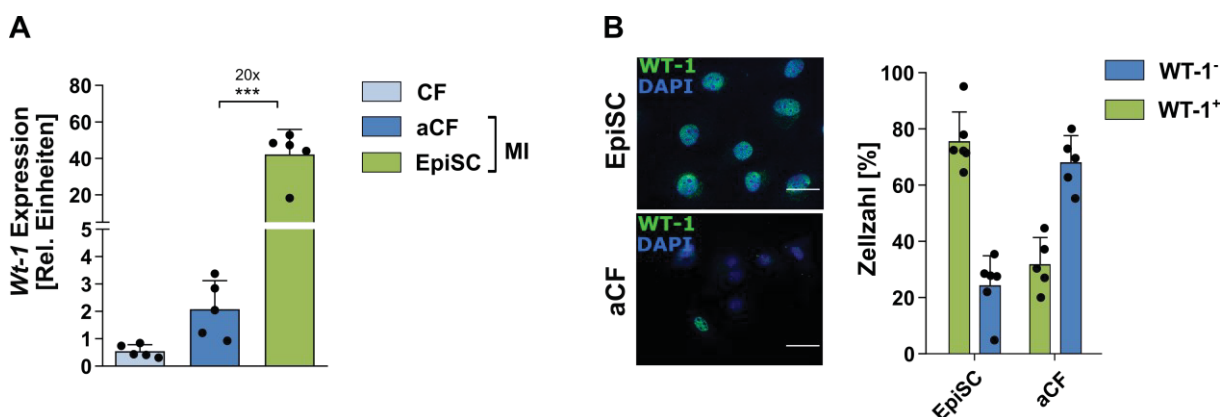


**Abbildung 8: Validierung der Isolationstechnik über Durchflusszytometrie.** (A) Bestimmung der Zellvitalität isolierter CF aus nicht-infarzierten Herzen sowie aCF und EpiSC aus Herzen 5 Tage nach Infarkt durch *Gating* auf vitale (7AAD<sup>-</sup>), CD90.2<sup>+</sup>/PDGFRA<sup>+</sup>/MEFSK-4<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen (n=4). (B) Zellzahl vitaler CF, aCF und EpiSC pro Herz bei *Gating* auf CD90.2<sup>+</sup>/PDGFRA<sup>+</sup>/MEFSK-4<sup>+</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen (n=4). (C) Bestimmung der Zellzahl an EpiSC im aufgefangenen Durchfluss, von nicht infarzierten (Ktrl) und infarzierten Herzen (MI) mit (+) bzw. ohne (-) den Einfluss von Scherkräften (n=3-4). (D) Prozentualer Anteil CD31<sup>+</sup>-Zellen im aufgefangenen Durchfluss von Ktrl und MI Herzen (n=3). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* ermittelt. \*\*\*p>0,001.

Zur Überprüfung, ob EpiSC durch die Wirkung von Scherkräften effizient im aufgefangenen Durchfluss angereichert werden, erfolgten durchflusszytometrische Messungen, bei der die Zahl abgetragener Zellen aus nicht-infarzierten (Ktrl) sowie infarzierten Herzen (MI) jeweils mit und ohne den Einfluss von Scherkräften bestimmt wurde. Der Vergleich der beiden Bedingungen zeigte, dass durch die Einwirkung von Scherkräften sowohl in Ktrl als auch in MI Herzen deutlich mehr Zellen abgetragen werden (Abb. 8C). Nach Infarkt befanden sich jedoch signifikant mehr Zellen im Durchfluss als unter Kontrollbedingungen (MI+Scherkräfte:  $24.540 \pm 2.427$  Zellen vs. Ktrl+Scherkräfte:  $1.755 \pm 1.619$  Zellen). Aus vorangegangenen Arbeiten des Instituts ist bekannt, dass das Epikard im Vergleich zum Myokard weniger stark vaskularisiert ist<sup>89</sup>. Der Anteil CD31<sup>+</sup>-Zellen im aufgefangenen Durchfluss gibt somit indirekt Aufschluss darüber, ob die Prozedur auch stärker vaskularisiertes myokardiales Gewebe abträgt. Die durchflusszytometrische Analyse des Durchflusses zeigte, dass die Zahl CD31<sup>+</sup>-Zellen sowohl in Ktrl als auch in MI Herzen mit einem prozentualen Anteil von  $4,7 \pm 0,2\%$  und  $2,4 \pm 0,4\%$

sehr gering war. Es ist daher anzunehmen, dass durch den Einfluss von Scherkräften keine bzw. nur eine vernachlässigbar kleine Zahl an Zellen aus tieferliegenden Gewebsschichten abgetragen wird (Abb. 8D).

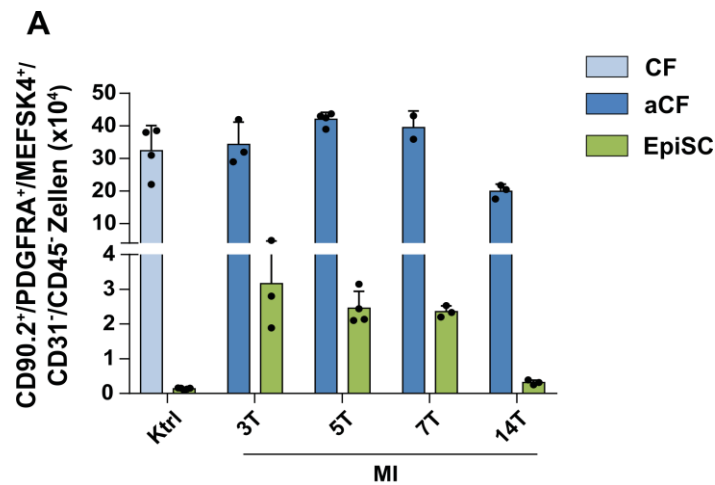
Um darüber hinaus zu testen, ob die von der Herzoberfläche abgetragenen Zellen epi-/subepikardialer Herkunft sind, wurde mRNA aus CF, aCF und EpiSC isoliert und die Expression des etablierten epi-/subepikardialen Markers *Wt-1* über qRT-PCR gemessen (Abb. 9A). Während CF und aCF *Wt-1* nur schwach exprimierten, konnte innerhalb der EpiSC-Fraktion eine 20-fach höhere Expression des mRNA-Transkripts detektiert werden (Abb. 9A). Dies lässt darauf schließen, dass die durch Scherkräfte angereicherte EpiSC Fraktion überwiegend Zellen des aktivierten Epikards enthält. Diese Ergebnisse konnten auch über Immunfluoreszenzfärbungen in kultivierten aCF und EpiSC auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 9B). Während  $75,8 \pm 9,5\%$  der Zellen in der EpiSC Fraktion WT-1 exprimierten, war die Zahl WT-1<sup>+</sup>-Nuklei in der aCF Fraktion mit einem prozentualen Anteil von  $31,9 \pm 8,4\%$  deutlich geringer (Abb. 9B). Folglich ermöglicht die Methode eine effiziente Anreicherung von WT-1<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der EpiSC-Fraktion sowie die gleichzeitige Reduktion von WT1<sup>+</sup>-Zellen innerhalb der aCF-Fraktion.



**Abbildung 9: Validierung der Isolationstechnik über qRT-PCR und Immunfluoreszenz.** (A) qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA Expression von *Wt-1* in CF, aCF und EpiSC (n=5). (B) Immunfluoreszenz von WT-1 in kultivierten aCF und EpiSC sowie Quantifizierung der WT-1<sup>+</sup> Zellkerne (n=2). Größenbalken: 20  $\mu$ m. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* ermittelt. \*\*\*p>0,001.

Da die Heilungsphase nach Infarkt einen dynamischen Prozess darstellt, wurde zusätzlich geprüft, ob eine effiziente Isolation der Zellpopulationen auch zu anderen Zeitpunkten nach Infarkt möglich ist. Dazu wurden Zellen entsprechend der beschriebenen Methodik (Punkt 3.3) neben Tag 0 (nicht infarziert (CF)) und Tag 5 auch an Tag 3, 7 und 14 nach Infarkt isoliert und die Zellzahl durchflusszytometrisch bestimmt. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, können sowohl 3 Tage (aCF:  $343.333 \pm 55.577$  Zellen; EpiSC:  $31.616 \pm 12.172$  Zellen) als auch 7 Tage (aCF:  $395.337 \pm 36.111$  Zellen; EpiSC:  $23.573 \pm 1.354$  Zellen) nach Infarkt vergleichbare Zellzahlen wie an Tag 5 (aCF:  $420.500 \pm 10.500$ ; EpiSC:  $24.500 \pm 2.430$  Zellen) aus Myokard und Epi-/Subepikard gewonnen werden. Nach 14 Tagen war eine effiziente Anreicherung der EpiSC jedoch nicht mehr möglich (EpiSC:  $3.188 \pm 542$  Zellen) und auch die Zahl isolierter aCF lag etwas niedriger (aCF:  $199.667 \pm 17.556$  Zellen). Die geringe EpiSC ist durch die

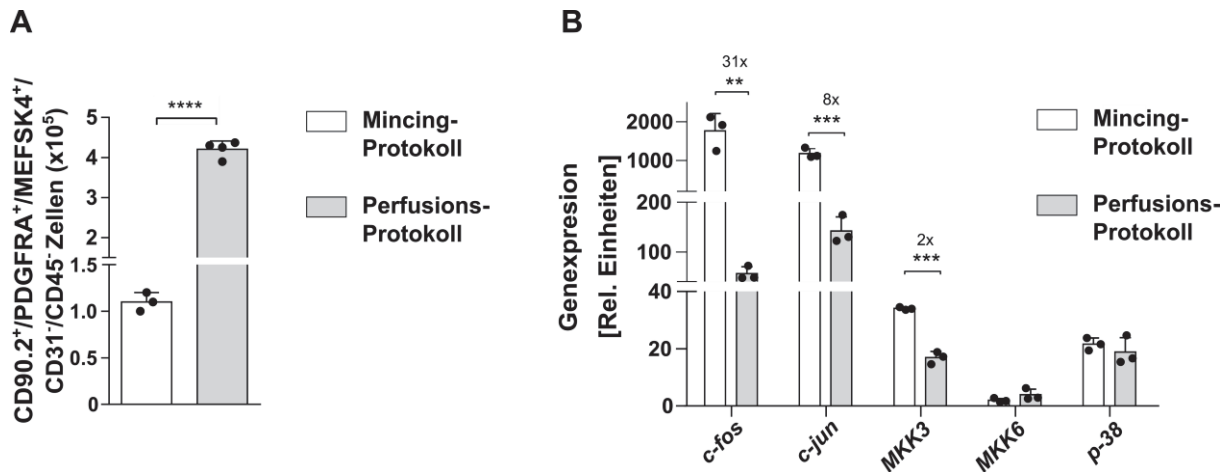
zunehmende Fibrosierung des Epikards zu erklären, die ein Abtragen der Zellen erschwert. Durch die einsetzende Heilungsphase nach Infarkt geht zudem ein Teil der aCF in Apoptose über<sup>74</sup>, wodurch sich die niedrigere Zahl an isolierten aCF nach 14 Tagen erklärt.



**Abbildung 10: Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzahl isolierter CF, aCF und EpiSC aus nicht infarzierten Herzen (Ktrl) und Infarkt Herzen 3, 5, 7 und 14 Tage (T) nach Infarkt (MI) pro Maus Herz (n=2-4). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD.**

Zuletzt wurde das neu etablierte Perfusions-Protokoll mit einem in der Literatur beschriebenen Mincing-protokoll für die Isolation von aCF<sup>108</sup> hinsichtlich der Zellausbeute und der Expression früher Stress-assoziiertes mRNA-Transkripte verglichen (Abb. 11). Beim Mincing-Protokoll wird das Herz mechanisch zerkleinert und anschließend über einen Zeitraum von 40 Minuten enzymatisch verdaut, während das Perfusionsprotokoll keine mechanische Zerkleinerung erfordert und lediglich 8 Minuten Verdauzeit benötigt. Für den Vergleich wurde die Zellzahl isolierter aCF 5 Tage nach Infarkt durchflusszytometrisch bestimmt und anschließend mRNA aus den Zellen für qRT-PCR-Messungen isoliert, um frühe Stress-assoziierte mRNA-Transkripte in den Proben zu messen.

Aus Abb. 11A wird ersichtlich, dass die Zahl isolierter aCF bei Nutzung des Perfusions-Protokolls im Schnitt 4-fach höher lag als die Zahl der isolierten Zellen bei Anwendung des Mincing-Protokolls (110.000  $\pm$  5.774 Zellen vs. 420.500  $\pm$  10.500 Zellen). Die qRT-PCR zeigte darüber hinaus, dass die Isolation über die herkömmliche Mincing-Methode zu einer signifikant höheren Expression der Stress-assoziierten mRNA-Transkripte *c-fos*, *c-jun* und *mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3)* in den aCF führte (Abb. 11B). Folglich induziert das Mincing-Protokoll eine stärkere Stress-Antwort in den aCF als das neu etablierte Perfusions-Protokoll, wodurch sich der native Zustand der Zellen während der Isolation verändern kann.



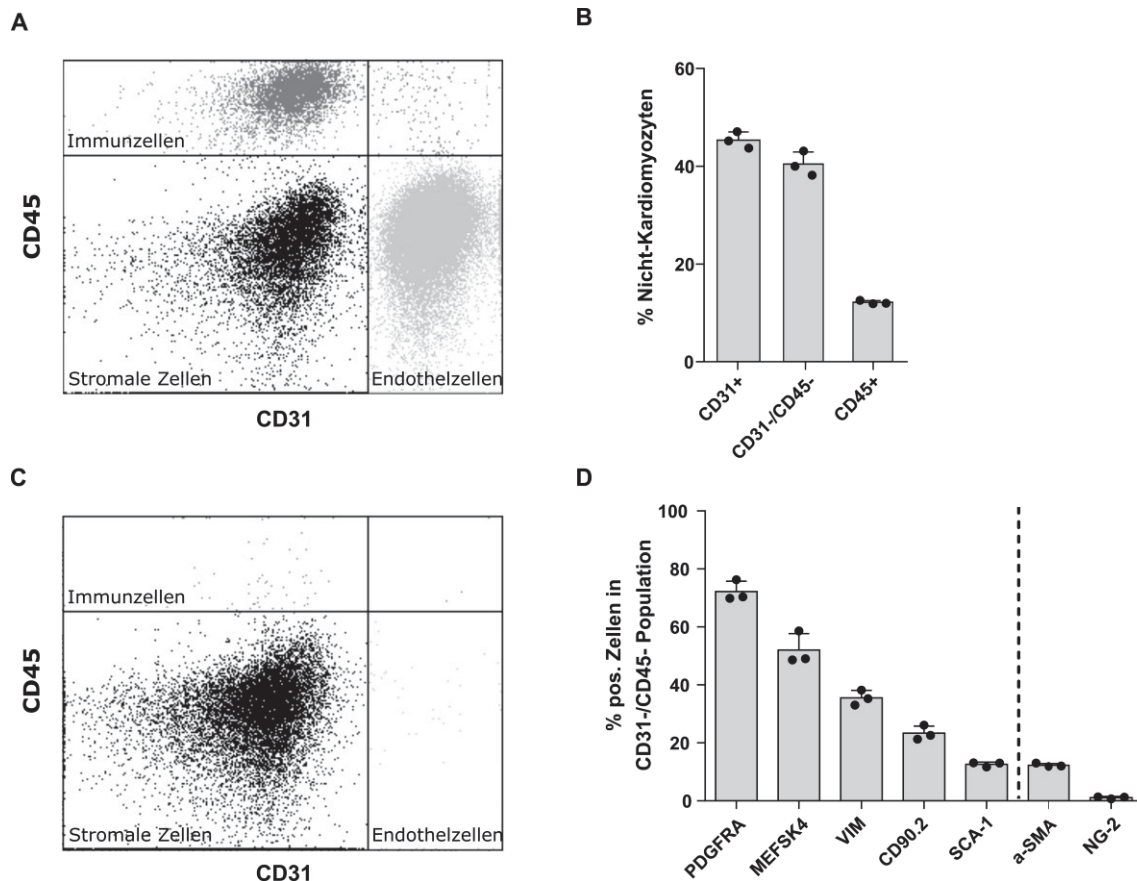
**Abbildung 11: Vergleich von Zellausbeute und Expression Stress-assoziiierter mRNA-Transkripte bei Isolation der aCF über das Mincing- oder des neu etablierte Perfusions-Protokoll aus Herzen 5 Tage nach Infarkt.** (A) Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellausbeute nach Infarkt bei Isolation der Zellen über ein kürzlich publiziertes Mincing-Protokoll<sup>108</sup> oder das Perfusions-Protokoll. *Gegatet* wurde auf vitale (7AAD<sup>-</sup>), CD90.2<sup>+</sup>/PDGFRA<sup>+</sup>/MEFSK4<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen (n=3-4). (B) Expression Stress-assoziiierter mRNA-Transkripte in aCF, die über das Mincing-protokoll oder das Perfusions-Protokoll isoliert wurden (n=3-4). Die statistische Signifikanz wurde über den Student's t-Test bestimmt. \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01.

### 4.3 Zelluläre Zusammensetzung der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion

Nach erfolgreicher Methodenetablierung wurde die zelluläre Zusammensetzung der Nicht-Kardiomyozyten-Fraktion unter Basalbedingungen sowie die Expression verschiedener zellspezifischer Marker innerhalb dieser Fraktion durchflusszytometrisch untersucht. Wie im repräsentativen Dot-Plot (Abb. 12A) und dem zugehörigen Balkendiagramm (Abb. 12B) erkenntlich wird, bilden CD31<sup>+</sup>-Zellen mit einem prozentualen Anteil von  $45,3 \pm 1,4\%$  den Großteil der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion im gesunden Herzen. Der prozentuale Anteil von CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen, hier kollektiv als myokardiale stromale Zellen bezeichnet, war hingegen mit  $40,1 \pm 2,0\%$  etwas niedriger. Die Zahl CD45<sup>+</sup>-Zellen lag unter basalen Bedingungen bei  $12,2 \pm 0,3\%$  (Abb. 12B).

Über Antikörper-gekoppelte magnetische Beads wurden anschließend CD31<sup>+</sup>- und CD45<sup>+</sup>-Zellen aus der Zellsuspension entfernt (Abb. 12C) und die CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Fraktion auf Expression verschiedener Fibroblastenmarker sowie Expression des Perizytenmarkers, *Neuron-gial antigen 2* (NG-2) und des glatten Muskelzellmarkers, *Alpha-smooth-muscle-actin* (a-SMA) untersucht (Abb. 12D). Während die Oberflächenepitope PDGFRA ( $72,2 \pm 2,9\%$ ) und MEFSK-4 ( $52,1 \pm 4,6\%$ ) auf dem Großteil der Zellen exprimiert waren, konnte die Expression von Vimentin (VIM) ( $35,5 \pm 2,1\%$ ), CD90.2 ( $23,3 \pm 2\%$ ) und *Stem-cell antigen 1* (SCA1) ( $12,4 \pm 0,7\%$ ) nur auf einem geringem Anteil der CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Zellen detektiert werden. Der prozentuale Anteil an Perizyten (NG-2:  $1,1 \pm 0,3\%$ ) und glatten Muskelzellen (a-SMA:  $12,3 \pm 0,5\%$ ) innerhalb der CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>-Fraktion war vergleichsweise gering (Abb. 12D). Die heterogene Expression der getesteten Marker unterstreicht die starke zelluläre Komplexität der CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> Population und zeigt, dass der Großteil der publizierten CF-Marker nicht in der Lage ist, die gesamte Population der Fibroblasten zu erfassen.





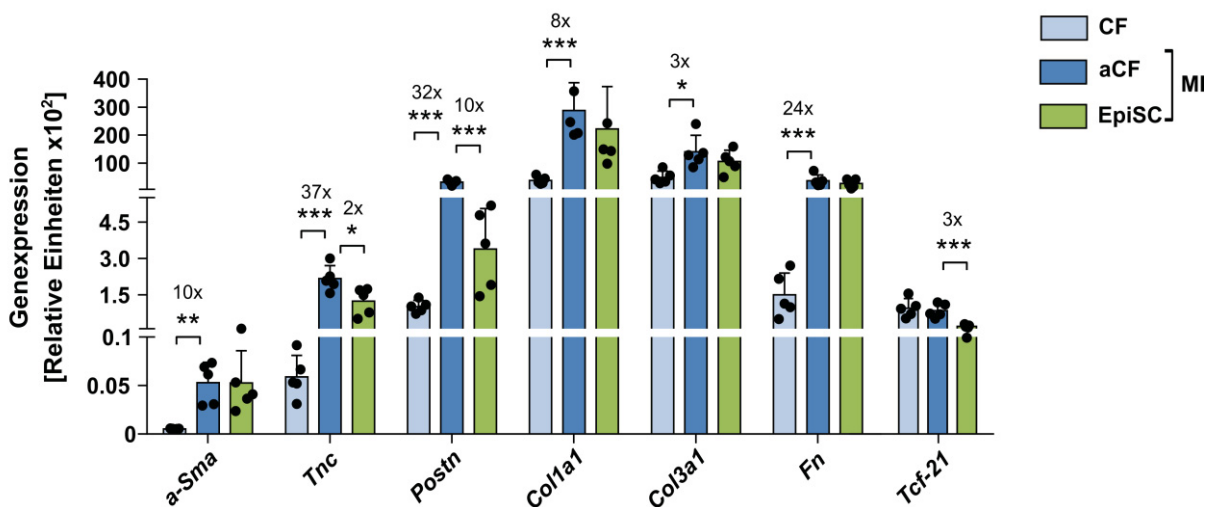
**Abbildung 12: Zelluläre Zusammensetzung der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion des Mäuseherzens unter basalen Bedingungen.** (A) Repräsentativer Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Messung der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion. Hellgrau: Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>), Dunkelgrau: Immunzellen (CD45<sup>+</sup>), Schwarz: stromale Zellen (CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> Zellen). (B) Prozentuale Verteilung von Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>), Immunzellen (CD45<sup>+</sup>) und stromalen Zellen (CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> Zellen) innerhalb der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion (n=3). (C) Repräsentativer Dot-Plot einer durchflusszytometrischen Messung der Nicht-Kardiomyozyten Fraktion nach magnetischer Depletion von CD31<sup>+</sup>- und CD45<sup>+</sup>-Zellen. Hellgrau: Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>), Dunkelgrau: Immunzellen (CD45<sup>+</sup>), Schwarz: stromale Zellen (CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> Zellen). (D) Prozentuale Verteilung verschiedener Fibroblastenmarker sowie prozentualer Anteil an glatten Muskelzellen (a-SMA) und Perizyten (NG-2) innerhalb der angereicherten CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup> Fraktion (n=3).

#### 4.4 Expression Fibrose-assoziiierter Gene, kardialer Gene und mesenchymaler Marker in CF, aCF und EpiSC

In Folge des Herzinfarkts werden Fibroblasten des Myokards<sup>29</sup> sowie Epithelzellen des Epikards<sup>221</sup> aktiviert. Um zu untersuchen, ob sich aCF und EpiSC hinsichtlich ihres Aktivierungspotentials unterscheiden, wurden ausgewählte Fibrose-assoziierte mRNA-Transkripte sowie der Fibroblastenmarker *Tcf-21* über qRT-PCR in Zellisolaten von CF, aCF und EpiSC gemessen (Abb. 13). Wie erwartet, führte der Infarkt mit Ausnahme von *Tcf-21* zu einer signifikant höheren Expression der getesteten mRNA-Transkripte in aCF (CF vs. aCF). *a-Sma* stellte dabei das einzige mRNA-Transkript dar, dessen Expression erst nach Ischämie deutlich detektierbar war (*a-Sma*: 10-fach), während die restlichen mRNA-Transkripte bereits unter basalen Bedingungen in der CF-Population nachgewiesen werden konnten. Besonders starke Expressionsunterschiede zwischen CF und aCF wurden für *Tenascin-*

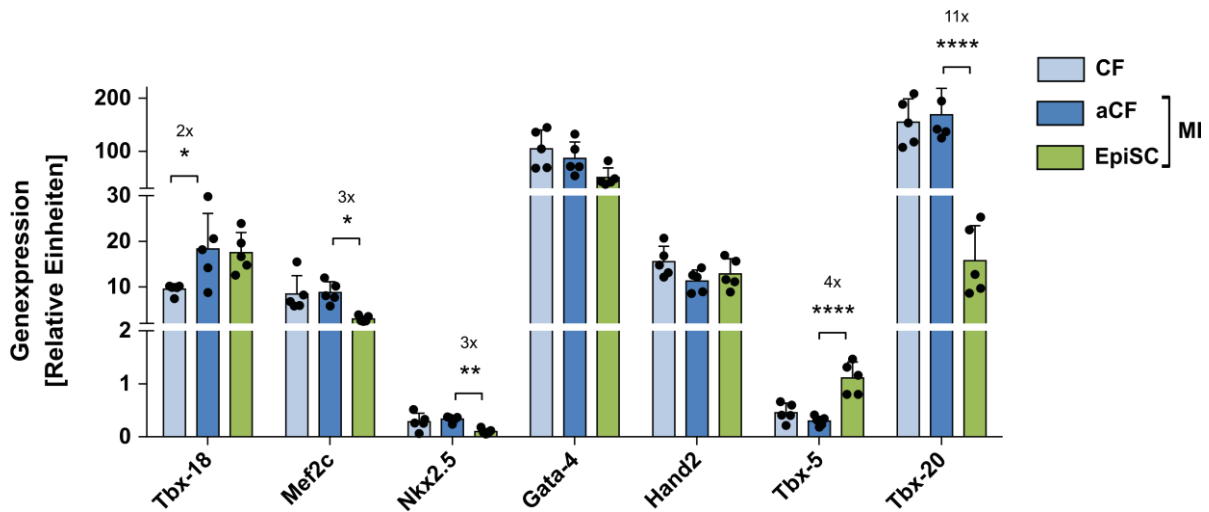
*C* (*Tnc*: 37-fach), *Periostin* (*Postn*: 32-fach) sowie *Fibronectin* (*Fn*: 24-fach) detektiert. Die mRNA-Transkripte *Collagen 1 alpha 1* und *Collagen 3 alpha 1* waren nach Infarkt hingegen vergleichsweise mäßig hoch reguliert (*Coll1a1*: 8-fach, *Col3a1*: 3-fach).

Beim Vergleich von EpiSC und aCF Population fällt auf, dass die getesteten mRNA-Transkripte auch in EpiSC exprimiert wurden. Darunter unter anderem *Postn*, welches als spezifischer Marker für aCF gilt<sup>108</sup> sowie *Tcf-21*, dessen Expression unabhängig vom Aktivierungsgrad als spezifisch für CF beschrieben wurde<sup>108</sup>. Die Expressionsspiegel sind in der EpiSC Fraktion jedoch mit Ausnahme von *a-Sma*, *Coll1a1* und *Fn* im Schnitt etwas niedriger als in aCF.



**Abbildung 13: Expression ausgewählter Fibrose-assoziiierter Gene sowie von *Tcf-21* in CF, aCF und EpiSC gemessen mit qRT-PCR (n=5).** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

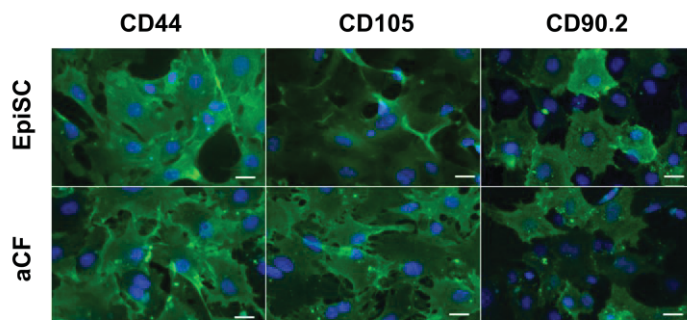
Bereits 2014 wurde beschrieben, dass CF und aCF frühe kardiale Gene exprimieren<sup>113</sup>. Für EpiSC ist hingegen bislang nur die Expression von *Gata4* und *Nkx2.5* bekannt<sup>86</sup>. Über qRT-PCR wurde aus diesem Grund eine vergleichende Analyse mit CF, aCF und EpiSC durchgeführt in der die Expression früher kardialer Gene gemessen wurde, von denen einige eine entscheidende Rolle bei der Kardiomyogenese spielen<sup>222</sup>. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, waren alle getesteten mRNA-Transkripte innerhalb der drei Zellpopulationen nachweisbar. Der Vergleich von CF und aCF zeigt, dass mit Ausnahme von *Tbx-18*, welches in aCF nach Infarkt etwa doppelt so hoch exprimiert wurde, keine Regulation der getesteten mRNA-Transkripte zu erkennen war. *Nkx2.5* sowie *Tbx-5* wurden sowohl von CF, aCF als auch EpiSC vergleichsweise schwach exprimiert. Ein direkter Vergleich von EpiSC und aCF zeigt weiterhin, dass die Expression von *Tbx-18*, *Gata-4* und *Hand2* sich zwischen den beiden Populationen nicht unterschied, während die Zellen hinsichtlich der restlichen mRNA-Transkripte signifikante Expressionsunterschiede zeigten. Die Transkripte *Mef2c* (3-fach), *Nkx2.5* (3-fach) und *Tbx-20* (11-fach) waren signifikant höher in aCF exprimiert, während *Tbx-5* (4-fach) stärker von EpiSC exprimiert wurde.



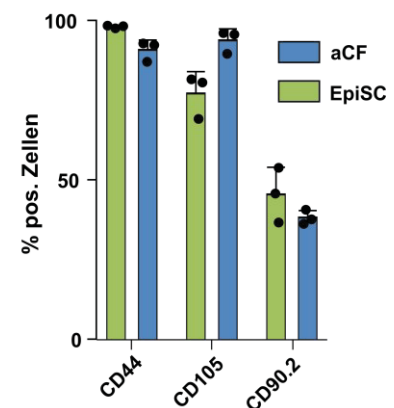
**Abbildung 14: Genexpression früher kardialer Gene in CF, aCF und EpiSC gemessen mit qRT-PCR (n=5).** Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. \*\*\*\* $P < 0,0001$ , \*\* $P < 0,01$ , \* $P < 0,05$ .

Nach Myokardinfarkt durchlaufen epitheliale Zellen des Epikards den EMT Prozess und bilden Zellen mit mesenchymalen Charakter<sup>82</sup>. Um zu überprüfen, ob aCF und EpiSC sich hinsichtlich der Expression mesenchymaler Marker unterscheiden, wurde die Expression von CD44, CD105 und CD90.2 in kultivierten aCF und EpiSC über Immunfluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrie gemessen (Abb. 15A+B).

**A**



**B**



**Abbildung 15: Proteinexpression mesenchymaler Marker in kultivierten aCF und EpiSC.** (A) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Proteinexpression von CD44, CD105 und CD90.2 in kultivierten aCF und EpiSC. Größenbalken: 20  $\mu$ m. (B) Durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung der prozentualen Anteile an CD44-, CD105- und CD90.2-exprimierenden Zellen innerhalb der aCF- und EpiSC-Fraktion (n=3).

Während die Oberflächenmoleküle CD44 und CD105 in beiden Populationen auf dem Großteil der Zellen exprimiert wurden, zeigte CD90.2 ein heterogenes Expressionsmuster und wurde sowohl in der aCF- als auch in der EpiSC-Fraktion von nur etwa der Hälfte der Zellen exprimiert (Abb. 15A). Die durchflusszytometrische Messung bestätigte weitestgehend, dass EpiSC und aCF sich hinsichtlich der getesteten mesenchymalen Marker nicht stark unterscheiden (Abb. 15B). Während die prozentualen Anteile CD44<sup>+</sup>- und CD90.2<sup>+</sup>-Zellen sich zwischen EpiSC und aCF kaum unterschieden (CD44: EpiSC:

98,0 ± 0,4%; aCF: 90,7 ± 2,6%; CD90.2: EpiSC: 45,4 ± 7,0%; aCF: 38,1 ± 1,8%), lag die Zahl der CD105<sup>+</sup>-Zellen in der aCF Kultur leicht höher (CD105: EpiSC: 77,0 ± 5,6%; aCF: 93,7 ± 3,0%) (Abb. 15B).

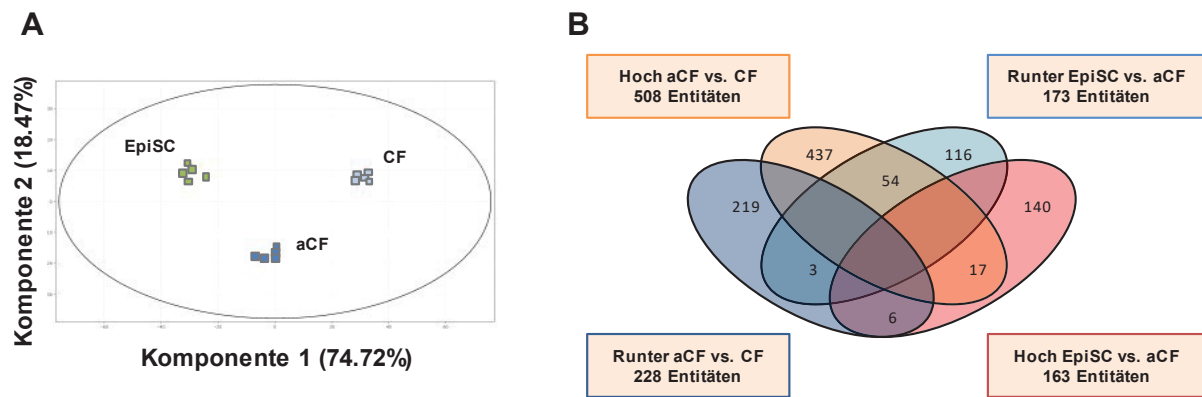
Die Ergebnisse zeigen, dass EpiSC und aCF hinsichtlich verschiedener Gesichtspunkte wie fibrotischer Antwort (Abb. 13), Expression kardialer Gene (Abb. 14) sowie mesenchymaler Marker (Abb. 15) starke Ähnlichkeiten aufweisen und folglich über diese getesteten Eigenschaften nicht voneinander zu unterscheiden sind.

#### 4.5 Microarray Transkript Expressionsanalyse von CF, aCF und EpiSC

Zur Untersuchung funktioneller Unterschiede zwischen EpiSC und aCF wurde nachfolgend eine Microarray-Analyse mit mRNA-Proben von aCF und EpiSC durchgeführt. CF dienten auch hier als Kontrolle. Vor Durchführung des Microarrays wurden die mRNA-Proben einer Qualitätskontrolle unterzogen, bei der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) von über neun gemessen wurden, was auf sehr gute mRNA-Qualität hinweist (Appendix; ergänzende Abb. 2). Nach der Qualitätsprüfung wurden die Proben mit Hilfe des Affymetrix Clariom S Assays gemessen. Die praktische Durchführung des Microarrays sowie die Prozessierung der Rohdaten wurden von Dr. Patrick Petzsch, einem Mitarbeiter des BMFZ (Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum) durchgeführt.

Abb. 16A zeigt die gemeinsame Auftragung der drei Datensätze in einer Hauptkomponenten-analyse. Die biologischen Replikate (n=5) wiesen innerhalb der jeweiligen Bedingung (CF, aCF oder EpiSC) nur geringe Varianz auf. Darüber hinaus ließen sich die einzelnen Datenpunkten jeder Bedingung klar voneinander abgrenzen und überlappten nicht, was auf ein stark differentes Genexpressionsprofil der drei Populationen hinweist (Abb. 16A). Zwischen aCF und EpiSC waren insgesamt 336 Gensignaturen differentiell exprimiert (Abb. 16B). Davon waren 163 mRNA-Transkripte (140 + 17 + 6) signifikant höher und 173 mRNA-Transkripte (116 + 54 + 3) signifikant niedriger in EpiSC exprimiert als in aCF (Abb. 16B).

Der Vergleich von CF aus gesunden Herzen und aCF aus Infarkt Herzen zeigte des Weiteren, dass nach Aktivierung durch die Ischämie insgesamt 763 Gensignaturen differentiell exprimiert wurden (Abb. 16B). Hiervon waren 508 (437 + 54 + 17) mRNA-Transkripte in aCF hochreguliert, während 228 (219 + 3 + 6) signifikant niedriger exprimiert wurden als in CF (Abb. 16B). Die beiden Vergleiche (EpiSC vs. aCF und aCF vs. CF) werden nachfolgend separat voneinander analysiert. Eine tabellarische Auflistung aller differentiell exprimierten mRNA-Transkripte der beiden Vergleiche, befindet sich auf dem beigegefügt Datenträger (Datenträger, Liste1\_Microarray Ergebnisse).



**Abbildung 16: Microarray-Analyse von CF, die aus nicht-infarzierten Herzen isoliert wurden und aCF sowie EpiSC, die 5 Tage nach Infarkt isoliert wurden (n=5).** (A) Hauptkomponentenanalyse von CF, aCF und EpiSC. (B) Venn Diagramm zur Illustration der differentiell exprimierten Gene für den Vergleich von CF und aCF sowie den Vergleich von EpiSC und aCF. Die statistische Signifikanz wurde über einen Student's t-Test mit anschließender Bonferroni-Korrektur ermittelt. \* $p < 0,05$ .

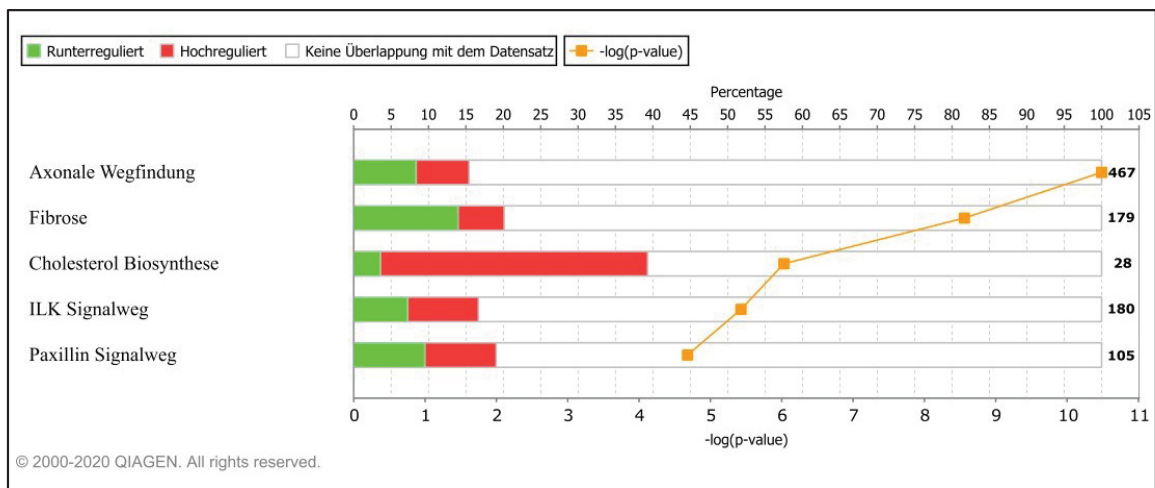
#### 4.5.1 Transkriptanalyse von EpiSC und aCF

Mit Hilfe der *Ingenuity-Pathway-Analysis-Software* (IPA) wurde untersucht, welche Signalwege zwischen EpiSC und aCF differentiell reguliert waren. Insgesamt wurden 104 Signalwege erkannt, die signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen zeigten ( $\log(p\text{-value}) > 2$ ). Einige der stark regulierten Signalwege sind in Abb. 17A illustriert.

Die signifikantesten Unterschiede zwischen EpiSC und aCF betrafen überraschenderweise den Prozess der axonalen Wegfindung ( $\log(p\text{-value}) = 10,5$ ) (Abb. 17A). Die Mehrzahl der Moleküle des Signalwegs (Semaphorine, Ephrine, VEGF) zeigen starke Überschneidung mit Signalmolekülen der Angiogenese<sup>223</sup>. So finden sich unter den differentiell regulierten Transkripten unter anderem *Vascular endothelial growth factor A (Vegfa)*, zahlreiche *Semaphorine (Sema3A, C, F, Sema4B, Sema5A, Sema6A, C, Sema7A)* sowie der *Eph receptor A2 (Epha2)* und *Ephrinb2 (Efnb2)*, welche allesamt eine Rolle in der Gefäßneubildung spielen<sup>223</sup>. Es ist deshalb davon auszugehen, dass hier Prozesse der Angiogenese erfasst wurden, die von der Software unter der Annotation „axonale Wegfindung“ zusammengefasst wurden. Ebenfalls war der Fibrose-Signalweg zwischen EpiSC und aCF differentiell reguliert ( $\log(p\text{-value}) = 8,6$ ) (Abb. 17A). In Übereinstimmung mit den qRT-PCR-Daten (Abb. 13) zeigte auch die Microarray-Analyse, dass EpiSC zahlreiche Fibrose-assoziierte mRNA-Transkripte signifikant niedriger exprimierten. Darunter einige Kollagene (*Col4a1, Col4a2, Col5a2, Col6a3, Coll1a2, Coll15a1*) sowie *transforming growth factor beta 1 (Tgfb1)*. Interessanterweise waren knapp 40% der für die Cholesterolsynthese verantwortlichen mRNA-Transkripte in EpiSC höher exprimiert als in aCF ( $\log(p\text{-value}) = 6,0$ ) (Abb. 17A). Cholesterin ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran<sup>224</sup> und beeinflusst deren Permeabilität. Ein hoher Cholesterin-Anteil der Membran erschwert die Diffusion von Molekülen über die Membran in die Zelle<sup>225</sup>. Möglicherweise findet in Folge des Infarkts eine Änderung der Membranzusammensetzung in EpiSC statt, welche die Diffusion

bestimmter Moleküle aus der Perikardflüssigkeit in die Zellen erschwert oder gar unterbindet. Weitere Signalwege mit differentieller Expression waren der *Integrin-linked-kinase*-Signalweg (ILK-Signalweg) ( $\log(p\text{-value}) = 5,4$ ) sowie der Paxillin-Signalweg ( $\log(p\text{-value}) = 4,7$ ) (Abb.17A). Beide Signalwege sind von Bedeutung für die Interaktion des Aktin-Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix (Fokalkontakte). Der ILK-Signalweg spielt eine Rolle in einer ganzen Reihe zellulärer Prozesse wie Zellpolarität, Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration<sup>226,227</sup>. Der Paxillin-Signalweg hat hingegen eine zentrale Funktion bei dem Migrationsverhalten von Zellen<sup>228</sup>.

A



B

| EpiSC > aCF    |     |          |
|----------------|-----|----------|
| Gen Symbol     | FC  | p-value  |
| <i>Serpib2</i> | 175 | 1.37E-07 |
| <i>Cxcl13</i>  | 63  | 4.67E-02 |
| <i>Dmkn</i>    | 53  | 2.67E-02 |
| <i>Krt19</i>   | 48  | 9.78E-05 |
| <i>Lcn2</i>    | 47  | 1.25E-04 |
| <i>Ptgs1</i>   | 34  | 6.70E-02 |
| <i>Slpi</i>    | 31  | 6.37E-07 |
| <i>Nkain4</i>  | 27  | 8.11E-07 |
| <i>Krt8</i>    | 25  | 9.91E-04 |
| <i>Gjb3</i>    | 23  | 6.99E-02 |
| <i>Saa3</i>    | 23  | 3.76E-03 |
| <i>Lrrn4</i>   | 21  | 1.99E-02 |
| <i>Gpm6a</i>   | 21  | 4.70E-02 |
| <i>Aqp1</i>    | 21  | 7.56E-05 |
| <i>Cxadr</i>   | 20  | 1.56E-03 |

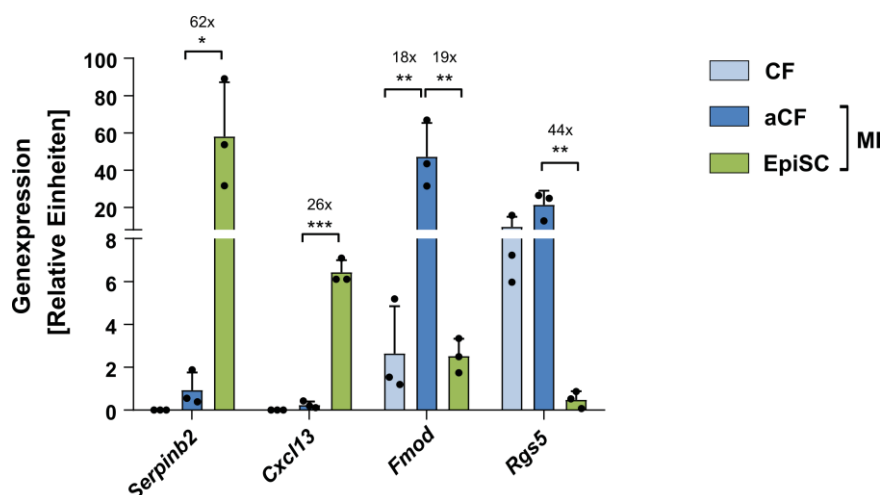
**Abbildung 17: Ingenuity-Pathway-Analyse und Liste differentiell exprimierter Genentitäten zwischen EpiSC und aCF in der Microarray-Analyse.** (A) Ausgewählte Signalwege, die in der Microarray-Analyse zwischen EpiSC und aCF differentiell reguliert waren. Hochregulierte Gene in den gelisteten Signalwegen waren signifikant höher in EpiSC exprimiert als in aCF. Runterregulierte Gene wurden signifikant niedriger in EpiSC exprimiert als in aCF. (B) Top 15 mRNA-Transkripte, die signifikant höher in EpiSC als in aCF exprimiert wurden.

Neben den differentiell regulierten Signalwegen wurden zur näheren Charakterisierung der EpiSC-Population auch einzelne mRNA-Transkripte mit besonders starken Expressionsunterschieden zwischen EpiSC und aCF analysiert (Abb. 17B). Folgende mRNA-Transkripte erscheinen besonders interessant:

*Serp1b2* zeigte mit einer 175-fach stärkeren Expression in EpiSC die größte Änderungsrate zwischen den beiden Populationen. Das für *Serp1b2* codierte Protein ist ein Serinprotease Inhibitor, der wichtige Funktion bei der Re-epithelialisierung nach Gewebsschädigung spielt und sich positiv auf den Prozess der Wundheilung ausübt<sup>229</sup>. Ein weiteres stark in EpiSC angereichertes mRNA-Transkript war *Cxcl13*, das 63-fach höher exprimiert wurde als in aCF. *Cxcl13* wird eine chemotaktischer Wirkung auf B-Zellen zugeschrieben<sup>230</sup>. Mögliche Funktionen von *Cxcl13* im Zusammenhang mit EpiSC sind bislang nicht beschrieben, eine chemotaktische Rolle auf umliegende Zellen ist nicht ausgeschlossen. *Lipocalin2* (*Lcn2*; 47-fach) wurde ebenfalls sehr stark von Zellen der EpiSC Fraktion exprimiert. Das codierte Protein hat laut Literatur negativen Einfluss auf den EMT Prozess<sup>231</sup>. Darüber hinaus konnten mRNA-Transkripte wie *Dermokin* (*Dmkn*;53-fach) und verschiedene *Zytokeratine* (*Krt19*: 48-fach; *Krt8*: 25-fach) nachgewiesen werden, welche die epitheliale Herkunft der Zellen unterstreichen und für das Epikard bereits 2010 beschrieben wurden<sup>232</sup>. *Aquaporin-1* (*Aqp1*) war 21-fach stärker in EpiSC exprimiert. Aquaporine fungieren allgemein als Kanalproteine, welche den Einstrom von Wasser in die Zelle erleichtern<sup>233</sup>. Eine Studie konnte kürzlich zeigen, dass *Aqp1*-defiziente Herzen nach Ischämie eine bessere kardiale Funktion sowie kleinere Infarkte aufweisen als Wildtyp-Herzen<sup>234</sup>.

#### 4.5.2 Validierung des Microarrays

Zur Validierung der Microarray-Ergebnisse wurden beispielhaft jeweils die beiden mRNA-Transkripte mit größter Differenz zwischen EpiSC und aCF (EpiSC > aCF: *Serp1b2*, *Cxcl13*; EpiSC < aCF: *Rgs5*, *Fmod*) über qRT-PCR gemessen (Abb. 18).



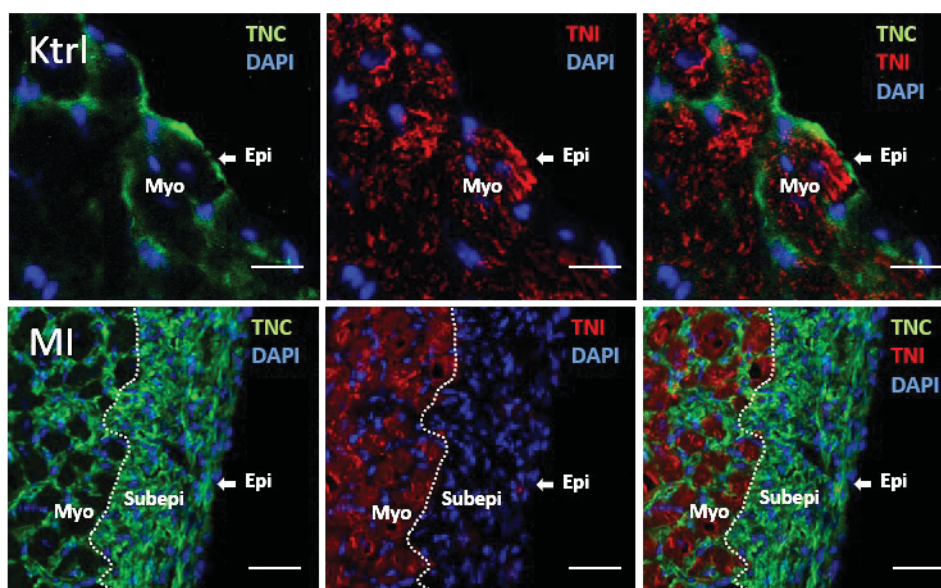
**Abbildung 18: qRT-PCR ausgewählter mRNA-Transkripte zur Validierung des Microarrays gemessen in CF, aCF und EpiSC.** Gemessen wurden jeweils die beiden mRNA-Transkripte, die zwischen aCF und EpiSC im Microarray die größten Expressionsunterschiede nach oben (*Serp1b2*, *Cxcl13*) bzw. unten (*Fmod*, *Rgs5*) zeigten (n=3). Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* ermittelt. \*\*\*p<0,001; \*\*p<0,01, \*p<=0,05.

Die Validierung des Microarrays über qRT-PCR zeigte die gleichen Ergebnisse. *Serpinb2* (62-fach) und *Cxcl13* (26-fach) zeigten deutlich stärkere Expressionsspiegel in der EpiSC Fraktion, während *Fmod* (19-fach) und *Rgs-5* (44-fach) höher in der aCF Fraktion exprimiert wurden (Abb. 18).

#### 4.5.3 Proteinexpression ausgewählter Marker im Epi-/Subepikard infarzierter Herzen

Die Expression einiger der signifikant in EpiSC angereicherten mRNA-Transkripte wurde anschließend auf Proteinebene durch Immunfluoreszenzfärbungen in Kryo-Schnitten nicht infarzierter (Ktrl) und infarzierter Herzen (MI) überprüft.

Zur Verdeutlichung der anatomischen Strukturen vor (Ktrl) und nach Infarkt (MI) zeigt Abb. 19 eine Immunfluoreszenzfärbung des EZM-Moleküls TNC und des Kardiomyozyten-Markers Troponin I (TNI) in Kombination. Wie zu erkennen ist, wurde TNC unter basalen Bedingungen lediglich von den Zellen des Epikards sowie innerhalb der Interstitialräume des Myokards exprimiert (Ktrl). Nach Infarkt hingegen wird über die TNC-Färbung deutlich die ca. 50-70  $\mu\text{m}$  dicke epi-/subepikardiale Schicht dicht gepackter Zellen markiert, welche sich optisch deutlich vom  $\text{TNI}^+$ -Myokard (Myo) abgrenzt (MI). TNC markiert darüber hinaus nach Infarkt auch die Interstitialräume des Myokards.

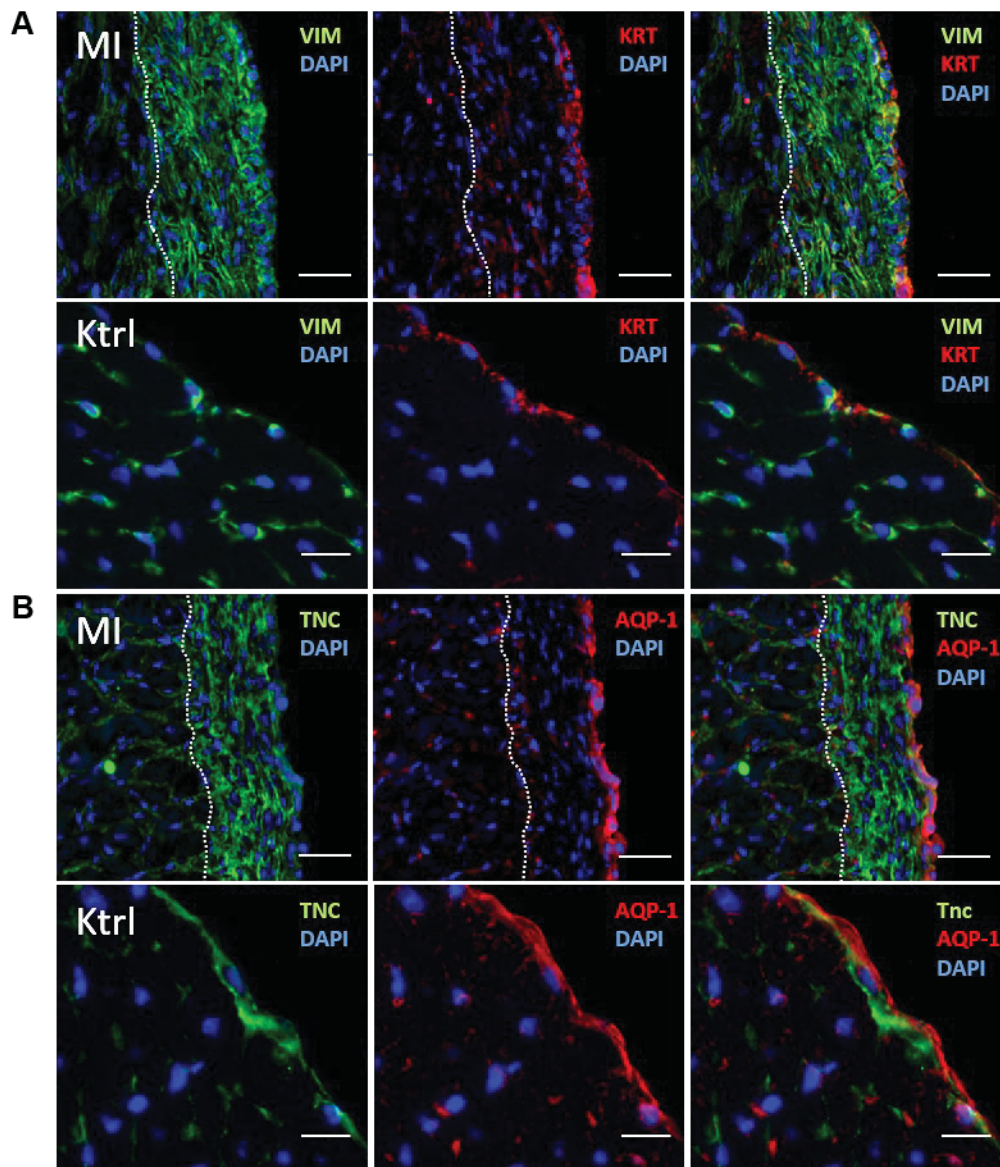


**Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Troponin I (TNI) und Tenascin-C (TNC) in kryokonservierten Herzschnitten.** Oberes Panel zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von TNC und TNI in Herzschnitten gesunder Kontrollherzen (Ktrl = Kontrolle). Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Unteres Panel zeigt die gleiche Immunfluoreszenzfärbung in Herzschnitten infarzierter Herzen 5 Tage nach Infarkt (MI = Myokardinfarkt). Maßstabsbalken: 50  $\mu\text{m}$ . Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Epi: Epikard; Myo: Myokard; Subepi: Subepikard.

Um nachfolgend Aussagen über die Lokalisation ausgewählter Marker zu treffen, wurde TNC, welches die epi-/subepikardiale Schicht markiert, jeweils in Kombination mit den im Microarray detektierten Markern KRT, LCN2, AQP-1 oder POSTN gefärbt (Abb. 20+21). Im Falle von KRT wurde aufgrund der gegebenen Antikörperkonstellation eine Kofärbung mit VIM durchgeführt, welches das Epi-



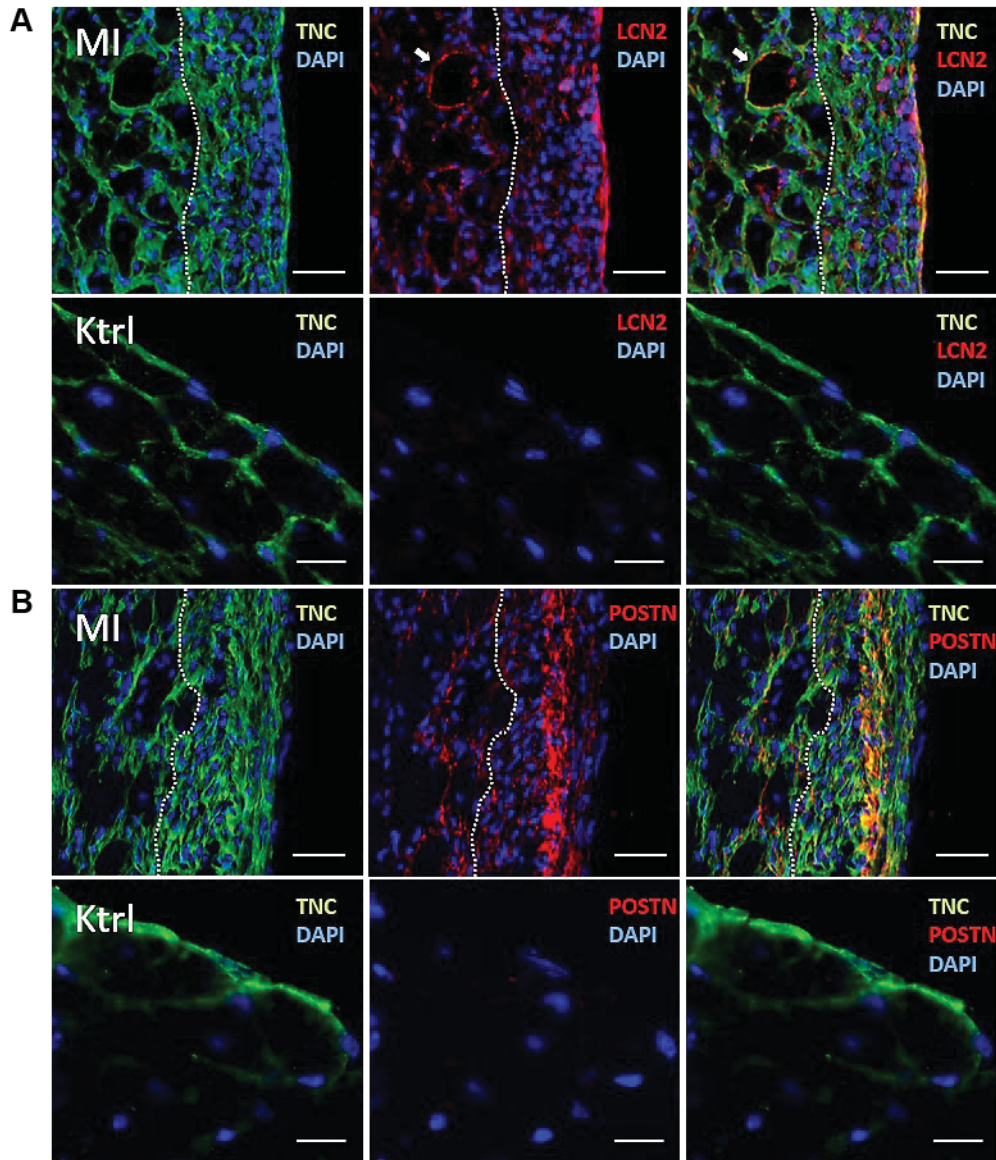
/Subepikard ähnlich gut wie TNC hervorhebt. Abb. 20 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von KRT (Abb. 20A) und AQP-1 (Abb. 20B) in Kryoschnitten infarzierter Herzen (MI) und Kontrollherzen (Ktrl). Wie zu erkennen ist waren beide Proteine sowohl vor als auch nach Infarkt vorwiegend in der äußersten Epithelzell-Schicht des Epikards exprimiert, die unter *in vivo* Bedingungen zum Perikard geneigt ist (Abb. 20). Expression von AQP-1 konnte zudem auch im Subepikard sowie im Myokards nachgewiesen werden (Abb. 20B).



**Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbungen ausgewählter Marker der Microarray-Analyse (Vergleich EpiSC - aCF) in kryokonservierten Schnitten nicht-infarzierter (Ktrl) und infarzierter Herzen 5 Tage nach Infarkt (MI).** (A) Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin (Vim) und Zytokeratin (KRT). (B) Immunfluoreszenzfärbung von Tenascin-C (TNC) und Aquaporin-1 (AQP-1). Die gestrichelte Linie dient zur besseren Abgrenzung von Subepikard und Myokard. Ktrl: Kontrolle; MI: Myokardinfarkt. Maßstabsbalken in Ktrl: 20  $\mu\text{m}$ ; Maßstabsbalken in MI: 50  $\mu\text{m}$ . Zellkerne wurden durch eine Färbung mit DAPI markiert.

LCN2 war im Gegensatz zu KRT und AQP-1 unter basalen Bedingungen nicht im Herzen nachweisbar (Abb. 21A, Ktrl) und wurde erst nach Infarkt stark in der äußersten Schicht des Epikards sowie teilweise

in Zellen des Subepikards exprimiert (Abb. 21A, MI). Interessanterweise wurden durch die LCN2-Färbung auch vaskuläre Strukturen markiert (siehe weißer Pfeil), wodurch die Vermutung naheliegt, dass auch Endothelzellen LCN2 exprimieren (Abb. 21A, MI). Das EZM-Molekül POSTN wurde ähnlich wie LCN2 nur in Folge des Infarkts von Zellen des Subepikards exprimiert (Abb. 21B). Die Expression zeigte dabei ein distinktes Muster, welches eine POSTN<sup>+</sup> Zellschicht inmitten des Subepikards erkennen ließ (Abb. 21B, MI). Wie bereits erwähnt, gilt POSTN als Marker für aCF<sup>108</sup> und wird den Ergebnissen zu Folge auch von einer Subpopulation der EpiSC exprimiert.



**Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbungen ausgewählter Marker der Microarray-Analyse (Vergleich EpiSC - aCF) in kryokonservierten Schnitten nicht-infarzierter (Ktrl) und infarzierter Herzen 5 Tage nach Infarkt (MI).** (A) Immunfluoreszenzfärbung von Tenascin-C (TNC) und Lipocalin2 (LCN2) (B) Immunfluoreszenzfärbung von TNC und Periostin (POSTN). Die gestrichelte Linie dient zur besseren Abgrenzung von Subepikard und Myokard. Ktrl: Kontrolle; MI: Myokardinfarkt. Maßstabsbalken in Ktrl: 20 µm; Maßstabsbalken in MI: 50 µm. Zellkerne wurden durch eine Färbung mit DAPI markiert.

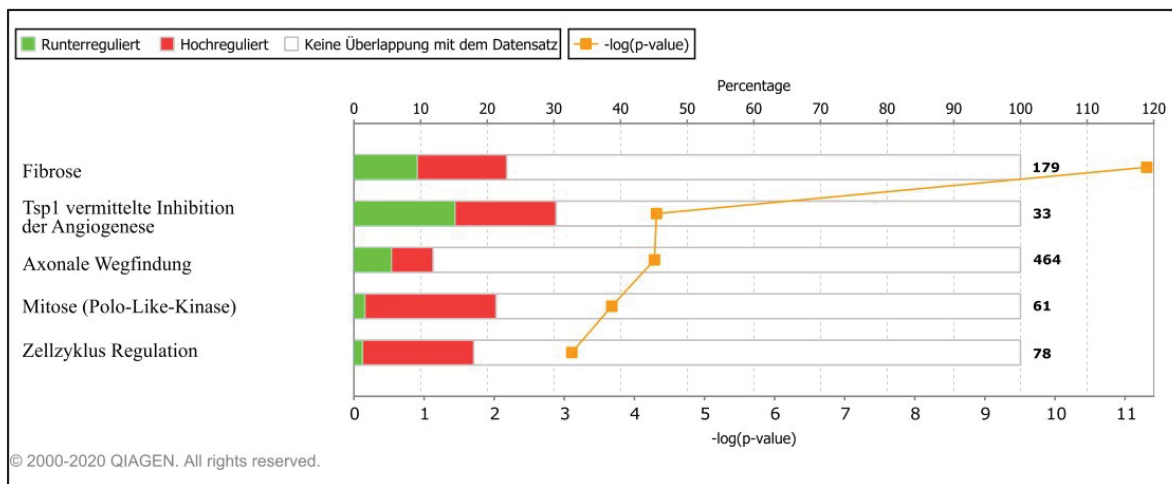
Die Ergebnisse zeigen, dass EpiSC in Folge des Infarkts proliferieren und nach 5 Tagen eine 50-70  $\mu\text{m}$  dicke subepikardiale Zellschicht bilden in der Proteine wie LCN2 und POSTN inhomogen exprimiert werden. Die unterschiedliche Lokalisation der getesteten Marker innerhalb des Epi-/Subepikards untermauert die zelluläre Heterogenität der EpiSC Fraktion. Insbesondere die Expression von POSTN und TNC zeigt, dass Marker, die bislang im Zusammenhang mit aCF beschrieben wurden, auch von Subpopulationen der EpiSC exprimiert werden.

#### 4.5.4 Transkriptanalyse von aCF und CF

Um zu untersuchen, welche Prozesse nach Infarkt in aCF reguliert werden, wurde das Genexpressionsprofil von aCF fünf Tage nach Infarkt und CF aus Kontrollherzen über die Microarray-Analyse miteinander verglichen. Die Auswertung zeigte, dass insgesamt 50 Signalwege differentiell reguliert waren ( $\log(\text{p-value}) > 2$ ). Einige Signalwege mit starker Regulation wurden ausgewählt und nachfolgend genauer analysiert (Abb. 22A).

Die signifikantesten Unterschiede zwischen aCF und CF zeigten sich hinsichtlich des Fibrose-Signalwegs ( $\log(\text{p-value}) = 11,3$ ) (Abb. 22A). Fünf Tage nach Infarkt waren noch insgesamt 24 Fibrose-assoziierte mRNA-Transkripte in aCF hochreguliert. Davon betroffen waren insbesondere die Zielgene des Signalwegs (*Colla1*, *Colla2*, *Col3a1*, *, *a-Sma*). Des Weiteren prognostizierte die IPA-Software eine mögliche TSP1 (Thrombospondin 1) vermittelte inhibitorische Wirkung auf den Prozess der Angiogenese für aCF ( $\log(\text{p-value}) = 4,3$ ) (Abb. 22A). Passend dazu war *Tsp1*, welches die Angiogenese hemmt<sup>235</sup>, signifikant höher in aCF exprimiert, während *Vegfa*, das die Angiogenese fördert<sup>236</sup>, nach Infarkt deutlich niedriger exprimiert wurde. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass aCF zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt unterschiedlichen Einfluss auf den Prozess der Angiogenese haben<sup>237</sup>. Die Ergebnisse lassen demnach vermuten, dass aCF zum Zeitpunkt von 5 Tagen nach Infarkt inhibitorisch auf die Angiogenese wirken. In Zusammenhang damit war ebenfalls der Prozess der axonalen Wegfindung signifikant verändert ( $\log(\text{p-value}) = 4,3$ ) (Abb. 22A), welcher höchstwahrscheinlich auch in diesem Vergleich im Zusammenhang mit der Angiogenese steht. Diese Annahme wird durch die differentielle Expression zahlreicher mRNA-Transkripte mit modulativer Wirkung auf die Angiogenese gestützt (*Vegfa*, *Pdgfc*, *Efnb1*, *Efnb2*, *Sema7a*). Besonders interessant war, dass fünf Tage nach Infarkt in aCF zahlreiche Transkripte exprimiert waren, die im Zusammenhang mit mitotischen Prozessen ( $\log(\text{p-value}) = 3,7$ ) und der Regulation des Zellzyklus stehen ( $\log(\text{p-value}) = 3,1$ ) (Abb. 22A). Darunter waren insbesondere Cycline (*Ccna2*, *Ccnb1*, *Ccnb2*, *Ccne1*, *Ccne2*) sowie Cyclin-abhängige Kinasen (*Cdk1*, *Cdk2*, *Cdk6*) reguliert. Stärkste Regulation zeigte *Cdk1*, das 36-fach höher in aCF exprimiert wurde als in CF. *Cdk1* spielt eine Rolle in M- und G2-Phase der Zelle<sup>238</sup>.*

A



B

| aCF > CF      |     |          |
|---------------|-----|----------|
| Gen Symbol    | FC  | p-value  |
| <i>Cthrc1</i> | 258 | 1,17E-12 |
| <i>Cemip</i>  | 231 | 2,70E-10 |
| <i>Ddah1</i>  | 114 | 1,72E-10 |
| <i>Mir675</i> | 108 | 1,41E-10 |
| <i>Lox</i>    | 99  | 1,96E-09 |
| <i>Cdh3</i>   | 98  | 1,79E-10 |
| <i>Runx1</i>  | 63  | 5,51E-07 |
| <i>Kif26b</i> | 46  | 1,96E-06 |
| <i>Palld</i>  | 43  | 6,68E-08 |
| <i>Wfdc18</i> | 43  | 6,63E-06 |
| <i>Ltbp2</i>  | 41  | 1,85E-08 |
| <i>Cdk1</i>   | 36  | 7,52E-06 |
| <i>Cdh2</i>   | 36  | 6,91E-08 |
| <i>Pbk</i>    | 36  | 9,78E-04 |
| <i>Tnc</i>    | 30  | 3,95E-09 |

**Abbildung 22: Ingenuity-Pathway-Analyse und Liste differenziell exprimierter Genentitäten zwischen CF und aCF in der Microarray-Analyse.** (A) Auswahl differenziell exprimierter Signalwege, die in der Microarray-Analyse zwischen CF und aCF (5 Tage nach Infarkt) reguliert waren. Hochregulierte Gene in den gelisteten Signalwegen waren signifikant höher in aCF exprimiert als in CF. Runterregulierte Gene wurden hingegen signifikant niedriger in aCF exprimiert als in CF. (B) Liste der Top 15 Gene, die in aCF 5 Tage nach Infarkt im Vergleich zu CF hochreguliert waren.

Tabelle 22B zeigt die 15 mRNA-Transkripte mit stärkster Differenz zwischen aCF und CF (aCF > CF). Neben verschiedener mRNA-Transkripte, die bereits für aCF in der Literatur beschrieben wurden (*Lox*, *Cdh3*, *Cdh2* und *Tnc*)<sup>77,239</sup>, fanden sich auch einige Transkripte, die bislang noch nicht im direkten Zusammenhang mit aCF beschrieben wurden. Nachfolgend werden einige der stark regulierten mRNA-Transkripte angesprochen:

*Collagen-triple-helix repeat-containing 1* (*Cthrc1*; 258-fach) und *Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein* (*Cemip*; 231-fach) zeigten die höchsten Expressionsunterschiede im Vergleich von aCF und CF. *Cthrc1* codiert für das CTHRC1-Protein, welches der Literatur zu Folge Zellmigration und Wundheilung fördert<sup>240</sup>. Darüber hinaus wird CTHRC1 eine inhibitorische Rolle im

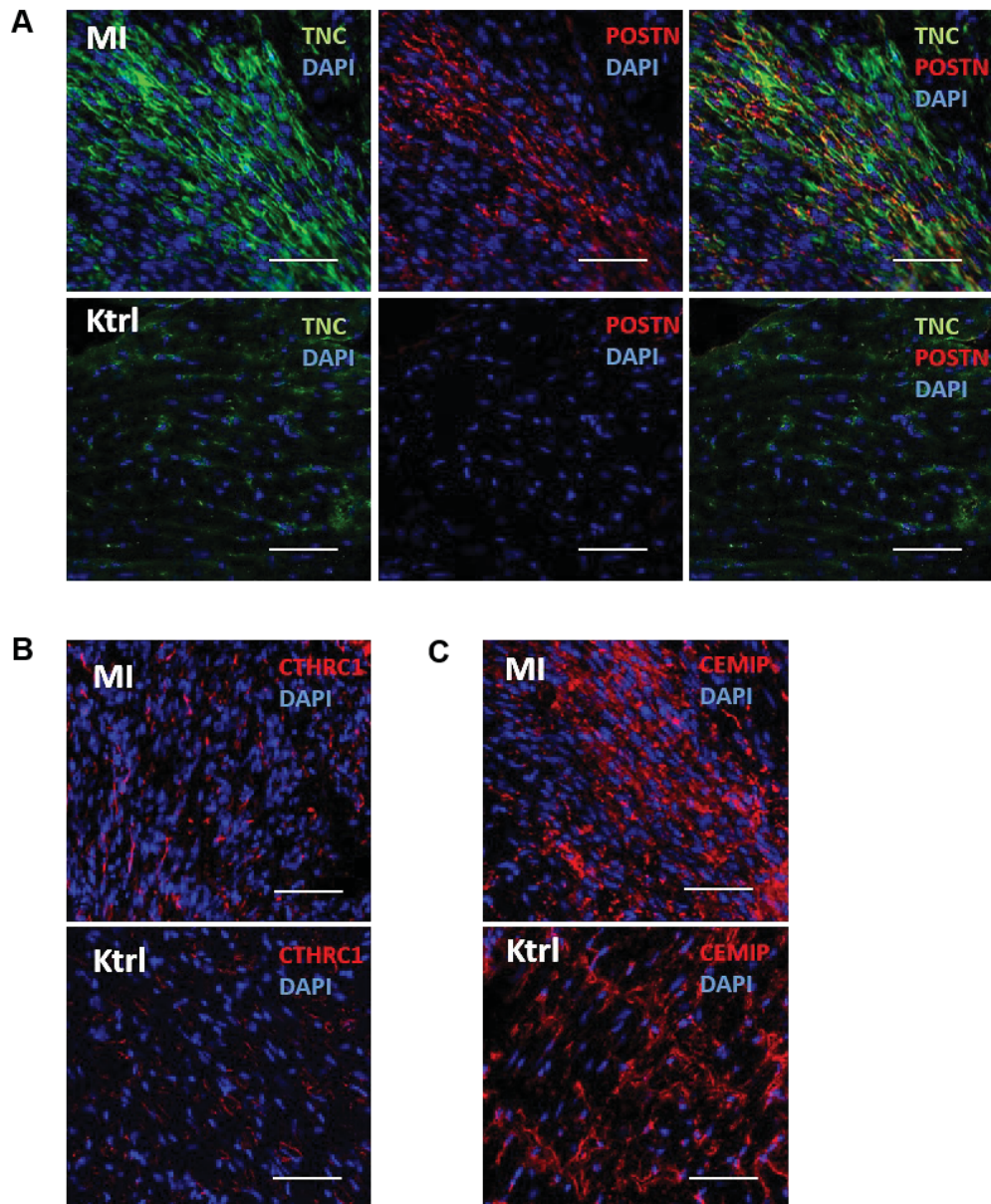
TGF- $\beta$ -Signalweg zugeschrieben<sup>241</sup>. Das von *Cemip* codierte Protein ist am Abbau von Hyaluronsäure beteiligt, dessen Abbauprodukte als proinflammatorische Stimuli wirken<sup>242</sup> und den Prozess der Angiogenese fördern<sup>243</sup>. Interessanterweise wurde *dimethylarginine dimethylamino-hydrolase 1* (*Ddah1*) in aCF signifikant stärker exprimiert (114-fach), welches bislang in erster Linie in Zusammenhang mit Kardiomyozyten beschrieben wurde. So zeigte eine Kardiomyozyten-spezifische *Ddah1*-Verlustmutante nach Myokardinfarkt eine erhöhte fibrotische Antwort<sup>244</sup>. Eine ähnliche Rolle könnte *Ddah1* auch in aCF spielen. *Runx family transcription factor* (*Runx1*) war ebenfalls nach Infarkt signifikant höher in aCF exprimiert (63-fach) und wurde erst kürzlich als neuer Transkriptionsfaktor für kardiale Fibroblasten beschrieben<sup>245</sup>. Überraschenderweise zeigten die oft als Aktivierungsmarker verwendeten mRNA-Transkripte wie *Postn* oder  *$\alpha$ -Sma* deutlich geringere Änderungsraten in aCF und finden sich nicht unter den Top 15 (siehe Datenträger, Liste1\_Microarray Ergebnisse).

#### 4.5.5 Proteinexpression ausgewählter Marker im Myokard infarzierter Herzen

Auch in aCF wurde die Proteinexpression einiger der im Microarray identifizierten mRNA-Transkripte in Kryoschnitten gesunder und infarzierter Herzen überprüft (Abb. 23). Die fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen wurden im Infarktbereich angefertigt, der unmittelbar am verbliebenen gesunden Gewebe angrenzt (*Border Zone*). Getestet wurden die Marker POSTN, TNC, CTHRC1 sowie CEMIP.

Abb. 23A zeigt die Expression von TNC und POSTN in gesunden (Ktrl) und infarzierten Herzen (MI). Während vor Infarkt kein POSTN und nur wenig TNC innerhalb des Ventrikels gesunder Herzen detektiert wurde (Ktrl), war nach Infarkt eine starke Expression beider Proteine im infarzierten Areal zu verzeichnen (MI). TNC wurde dabei entlang des gesamten Infarktareals massiv exprimiert, während das POSTN-Signal verstärkt inmitten des TNC<sup>+</sup>-Areal nachgewiesen wurde und zu den Randbereichen abnahm. Auffallend war, dass die Signale von POSTN und TNC nur teilweise kolokalisiert waren und nicht vollständig überlappten (Abb. 23A).

Die Expression von CTHRC1 (Abb. 23B) und CEMIP (Abb. 23C) konnte ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden. Beide Proteine waren sowohl unter Kontrollbedingungen (Ktrl) als auch nach Infarkt (MI) innerhalb des Myokards nachweisbar. Interessant war, dass die strukturelle Anordnung von CEMIP sich nach Infarkt deutlich änderte (Abb. 23C). Während das Protein nach Infarkt diffus im gesamten Infarktareal exprimiert wurde (MI), erschien das Expressionsmuster unter Kontrollbedingungen vergleichsweise geordnet (Ktrl). Insgesamt belegen diese Ergebnisse, dass die untersuchten Infarkt-induzierten mRNA-Transkripte auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Darüber hinaus unterstreicht die inhomogene Expression der getesteten Marker im Ventrikel die zelluläre Heterogenität der aCF.



**Abbildung 23:** Immunfluoreszenzfärbungen ausgewählter Marker der Microarray-Analyse (Vergleich aCF zu CF) in kryokonservierten Herzschnitten infarzierter Herzen 5 Tage nach Infarkt (MI) und gesunder Kontrollherzen (Ktrl). (A) Immunfärbung von Tenascin-C (TNC) und Periostin (POSTN). (B) Immunfärbung von *Collagen-triple-helix-repeat-containing protein 1* (CTHRC1). (C) Immunfärbung von *Cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein* (CEMIP). DAPI wurde in allen Schnitten verwendet, um Zellkerne sichtbar zu machen. Dargestellt ist der Grenzbereich zwischen infarziertem und gesundem Gewebe (*Border zone*). Maßstabsbalken: 50 µm.

#### 4.6 Einzelzell-Sequenzierung zur Analyse der Zellheterogenität von aCF und EpiSC

Um die zelluläre Heterogenität der EpiSC- und aCF-Population nach Infarkt im Detail zu untersuchen, wurden Zellisolate über die 10X Genomics Chromium Plattform auf Einzelzellebene sequenziert. CF aus gesunden Herzen dienten als Kontrollen. Insgesamt wurden 63.047 Zellen (CF: 24.781; aCF: 24.470; EpiSC: 13.796) sequenziert. Die Prozessierung und initiale Datenauswertung erfolgte durch Dr.

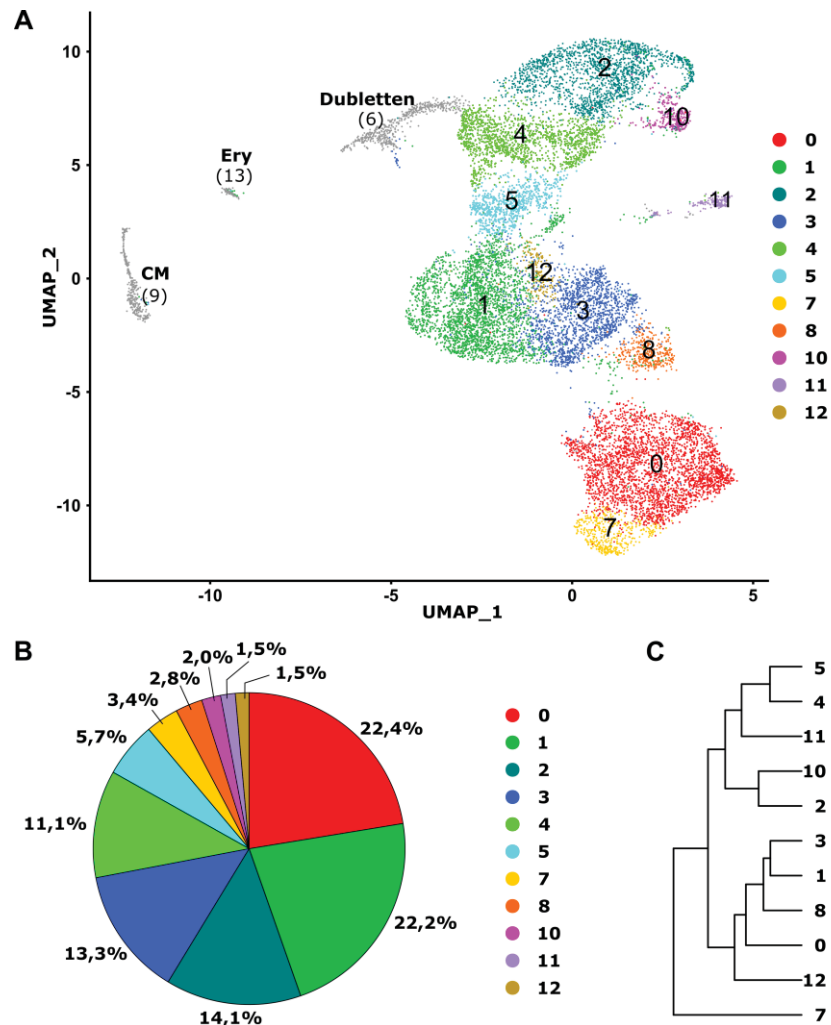
rer. nat Tobias Lautwein, einem Mitarbeiter des BMFZ. Die Datenprozessierung wurde mit der Seurat 3.0 Software<sup>215</sup> durchgeführt. Nach Ausschluss von Kontaminationen und Dubletten konnten insgesamt 12 transkriptionell unterschiedliche CF-Populationen im gesunden Herzen identifiziert werden, während 5 Tage nach Infarkt 11 aCF-Populationen nachgewiesen wurden. Interessanterweise war die zelluläre Zusammensetzung der EpiSC-Fraktion ähnlich komplex wie die der aCF und setzte sich aus ebenfalls 11 transkriptionell verschiedenen Populationen zusammen.

#### 4.6.1 Heterogenität von EpiSC nach Infarkt

Abb. 24A zeigt das Clustering der EpiSC-Fraktion in Form eines UMAP-Plots (*Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction*). Innerhalb der Auftragsung repräsentiert jeder Datenpunkt das Transkriptom einer sequenzierten Zelle. Zellen bzw. Datenpunkte von hoher transkriptioneller Ähnlichkeit wurden in der Analyse unter einem Cluster zusammengefasst. Die Clusternummerierung erfolgte entsprechend der Populationsgröße, wobei die größte Population im Datensatz die Ziffer 0 erhielt und die nächstgrößeren Populationen entsprechend einer aufsteigenden Zahlenreihe nummeriert wurden.

Neben den 11 EpiSC-Populationen wurden kleine Mengen an Erythrozyten, Kardiomyozyten sowie Dubletten erkannt, die bei der Clusternummerierung ebenfalls eine Ziffer erhielten aber von der weiteren Analyse der EpiSC ausgeschlossen wurden (Abb. 24A + Appendix: ergänzende Tabelle 1). Die beiden größten Subpopulationen des Datensatzes bildeten EpiSC-Cluster 0 und 1, welche mit jeweils 22% zu etwa gleichen Teilen zur Gesamtpopulation der EpiSC beitrugen (Abb. 24B). Die nächstgrößten Subpopulationen waren EpiSC-Cluster 2, 3 und 4, deren prozentuale Anteile untereinander in etwa der gleichen Größenordnung entsprachen (Cluster 2: 14,1%, Cluster 3: 13,3%, Cluster 4: 11,1%). Die restlichen sechs Subpopulationen (Cluster 5, 7, 8, 10, 11, 12) stellten kleinere Zell-Cluster da, die anteilig zwischen 1,5 - 5,7% zur Gesamtpopulation der EpiSC beitrugen (Abb. 24B).

Um Informationen über die transkriptionelle Verwandtschaft der individuellen EpiSC-Cluster zu erhalten, wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 24C). Die Analyse offenbarte, dass insbesondere das Transkriptionsprofil von EpiSC-Cluster 7 stark von dem der anderen EpiSC-Cluster abwich. Die restlichen 10 EpiSC-Cluster zeigten engere transkriptionelle Verwandtschaft und konnten in zwei große Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe bilden die EpiSC-Cluster 0, 1, 3, 8 und 12. Die zweite Gruppe bilden die EpiSC-Cluster 2, 4, 5, 10 und 11 (Abb. 24C).



**Abbildung 24: Clusteranalyse der Einzelzell-Sequenzierung von EpiSC 5 Tage nach Infarkt.** (A) UMAP-Plot des EpiSC Datensatzes zur Illustration der identifizierten EpiSC-Cluster. Die Clusternummerierung erfolgte fortlaufend. Clusternummern der kontaminierenden Cluster wurden in Klammern angegeben. Ery: Erythrozyten; CM: Kardiomyozyten (B) Prozentuale Anteile der individuellen EpiSC-Cluster an der Gesamtpopulation der EpiSC. (C) Dendrogramm zur Veranschaulichung der transkriptionellen Verwandtschaft der EpiSC-Cluster. Die Sequenzierung wurde mit isolierten EpiSC aus jeweils drei Tieren durchgeführt (n=3).

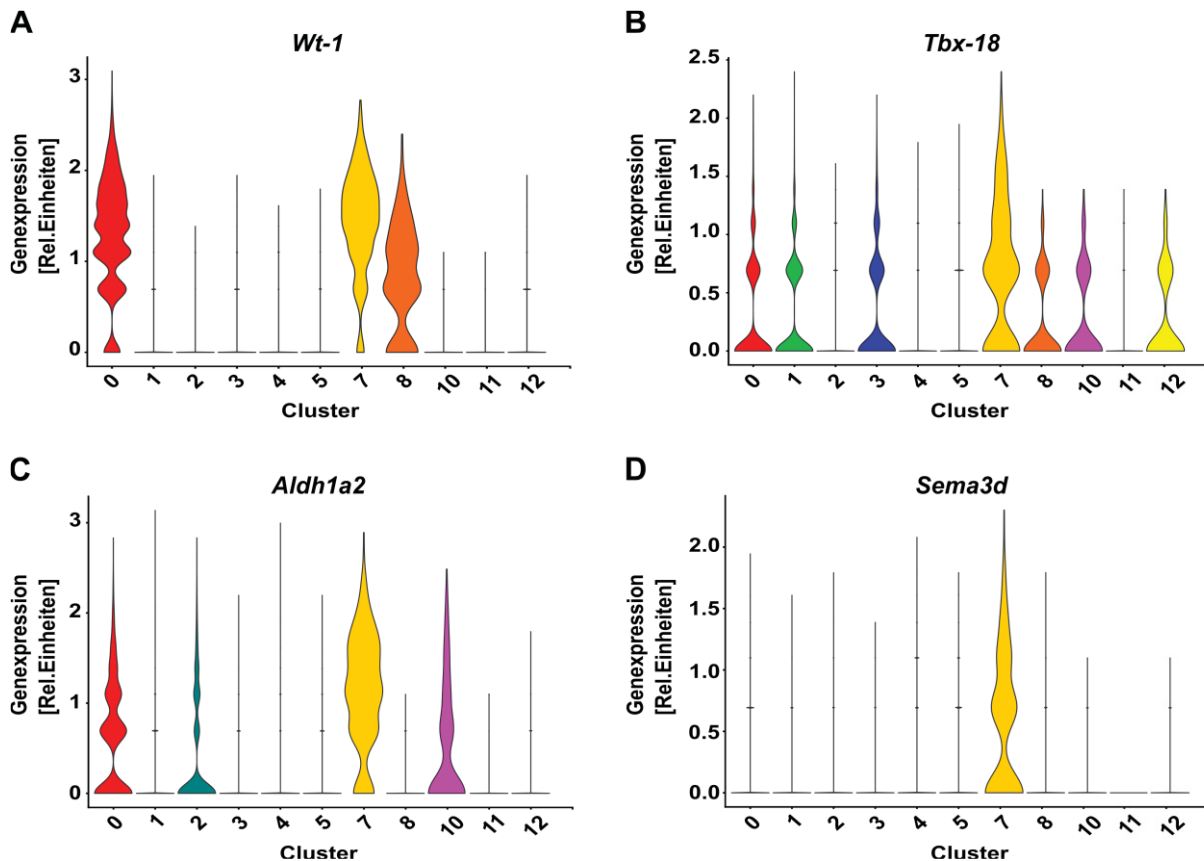
#### 4.6.1.1 Expression bekannter epikardialer Marker innerhalb der EpiSC Fraktion

In Folge des Myokardinfarkts exprimieren aktivierte Zellen des Epikards die Marker *Wt-1*, *Tbx18*, *Sema3d* sowie *Aldh1a2*<sup>84</sup>. Die Expression dieser Marker wurde nachfolgend innerhalb der identifizierten EpiSC-Cluster untersucht.

Wie Abb. 25 zeigt, wurden die untersuchten mRNA-Transkripte in den 11 Clustern sehr heterogen exprimiert. Der bekannteste epikardiale Aktivierungsmarker *Wt-1* konnte lediglich in drei Clustern der EpiSC-Fraktion nachgewiesen werden (EpiSC-Cluster 0, 7, 8), welche gemeinsam nur knapp 30% der Gesamtpopulation ausmachten (Abb. 25A). *Tbx-18* wurde hingegen von den EpiSC-Clustern 0, 1, 3, 7, 8, 10 sowie 12 exprimiert, die gemeinsam über 60% der Gesamtpopulation repräsentierten (Abb. 25B). Die Expression von *Aldh1a2* konnte zudem in knapp 40% der EpiSC Fraktion nachgewiesen werden



und war in den EpiSC-Clustern 0, 2, 7 sowie 10 detektierbar (Abb. 25C). *Sema3d* war lediglich in EpiSC-Cluster 7 nachweisbar und wurde folglich von nur einem sehr geringen Teil der Zellen in der Gesamtpopulation exprimiert (3%) (Abb. 25D). Dies zeigt, dass die bisher bekannten Marker nicht homogen in EpiSC exprimiert werden und sich folglich nicht für die Erfassung der gesamten EpiSC-Population eignen.



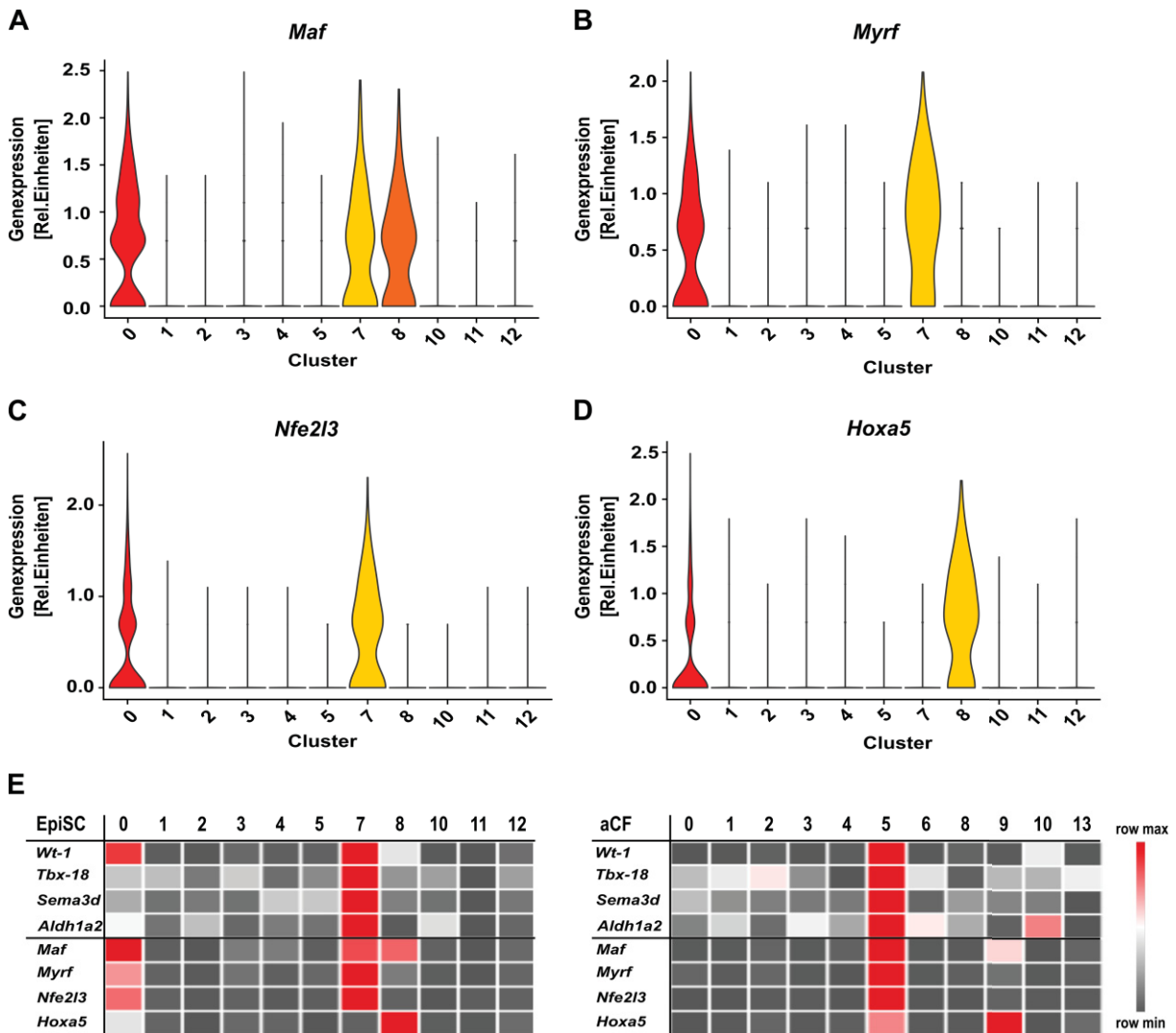
**Abbildung 25: Violin-Plots ausgewählter Aktivierungsmarker des Epikards.** (A) *Wt-1* Expression in den identifizierten EpiSC-Clustern. (B) Expression von *Tbx-18* innerhalb der EpiSC-Cluster. (C) Expression von *Aldh1a2* innerhalb der EpiSC-Cluster. (D) *Sema3d* Expression in den EpiSC-Clustern.

#### 4.6.1.2 Suche nach neuen Epikard-spezifischen Transkriptionsfaktoren

Um neue Epikard-spezifische Marker zu identifizieren, welche die EpiSC-Fraktion möglicherweise vollständiger als die bisher bekannten Marker erfassen, wurde der Einzelzell-Datensatz der EpiSC auf Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren überprüft. Die genaue Vorgehensweise zur Identifikation vielversprechender Transkriptionsfaktoren ist im Methodenteil erläutert (siehe 3.8.3.3).

Ein Transkriptionsfaktor der homogen innerhalb der 11 EpiSC-Cluster exprimiert wurde und gleichzeitig nicht in der aCF Fraktion detektierbar war, konnte nicht identifiziert werden. Bei der Analyse wurden jedoch vier neue Transkriptionsfaktoren gefunden, die in mehreren der *Wt-1*<sup>+</sup>-Cluster exprimiert wurden und zur näheren Charakterisierung dieser Cluster dienen können (Abb. 26). Der Transkriptionsfaktor *Musculoaponeurotic fibrosarcoma (Maf)* markierte ähnlich wie *Wt-1* die EpiSC-

Cluster 0, 7 und 8 (Abb. 26A), während *Myelin regulatory factor* (*Myrf*) und *Nuclear factor (erythroid 2)-like factor 3* (*Nfe2l3*) nicht in EpiSC-Cluster 8 nachweisbar waren und nur innerhalb der EpiSC-Cluster 0 und 7 exprimiert wurden (Abb. 26B+C). Der Transkriptionsfaktor *Homeobox protein Hox-A5* (*Hoxa5*) wurde hingegen in EpiSC-Cluster 0 sowie EpiSC-Cluster 8 exprimiert, fand sich aber nicht in EpiSC-Cluster 7 (Abb. 26D).



**Abbildung 26: Expression der traditionellen und neu identifizierten Marker des Epi- / Subepikards.** (A) *Maf* Expression innerhalb der EpiSC-Cluster dargestellt in Form eines Violin Plots. (B) Violin Plot der *Myrf* Expression. (C) Violin Plot der *Nfe2l3* Expression. (D) Violin Plot der *Hoxa5* Expression. (E) Vergleich der Expression traditioneller und neuer epikardialer Marker innerhalb der EpiSC-Cluster (links) und der aCF-Cluster (rechts) in Form von Heat-Maps. Max: maximale Expression; Min: minimale Expression.

Abb. 26E fasst die Expression der traditionellen (*Wt-1*, *Tbx-18*, *Aldh1a2*, *Sema3d*) und neu identifizierten (*Maf*, *Myrf*, *Nfe2l3*, *Hoxa5*) Marker in den EpiSC- und aCF-Clustern zusammen. Während die traditionellen Marker mit Ausnahme von *Wt-1* auch in zahlreichen aCF-Clustern nachgewiesen werden konnten, wurden die neu identifizierten TF nur in aCF-Cluster 5 und teilweise in aCF-Cluster 9 detektiert. Wie später noch im direkten Zusammenhang mit dem aCF-Datensatz besprochen wird (siehe 4.6.2), sind in aCF-Cluster 5 ebenfalls epitheliale Marker angereichert. Dies

deutet darauf hin, dass es sich bei der Population um nicht-mesenchymale Zellen der äußeren Epikardschicht handeln muss, die bei der Isolation nicht vollständig von der Herzoberfläche abgetragen wurden. Die identifizierten Transkriptionsfaktoren *Maf*, *Myrf*, *Nfe2l3* und *Hoxa5* zeigen demnach ähnlich hohe Spezifität wie *Wt-1* und werden weitestgehend nicht von Populationen der aCF exprimiert.

#### 4.6.1.3 Charakterisierung der EpiSC-Cluster

Um die individuellen EpiSC-Cluster genauer zu charakterisieren und ihnen mögliche biologische Bedeutung zuzuordnen, wurde überprüft, ob *Gene Ontology* (GO) Annotationen für die signifikant angereicherten mRNA-Transkripte jedes Clusters gefunden werden können (Abb. 27A). Eine tabellarische Auflistung aller signifikant angereicherten mRNA-Transkripte jedes Clusters befindet sich auf dem beigegeführten Datenträger (Datenträger, Liste3\_ScRNAseq\_Markerexpression).

Die Suche nach GO-Annotationen wurde mit der GOrilla Plattform durchgeführt<sup>217</sup>. Zusätzlich dazu wurden anschließend die Top 5 signifikant angereicherten mRNA-Transkripte jedes Clusters untersucht und in Bezug zu einer möglichen Funktion gesetzt (Abb. 27B). Wie aus Abb. 27A hervor geht, konnte jedem EpiSC-Cluster mit Ausnahme von EpiSC-Cluster 2 eine entsprechende GO-Annotation zugeordnet werden.

EpiSC-Cluster 0 stellte die größte Population der EpiSC Fraktion dar (Abb. 24B) und zeigte starke *Wt-1* Expression (Abb. 25A). Die Suche nach GO-Annotationen lieferte den Treffer „*Protein localization to plasma membrane*“ (Abb. 27A). Unter den Top 5 mRNA-Transkripten fanden sich insbesondere Epikard-spezifische Transkripte wie *Saa3*, *Clu*, *Dmkn*<sup>232</sup> (Abb. 27B). Interessant war die Expression von *Gatm*, dessen Produkt die Synthese von Kreatin katalysiert<sup>246</sup>. Kreatin stellt eine Vorstufe von Phosphokreatin dar, welches in den Energiemetabolismus von Kardiomyozyten involviert ist<sup>247</sup>.

EpiSC-Cluster 1 exprimierte *Tbx-18* (Abb. 25B) und zeigte Anreicherung von Transkripten, die der GO-Annotation „*Translation*“ zugeordnet wurden (Abb. 27A). Dementsprechend fanden sich innerhalb der signifikant angereicherten mRNA-Transkripte zahlreiche ribosomale Proteine wie *Rpl5*, *Rpl12*, *Rpl3* (Datenträger, Liste3\_ScRNAseq\_Markerexpression). Unter den Top 5-Transkripten waren vermehrt mRNAs exprimiert, die für kontraktile Proteine codieren (*Acta2*, *Myl9*, *Tagln*) (Abb. 27B).

EpiSC-Cluster 2 zeichnete sich durch die Expression von *Aldh1a2* aus (Abb. 25C). Die Suche nach GO-Annotationen lieferte keinen Treffer (Abb. 27A). Unter den Top 5 exprimierten mRNA-Transkripten konnten zwei Mitglieder der *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) -Familie (*Smoc2*, *Sparcl1*) detektiert werden (Abb. 27B), die für matrizelluläre Proteine codieren und Interaktion zwischen Zelle und Matrix vermitteln<sup>248</sup>. Des Weiteren fand sich *Gelsolin* (*Gsn*), welches die Modulation der Aktin-Filamente in Zellen reguliert und die Regeneration von Epithelzellen fördert<sup>249</sup>.

EpiSC-Cluster 3 exprimierte *Tbx-18* (Abb. 25B) und wurde der GO-Annotation „*Collagen fibril organization*“ zugeordnet (Abb. 27A). Unter den Top 5 mRNA-Transkripten fanden sich unter anderem

*Cd44* und *Ly6a* (*Scal*) (Abb. 27B), die in der Literatur bereits zur durchflusszytometrischen Charakterisierung von EpiSC-Subpopulationen beschrieben wurden<sup>85</sup>. Ebenfalls war *Aqp1* signifikant angereichert, dessen Lokalisation im Rahmen dieser Arbeit bereits auf Proteinebene innerhalb des Epi-/Subepikards nachgewiesen werden konnte (Abb. 20B).

EpiSC-Cluster 4 exprimierte keinen der Epikard-spezifischen mRNA-Transkripte (Abb. 25) und wurde den GO-Annotationen „*Regulation of proteolysis*“ und „*Regulation of protein maturation*“ zugeordnet (Abb. 27A). Unter dieser Annotationen wurden gleich drei (*Apoe*, *Clec3b* sowie *Dpep*) der Top 5 mRNA-Transkripte erfasst (Abb. 27B).

EpiSC-Cluster 5 zeigte keine Expression der Epikard-spezifischen mRNA-Transkripte (Abb. 25). Die Suche nach GO-Annotationen führte zu den Treffern „*ECM organization*“ und „*Supramolecular fiber organization*“ (Abb. 27A). Nicht unter den Top 5, aber unter den signifikant angereicherten Transkripten war *Postn* zu finden (Datenträger, Liste3\_ScRNAseq\_Markerexpression), dessen Lokalisation auf Proteinebene bereits in vorangegangenen Experimenten innerhalb des Subepikards nachgewiesen werden konnte (Abb. 21B).

EpiSC-Cluster 7 exprimierte als einzige Population alle traditionellen epikardialen Marker (Abb. 25). Die Suche nach passenden GO-Annotationen lieferte den Treffer „*Tight junction assembly*“ (Abb. 27A). *Tight junctions* vermitteln insbesondere in epithelialen Zellen enge Assoziation der Plasmamembranen zwischen den Zellen, um somit als Barriere zur Perikardhöhle zu fungieren<sup>250</sup>. Auch die Top 5 angereicherten mRNA-Transkripte *Krt7*, *Krt18*, *Krt19* und *Lgals7* lassen auf einen Epithelzell-Charakter der Fraktion schließen (Abb. 27B). Aufgrund der vorangegangenen Analysen zur Proteinlokalisierung von KRT im Infarkt Herzen (Abb. 20A) ist anzunehmen, dass es sich hier um Zellen der äußersten epithelialen Zellschicht des Herzens handelt.

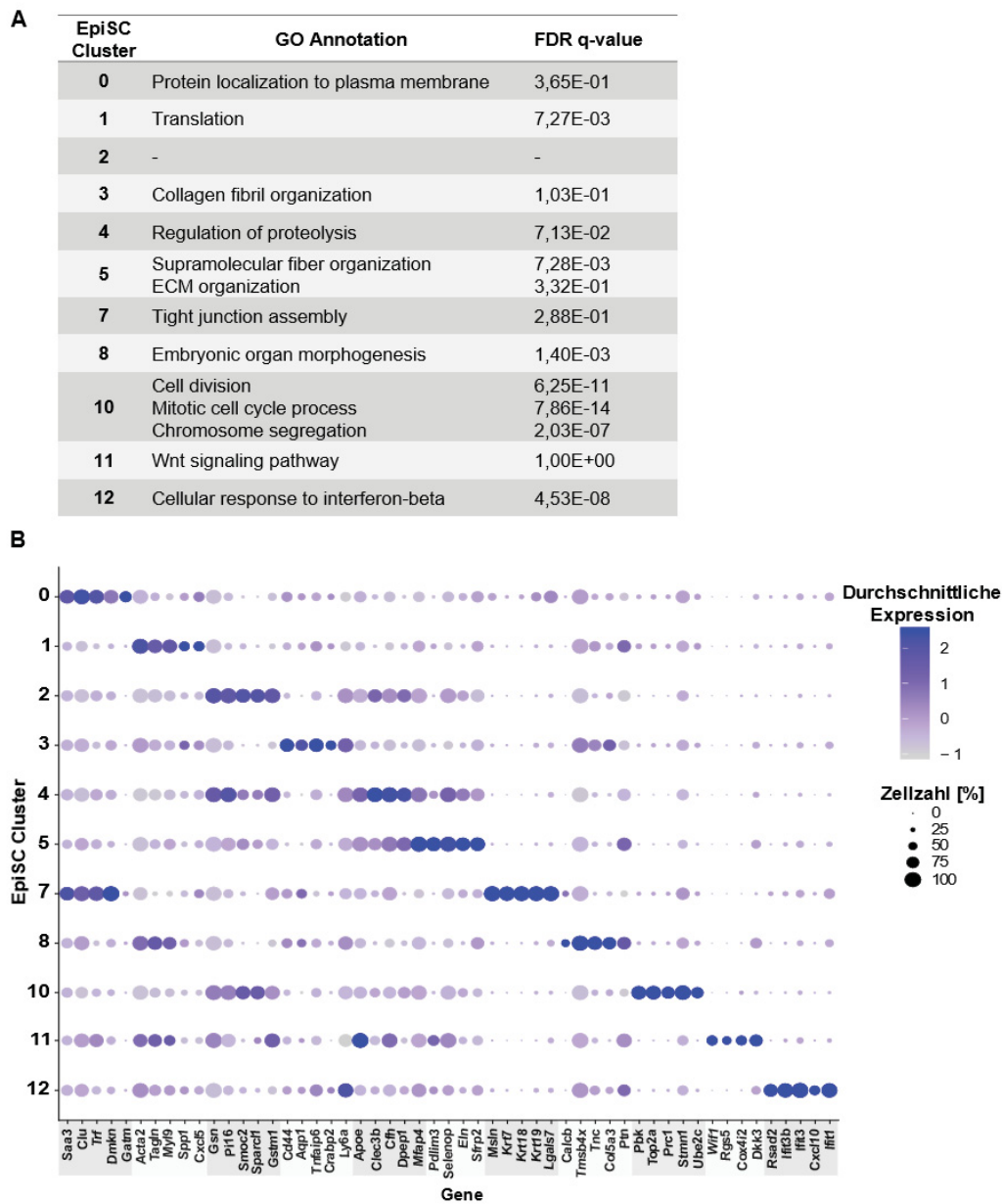
EpiSC-Cluster 8 zeichnete sich durch die Expression von *Wt-1* sowie *Tbx-18* aus (Abb. 25A+B) und wurde unter der GO-Annotation „*Embryonic organ morphogenesis*“ gelistet (Abb. 27A). Unter den Top 5 Transkripten fand sich *Tmsb4* (*Tβ4*), für das kardioprotektive Effekte beschrieben sind<sup>251</sup> sowie *Tnc* und *Col5a3*, die beide für EZM-Moleküle codieren (Abb. 27B). TNC beeinflusst das Migrationsverhalten von Zellen positiv<sup>110</sup> und konnte in den Immunfluoreszenzfärbungen von Infarkt Herzen innerhalb des Epi-/Subepikards nachgewiesen werden (Abb. 20+21).

EpiSC-Cluster 10 exprimierte *Tbx-18* sowie *Aldh1a2* (Abb. 25B+C). Die Suche nach GO-Annotationen lieferte gleich drei Treffer: „*Mitotic cell cycle process*“, „*Cell division*“ sowie „*Chromosome segregation*“ (Abb. 27A). Alle Top 5 mRNA-Transkripte (*Pbk*, *Stmn1*, *Pcr1*, *Ube2c*, *Top2a*) stehen in Zusammenhang mit diesen biologischen Funktionen (Abb. 27B).

In EpiSC-Cluster 11 wurden keine Epikard-spezifischen Marker exprimiert (Abb. 25). Interessanterweise wurde hier die GO-Annotation „*Wnt signaling pathway*“ zugeordnet (Abb. 27A).

Entsprechend dieser Ergebnisse fanden sich unter den Top 5 mRNA-Transkripten *Wif1* und *Dkk3*, deren regulative Funktion im Wnt-Signalweg bereits beschrieben wurde<sup>252,253</sup> (Abb. 27B).

EpiSC-Cluster 12 exprimierte *Tbx-18* (Abb. 25D). Die Suche nach GO-Annotationen offenbarte, dass dieses Cluster sich durch die Expression Interferon induzierter mRNA-Transkripte auszeichnete (GO-Annotation: „*Cellular response to interferon-beta*“) (Abb. 27A). Passend dazu konnten drei der Annotation zugehörigen Transkripte (*Ifit1*, *Ifit3*, *Ifit3b*) unter den Top 5 identifiziert werden (Abb. 27B).

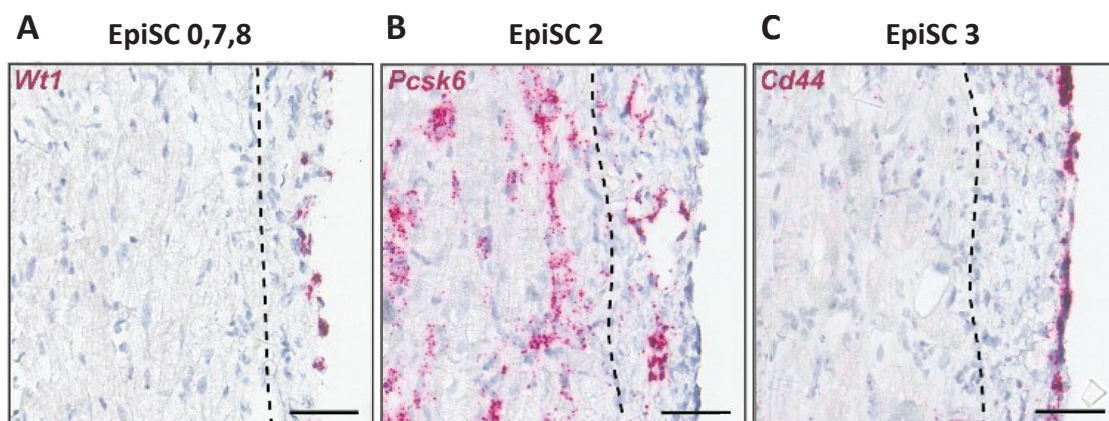


**Abbildung 27: Clusteranalyse der Einzelzell-Sequenzierung von EpiSC.** (A) Tabelle der zugeordneten GO-Annotationen für jedes EpiSC-Cluster (- = keine GO-Annotation nachweisbar). (B) Dot-Plot der Top 5 signifikant exprimierten mRNA-Transkripte innerhalb der individuellen EpiSC-Cluster.

#### 4.6.2 Analyse transkriptioneller Ähnlichkeiten der EpiSC- und aCF-Cluster

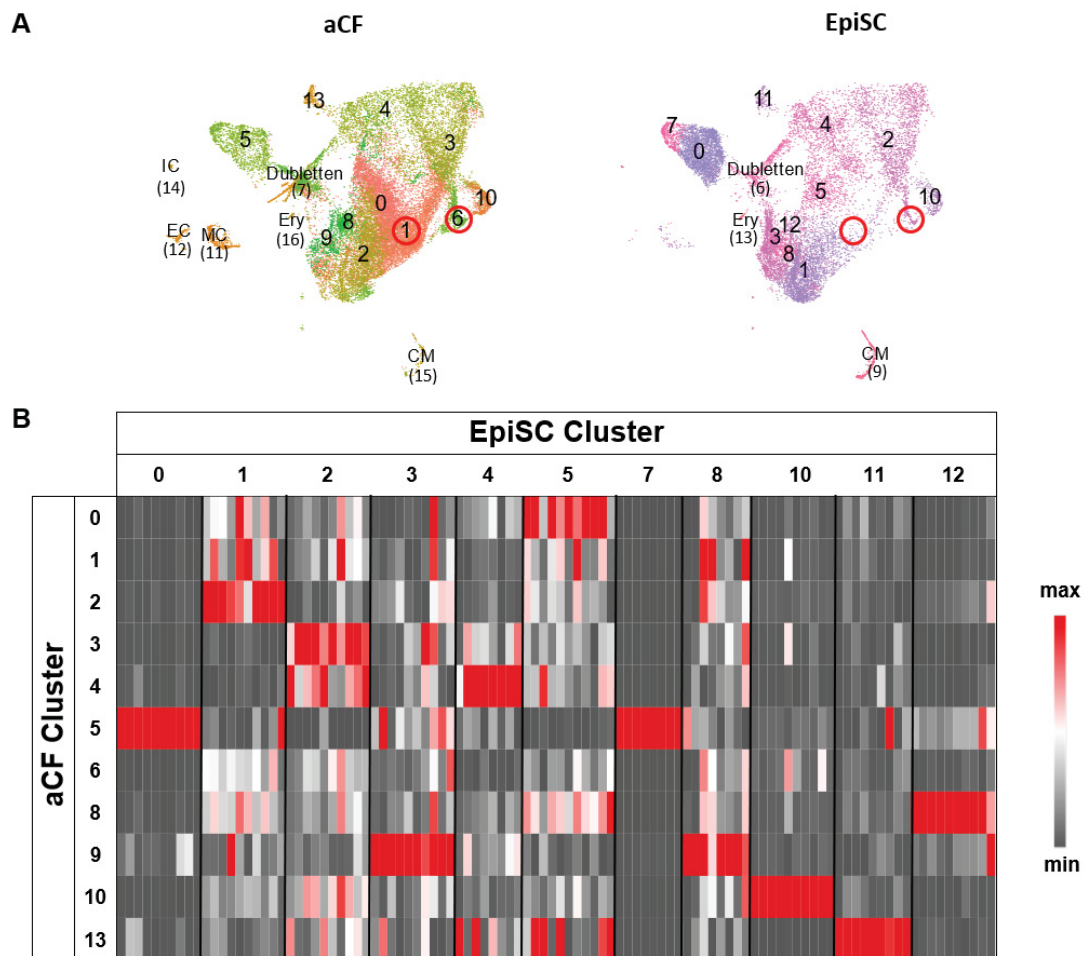
Einige der zugeordneten GO-Annotationen kennzeichnen funktionelle Eigenschaften von CF/aCF (EpiSC 3 (*Collagen fibril organization*), EpiSC 5 (*ECM organization*)) oder wurden erst kürzlich in der Literatur für CF/aCF beschrieben (EpiSC 11 (*Wnt Signaling*), EpiSC 12 (*Interferon beta response*))<sup>254</sup>. In verschiedenen Clustern konnten jedoch mRNA-Transkripte detektiert werden (*Aqp1*, *Postn*, *Krt*), deren Lokalisation im Epi-/Subepikard bereits zuvor über Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde (Abb. 20+21). Eine Kontamination der EpiSC-Fraktion durch aCF aus dem Myokard ist aus diesem Grund unwahrscheinlich.

Zur Bekräftigung dieser Annahme wurde exemplarisch die Lokalisation der mRNA-Transkripte *Wt-1*, *Protein Convertase Subtilisin / Kexin Type 6 (Pcsk6)* und *Cd44* in Kryo-Schnitten des infarzierten Herzens über *in-situ*-Hybridisierung überprüft (Abb. 28). Die Durchführung des Hybridisierungsversuchs erfolgte durch Frau Ria Zalfen. *Wt-1*, welches von EpiSC-Cluster 0,7 und 8 exprimiert wurde, konnte im Herzschnitt eindeutig in Zellen des Epi-/Subepikards nachgewiesen werden (Abb. 28A). *Pcsk6*, welches dem Nachweis von EpiSC-Cluster 2 diente, war ebenfalls innerhalb des Epi-/Subepikards exprimiert und konnte darüber hinaus auch in Zellen des Myokards nachgewiesen werden (Abb. 28B). Das Signal von *Cd44*, das EpiSC-Cluster 3 kennzeichnete, war ebenfalls am äußeren Rand des Epikards lokalisiert und konnte innerhalb des Myokards nur vereinzelt nachgewiesen werden (Abb. 28C). Die Ergebnisse bestätigen, dass die exemplarisch getesteten Marker in Zellen des Epi-/Subepikards exprimiert werden. Insbesondere das Expressionsmuster von *Pcsk6* gibt Grund zur Annahme, dass es innerhalb des Epi-/Subepikards Zellpopulationen gibt, die starke Ähnlichkeiten zu den im Myokard lokalisierten aCF haben.



**Abbildung 28: RNA *in situ* Hybridisierung ausgewählter mRNA-Transkripte in Kryo-Schnitten infarzierter Mäuseherzen 5 Tage nach Infarkt.** mRNA Expression von *Wilms-Tumor-Protein 1 (Wt-1)* (A) *Protein Convertase Subtilisin / Kexin Type 6 (Pcsk6)* (B) und *Cd44* (C) in Kryo-schnitten eines infarzierten Herzens. Die gestrichelte Linie dient zur visuellen Abgrenzung von Subepikard und Myokard. Zellkerne wurden blau durch Hämatoxylin markiert. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m.

Um die transkriptionelle Ähnlichkeit der EpiSC- und aCF-Cluster zu überprüfen, wurden die beiden separaten Datensätze über den *Seurat Integration Workflow* miteinander integriert und reanalysiert. Nach der Integration wurden zwei separate UMAP-Plots erstellt, in denen sich transkriptionell ähnliche Zellen der beiden Datensätze an den gleichen Koordinaten in den Plots befinden, wodurch eine Zuordnung ähnlicher Cluster über die Lokalisation in dem UMAP-Plot möglich war (Abb. 29A). Zudem wurde überprüft, ob die signifikant angereicherten Markergene jedes EpiSC-Clusters auch in Clustern der aCF-Fraktion exprimiert wurden (Abb. 29B).

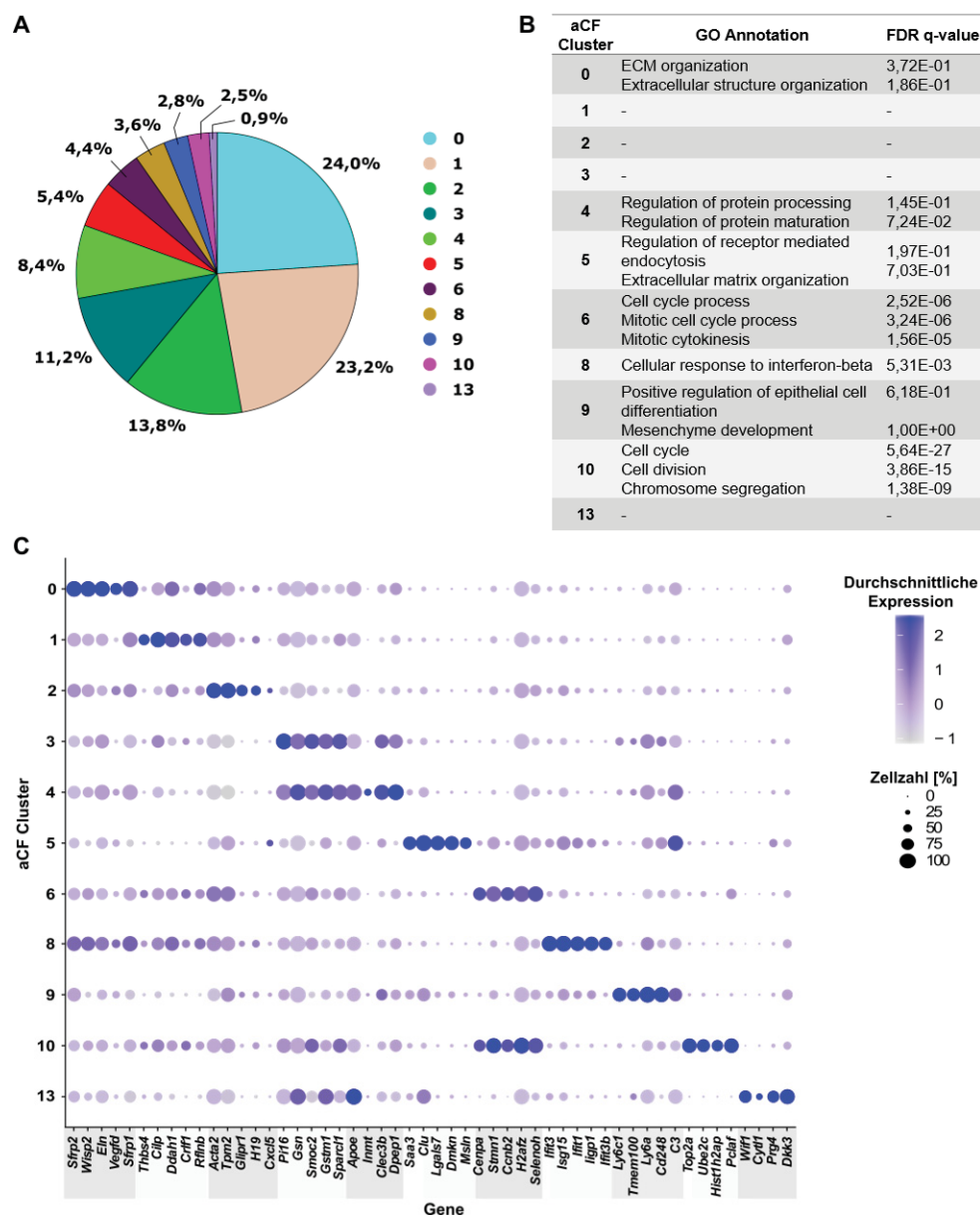


**Abbildung 29: Illustration der transkriptionellen Ähnlichkeit von EpiSC und aCF.** (A) UMAP-Plot der integrierten Datensätze von aCF und EpiSC. Rot markierte Bereiche zeigen Cluster mit geringer transkriptioneller Ähnlichkeit zwischen aCF und EpiSC. Die Clusternummerierung erfolgte fortlaufend. Clusternummern der kontaminierenden Cluster wurden in Klammern angegeben. CM: Kardiomyozyten; IC: Immunzellen, EC: Endothelzellen, Ery: Erythrozyten, MC: Murale Zellen. (B) Expression der identifizierten EpiSC-spezifischen Top 10 mRNA-Transkripte jedes Clusters innerhalb der individuellen aCF-Cluster in Form einer Heat-Map. Max: maximale Expression; Min: minimale Expression.

Wie aus Abb. 29 hervorgeht, weisen einige aCF-Cluster transkriptionelle Ähnlichkeiten zu den EpiSC-Clustern auf. Grob konnte zwischen drei verschiedenen Gruppen unterschieden werden. Gruppe I bilden aCF-Cluster, die sowohl im UMAP-Plot als auch in der Heat-Map starke Überschneidungen mit EpiSC-Clustern zeigten: aCF-Cluster 0, 2, 3, 4, 8, 10, 13 überlappen entsprechend mit EpiSC-Cluster 5, 1, 2, 4,

12, 10, 11. Gruppe II zeigte transkriptionelle Ähnlichkeit mit mehr als einem EpiSC-Cluster: aCF-Cluster 5 mit EpiSC-Cluster 0 und 7; aCF-Cluster 9 mit EpiSC-Cluster 3 und 8. Gruppe III bilden aCF-Cluster, die kaum Ähnlichkeiten zu EpiSC-Clustern aufwiesen und demnach ausschließlich im aCF Datensatz zu finden waren (aCF-Cluster 1, 6; in Abb. 29A rot markiert).

Anschließend wurden auch die aCF-Cluster hinsichtlich ihrer spezifischen Charakteristika untersucht (Abb. 30). Um Wiederholungen bei der Beschreibung zu vermeiden, werden nur aCF-Cluster detailliert besprochen, die dem Muster von Gruppe II und III folgten. Bei starker transkriptioneller Überlappung (Gruppe I) wurde hingegen auf das entsprechende EpiSC-Cluster verwiesen.



**Abbildung 30: Charakterisierung der identifizierten aCF-Cluster.** (A) Tabelle der zugeordneten GO-Annotationen für jedes EpiSC-Cluster (- = keine GO-Annotation nachweisbar). (C) Dot-Plot der Top 5 signifikant angereicherten mRNA-Transkripte jedes aCF-Clusters.



aCF-Cluster 0 ähnelte dem Transkriptionsprofil von EpiSC-Cluster 5 (Abb. 29) und stellte die anteilig größte Subpopulation (24%) der aCF Fraktion dar (Abb. 30A). Entsprechend der transkriptionellen Überschneidungen mit EpiSC-Cluster 5 wurden ähnliche GO-Annotationen zugeordnet (*ECM organization, Extracellular structure organization*) (Abb. 30B).

aCF-Cluster 1 zeigte nur geringe Ähnlichkeit mit den EpiSC-Clustern (Abb. 29) und stellte mit einem prozentualen Anteil von 23,2% die nächstgrößte Subpopulation der aCF dar (Abb. 30A). Die Suche nach GO-Annotationen lieferte kein Resultat (Abb. 30B). Unter den Top 5 signifikant exprimierten mRNA-Transkripten fanden sich *Cilp* und *Ddah1*, deren codierte Proteine antifibrotische Effekte vermitteln<sup>244,255</sup>, sowie *Thbs4 (Tsp4)*, welches modulatorisch auf die Angiogenese wirkt<sup>256</sup> (Abb. 30C). Nicht unter den Top 5, aber signifikant angereichert, waren auch zahlreiche Transkripte (*Tgfb, Scx, Postn* (Datenträger, Liste3\_ScRNAseq\_Markerexpression)), welche die Myofibroblasten Differenzierung antreiben<sup>108,257,258</sup>.

aCF-Cluster 2 wies Überschneidungen mit EpiSC-Cluster 1 (Abb. 29) auf und machte 13,8% der Gesamtzellpopulation aus (Abb. 30A). Eine GO-Annotation konnte nicht zugeordnet werden (Abb. 30B). Interessant war die Expression von *H19*, einer *long-noncoding-RNA*, welche profibrotische Prozesse induziert<sup>259</sup> (Abb 30C).

aCF-Cluster 3 und 4 zeigten starke transkriptionelle Ähnlichkeit mit EpiSC-Cluster 2 und 4 (Abb. 29). Eine GO-Annotation konnte aCF-Cluster 3 nicht zugeordnet werden. Für aCF-Cluster 4 wurde die Annotation „*Regulation of protein processing / maturation*“ gefunden (Abb. 30B).

aCF-Cluster 5 fiel bereits zuvor durch die Expression epikardialer Marker auf (Abb. 26). Die Analyse der integrierten Datensätze zeigte starke transkriptionelle Übereinstimmung mit den *Wt-1* exprimierenden EpiSC-Clustern 0 und 7 (Abb. 29). Anteilig machte das Cluster 5,4% der Gesamtzell-Population aus (Abb. 30A) und exprimierte epitheliale Marker (*Dmkn, Clu*) (Abb. 30C). Daher handelt es sich bei diesem Cluster höchstwahrscheinlich um Zellen des Epi-/Subepikards, die nicht vollständig von der Herzoberfläche abgetragen wurden.

aCF-Cluster 6 konnte keinem EpiSC-Cluster zugeordnet werden (Abb. 29) und machte 4,4% der Gesamtzellzahl in aCF aus (Abb. 30A). In diesem Cluster wurden die GO-Annotationen „*Cell cycle activity*“ und „*Mitotic cytokinesis*“ nachgewiesen (Abb. 30B). Gleich vier (*Cenpa, Stmn1, Ccnb2, Selenoh*) der Top 5 mRNA-Transkripte stehen in Verbindung mit diesen Prozessen (Abb. 30C).

aCF-Cluster 8 zeigte enorme Ähnlichkeit mit dem EpiSC-Cluster 12 (Abb. 29) und stellte eine kleine Population (3,6%) in der aCF-Fraktion dar (Abb. 30A). Passend zur transkriptionellen Ähnlichkeit wurde aCF-Cluster 8 die gleiche GO-Annotation zugeordnet wie EpiSC-Cluster 12 (Abb. 30B; *Cellular response to interferon beta*“).

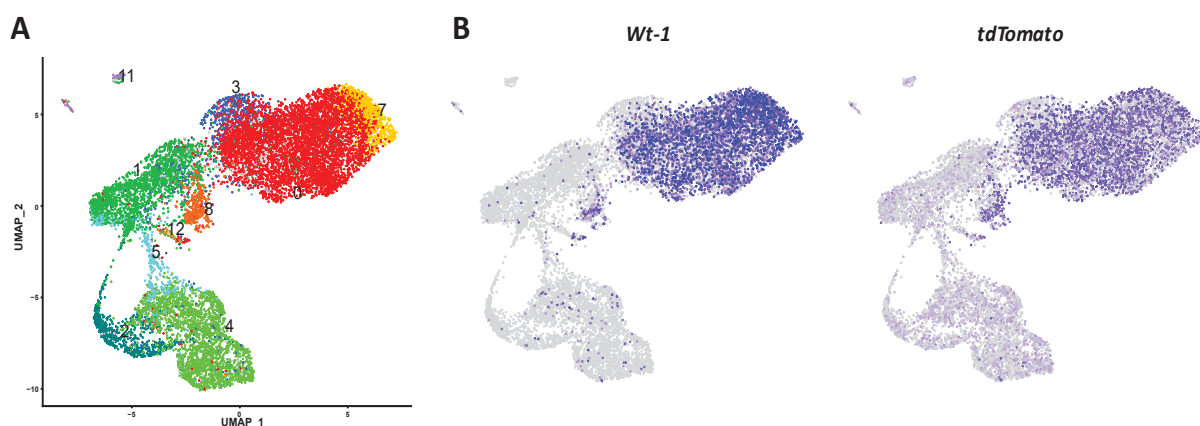
aCF-Cluster 9 zeigte transkriptionelle Überschneidungen mit EpiSC-Cluster 3 und 8 (Abb. 29) und trug lediglich 2% zur Gesamtpopulation der aCF bei (Abb. 30A). Die Suche nach GO-Annotationen lieferte die Treffer „*Positive regulation of epithelial cell differentiation*“ sowie „*Mesenchyme development*“. Passend dazu findet sich in der Liste der signifikant angereicherten Transkripte dieser Population *Wt-1*.

aCF-Cluster 10 wies starke Ähnlichkeit zu EpiSC-Cluster 10 auf (Abb. 29) und wurde GO-Annotationen zugeordnet, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklus stehen (Abb. 30B; *Cell cycle*, *Cell division*, *Chromosome segregation*).

aCF-Cluster 13 überlappte stark mit EpiSC-Cluster 11 (Abb. 29) und machte nur 0,7% der Zellen in der Gesamtpopulation der aCF aus (Abb. 30A). Die für EpiSC-Cluster 11 zugeordnete GO-Annotation „*Wnt signaling pathway*“ konnte über die Suche mit der GOrilla Plattform nicht gefunden werden (Abb. 30B). In den Top 5 angereicherten mRNA-Transkripten fanden sich jedoch mRNA-Transkripte (*Wif1*, *Dkk3*), die zu dieser Annotation passen (Abb. 30C).

#### 4.6.3 Lineage tracing *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen nach Infarkt

Laut Literatur differenzieren *Wt-1*<sup>+</sup>-EpiSC in Folge des Infarkts zu CF/aCF<sup>81</sup>. Aufgrund der transkriptionellen Ähnlichkeiten zwischen einigen EpiSC- und aCF-Clustern (Abb. 29) wurde daher geprüft, ob diese Cluster aus den *Wt-1*<sup>+</sup>-EpiSC-Clustern hervorgehen. Hierzu wurde eine Einzelzell-Sequenzierung von EpiSC aus *Wt1*<sup>CreERT2</sup>*Rosa*<sup>tdTomato</sup> Tieren durchgeführt, in denen *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen und deren Derivate genetisch über die Expression des *tdTomato*-Gens markiert wurden (Abb. 31). Die Cluster-Nummerierung des initialen Experiments wurde dabei über einen Label-Transfer in die neue Analyse übernommen. Wie Abb. 31 zeigt, überlappte die Expression von *Wt-1* und *tdTomato* nahezu vollständig. Es wurden demnach durch *tdTomato* nur EpiSC-Cluster 0, 7 und 8 markiert, die zu diesem Zeitpunkt aktiv das *Wt-1* exprimierten. Die restlichen EpiSC-Cluster wurden nicht markiert und stellen folglich keine Derivate der *Wt-1*<sup>+</sup> Zellen dar.

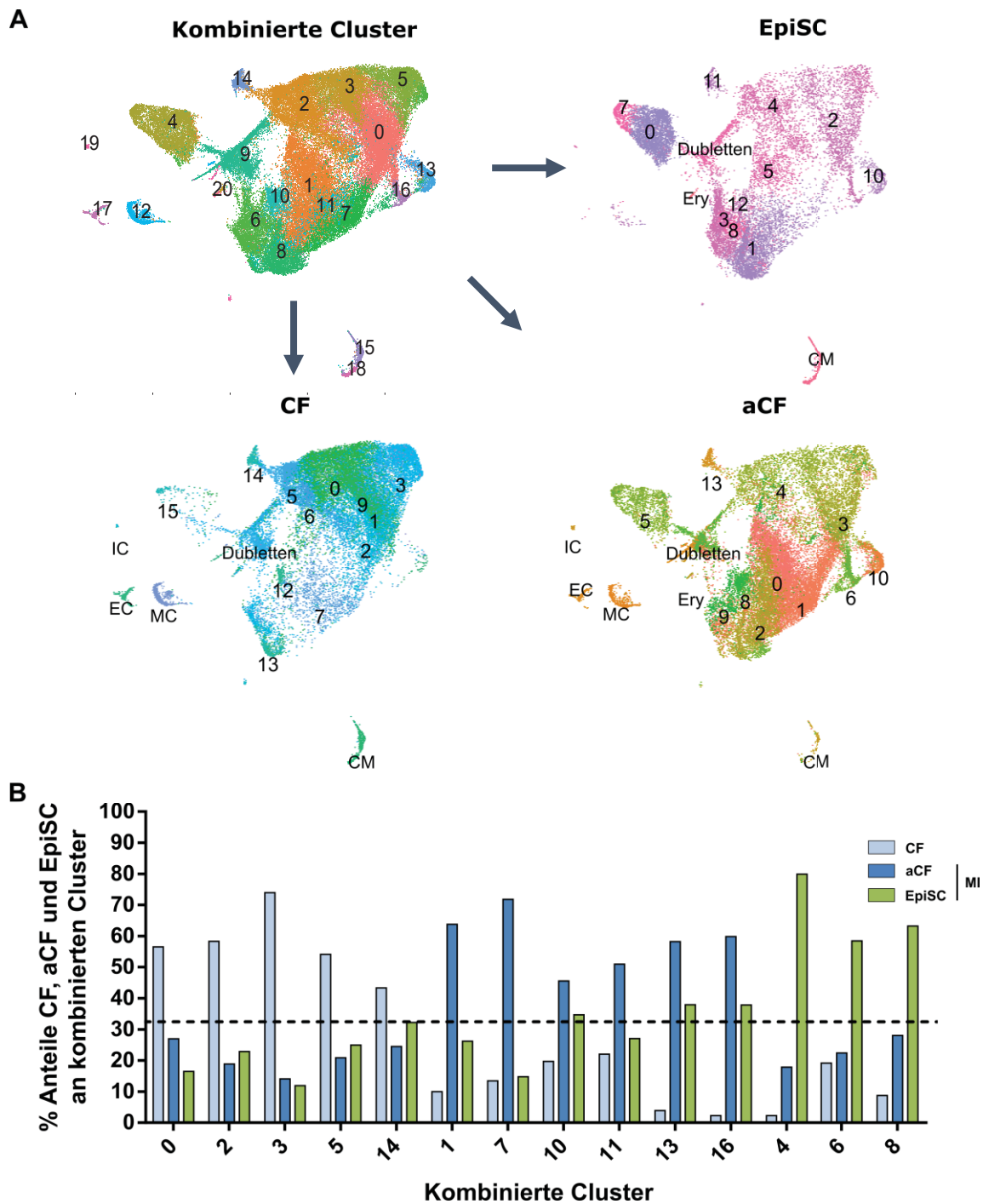


**Abbildung 31: Lineage tracing der *Wt1*-exprimierenden Zellpopulationen nach Infarkt unter Nutzung der *Wt1*<sup>CreERT2</sup>*Rosa26*<sup>tdTomato</sup> Maus (n=2).** (A) UMAP-Plot des Datensatzes mit Clusternummerierung. (B) Feature Plots von *Wt-1* und *tdTomato*. Blaue Bereiche markieren Zellen, die das entsprechende Transkript exprimierten.

#### 4.6.4 Kombinierte Clusteranalyse von CF, aCF und EpiSC

Für die geplante Analyse des Purinstoffwechsels auf Einzelzellebene wurden die Datensätze von aCF und EpiSC diesmal unter Berücksichtigung der basalen CF-Population erneut über den *Seurat Integration Workflow* integriert. Über die Integration wurden die individuell gemessenen Expressionswerte normalisiert werden, wodurch Expressionsspiegel einzelner mRNA Transkripte zwischen den CF-, aCF- und EpiSC-Datensätzen verglichen werden konnten. Auch in dieser Analyse wurden separate UMAP-Plots erstellt, in denen sich transkriptionell ähnliche Zellen jedes Datensatzes an den gleichen Koordinaten innerhalb der Plots befinden, um eine Zuordnung ähnlicher Cluster zu ermöglichen (Abb. 32A). Zusätzlich konnte über die *Unique Molecular Identifier* (UMI), mit der die analysierten Zellen jedes Datensatzes bei der Sequenzierung markiert wurden, nachvollzogen werden, in welchem Maße die analysierten Zellen eines individuellen Datensatzes zu einem der kombinierten Cluster beitragen. Hierüber war es möglich, den prozentualen Anteil der analysierten Zellen eines entsprechenden Datensatzes an den kombinierten Clustern zu ermitteln.

Die Integration resultierte in 14 kombinierten Clustern (Abb. 32A), die aufgrund der transkriptionellen Ähnlichkeiten weitestgehend Zellen bzw. Datenpunkte aller drei Datensätze beinhalteten (Abb. 32B). Auffallend war, dass innerhalb jedes kombinierten Clusters jeweils eine der drei Zellfraktionen prozentual überrepräsentiert war, wodurch die Cluster jeweils einer der drei Fraktionen zugeordnet werden konnten. Zur Vereinfachung der Darstellung wurden die Cluster in Abb. 32B nicht nach der Nummerierung, sondern nach der vorherrschenden Zellfraktion im Cluster organisiert. Über diese Art der Zuordnung konnten 5 Cluster definiert werden, die überdurchschnittlich viele Zellen der CF Fraktion enthielten (kombinierte Cluster 0, 2, 3, 5, 14). In weiteren 6 Clustern waren Zellen der aCF Fraktion überrepräsentiert (kombinierte Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16) und die 3 restlichen Cluster enthielten prozentual überdurchschnittlich viele Zellen der EpiSC Fraktion (kombinierte Cluster 4, 6, 8).



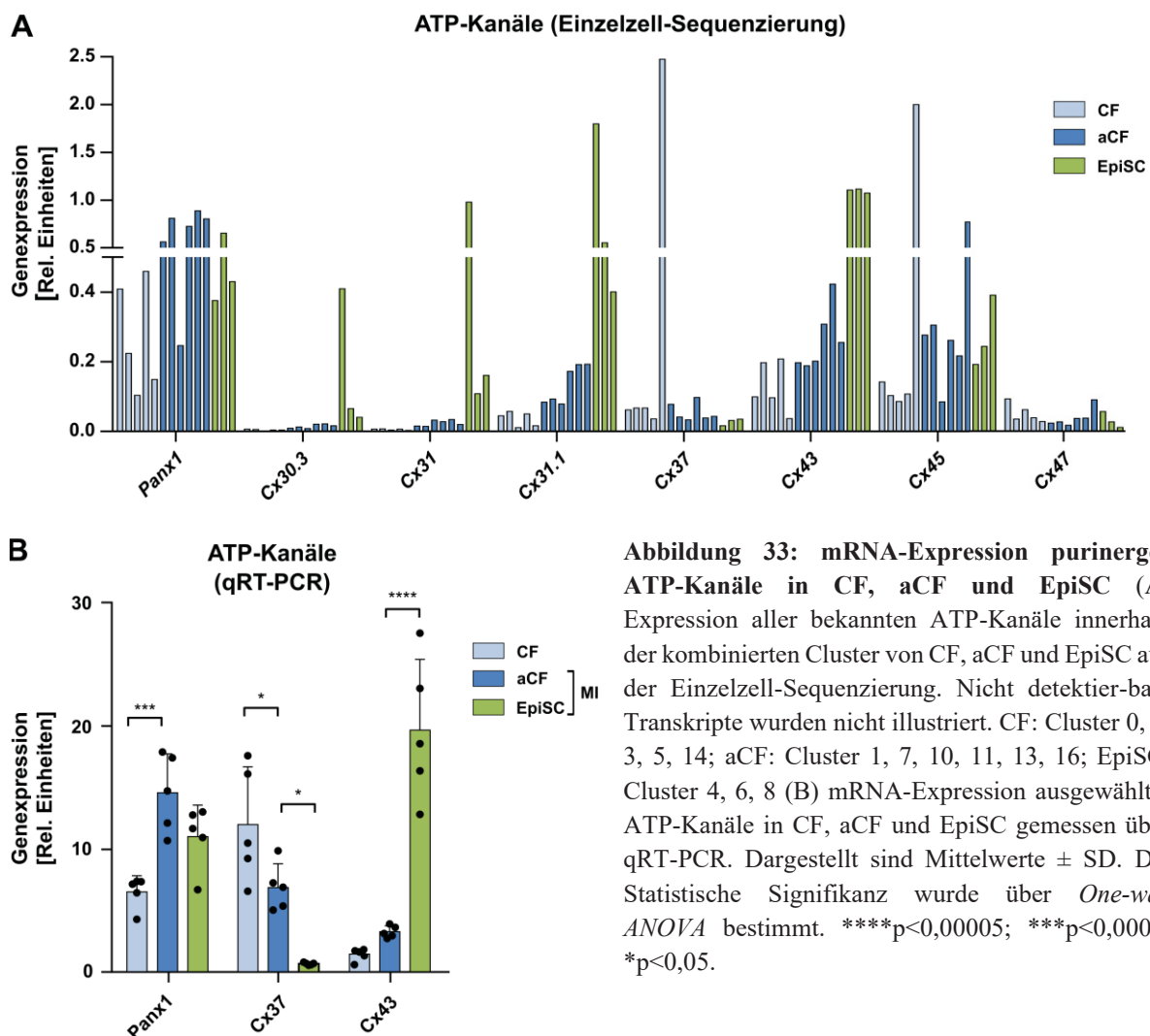
**Abbildung 32: Kombinierte Clusteranalyse der über Einzelzell-Sequenzierung generierten Datensätze von CF, aCF und EpiSC (n=3).** (A) UMAP-Plot des kombinierten Datensatzes von CF, aCF und EpiSC mit neuer Nummerierung der kombinierten Cluster sowie separate UMAP-Plots der drei Datensätze mit Zuordnung der ursprünglichen Clusternummerierung. (B) Prozentualer Anteil der Zellen jeder Fraktion (CF, aCF und EpiSC) an einem der kombinierten Cluster. Die gestrichelte Linie markiert die 33% Grenze, welche auf einen gleichberechtigten Beitrag der drei Fraktionen an der Zusammensetzung eines kombinierten Clusters hindeuten würde. CM: Kardiomyozyten; EC: Endothelzellen; MC: Murale Zellen; IC: Immunzellen; MI: Myokardinfarkt (5 Tage nach Infarkt)

## 4.7 Analyse des Purinstoffwechsels in CF, aCF und EpiSC

Die Konzentration von Nukleotiden/Nukleosiden im Extrazellularraum moduliert maßgeblich den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt<sup>135</sup>. Mit Hilfe der Einzelzell-Sequenzierung war es möglich, den extrazellulären Purinstoffwechsel von CF, aCF und EpiSC im Detail zu untersuchen. Einige der gewonnenen Ergebnisse wurden zusätzlich mit qRT-PCR bestätigt.

### 4.7.1 Genexpressionsanalyse des extrazellulären Purinstoffwechsels

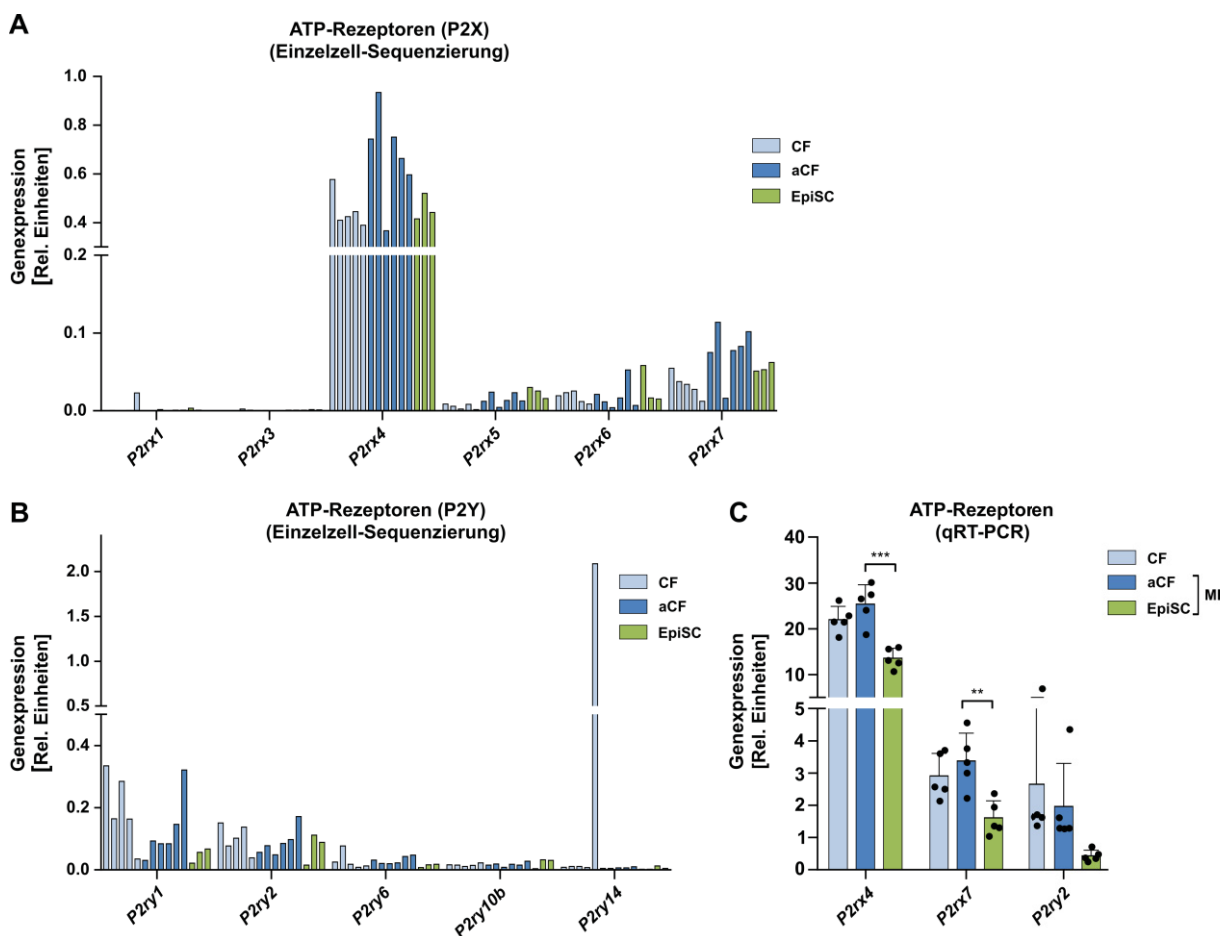
Abb. 33 zeigt die mRNA Expression der ATP-Kanäle in den kombinierten Clustern der Einzelzell-Sequenzierung (Abb. 33A) und ausgewählter mRNA-Transkripte in der qRT-PCR (Abb. 33B).



Beim direkten Vergleich der CF- und aCF-Cluster fällt auf, dass *Panx1* im Mittel die höchsten Expressionsspiegel unter den ATP-Kanälen aufwies. Dabei lag die Expression in den aCF-Clustern tendenziell höher als in den CF Clustern. Ähnliche Tendenzen fanden sich auch für die mRNA-Transkripte *Cx31.1*, *Cx43* und *Cx45*. Interessanterweise zeigte eines der kombinierten Cluster (CF 14) ein abweichendes Expressionsmuster und exprimierte in hohem Maße *Cx37* sowie *Cx45*. In den EpiSC-Clustern wurden hingegen zahlreiche Cx (*Cx30.3*, *Cx31*, *Cx31.1*, *Cx43*) stärker exprimiert als in den

CF- und aCF-Clustern. Die erkannten Unterschiede wurden anschließend für *Panx1*, *Cx37* sowie *Cx45* über qRT-PCR überprüft und konnten weitestgehend bestätigt werden (Abb. 33B). Dabei stellte sich heraus, dass die *Panx1* Expression nach Infarkt signifikant in aCF hochreguliert wurde (CF vs. aCF: 2-fach). Die Expression von *Cx37* hingegen nahm nach Infarkt um etwa die Hälfte ab und ist den Sequenzierungsdaten zufolge auf die massive Expression des Transkripts in nur einer CF-Fraktion (CF 14) zurückzuführen (Abb. 33A). Der Vergleich von EpiSC und aCF bekräftigte die zuvor erkannten Tendenzen ebenfalls und zeigte, dass *Cx43*, 6-fach stärker in EpiSC exprimiert wurde als in aCF (Abb. 33B).

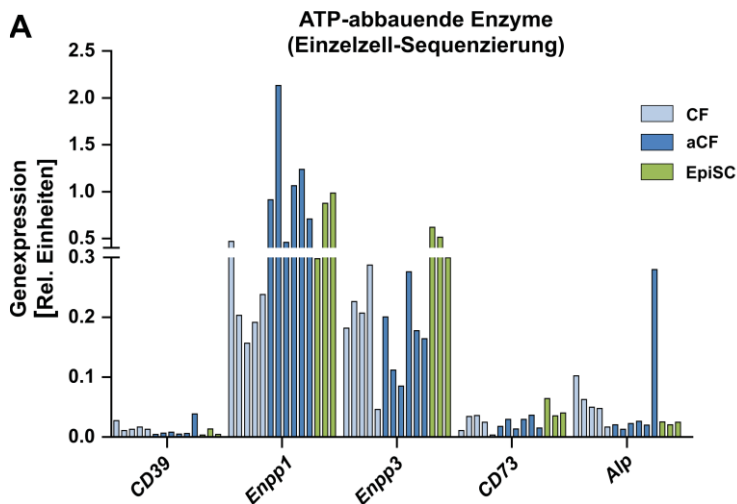
Die Expression der ATP-Rezeptoren innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzellanalyse zeigte, dass *P2rx4* in allen Clustern die höchste Expression aufwies, während die mRNA-Spiegel der restlichen Rezeptoren deutlich darunter lagen (Abb. 34 A+B). Eine Besonderheit zeigte erneut CF-Cluster 14, das massiv *P2ry14* exprimiert (Abb. 34B). Im Vergleich von aCF- und EpiSC-Clustern fiel auf, dass EpiSC *P2xr4* und *P2xr7* im Schnitt etwas schwächer exprimieren. Die Validierung der Ergebnisse mit qRT-PCR bestätigte, dass *P2xr4* am stärksten exprimiert wurde und zwischen CF und aCF keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression von *P2xr4*, *P2xr7* sowie *P2yr2* bestehen. Die Expression der ATP-Rezeptoren war insgesamt in EpiSC niedriger als in CF und aCF (Abb. 34C).



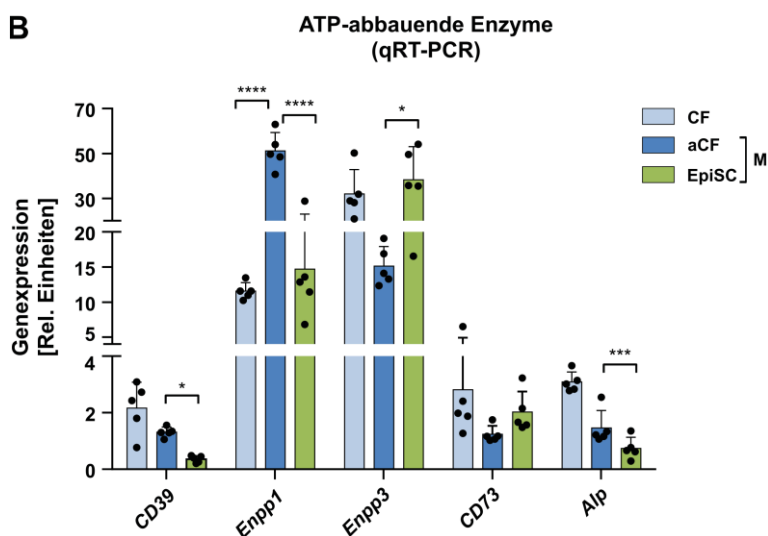
**Abbildung 34: mRNA-Expression purinergener ATP-Rezeptoren in CF, aCF und EpiSC.** (A) Expression aller bekannten ATP-Rezeptoren innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzell-Sequenzierung. Nicht detektierbare

mRNA-Transkripte wurden nicht illustriert. CF: Cluster 0, 2, 3, 5, 14; aCF: Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16; EpiSC: Cluster 4, 6, 8 (B) mRNA-Expression ausgewählter ATP-Rezeptoren in CF, aCF und EpiSC gemessen über qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ .

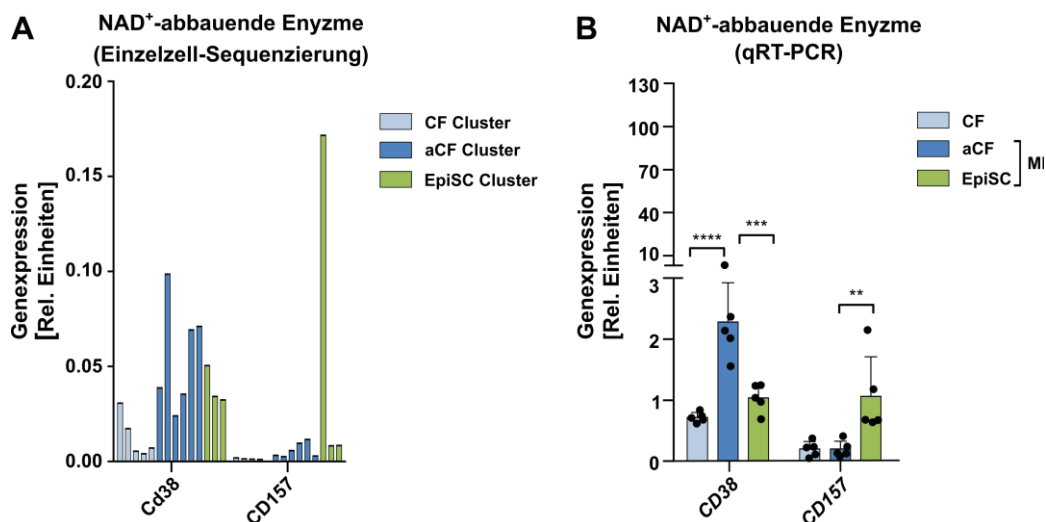
Abb. 35 fasst die die Ergebnisse der Expressionsanalyse der ATP-degradierenden Enzyme zusammen. Auffallend war, dass in allen Clustern der Einzelzellanalyse *Enpp1* und *Enpp3* die höchsten Expressionsspiegel zeigten, während *CD39*, *CD73* sowie *Alp* vergleichsweise gering exprimiert wurden (Abb. 35A). Eine Ausnahme bildete aCF-Cluster 10, welches starke Expression von *Alp* aufwies. Die Ergebnisse konnten über qRT-PCR im Wesentlichen bestätigt werden (Abb. 35B). Auch hier zeigten *Enpp1* und *Enpp3* die höchsten Expressionsspiegel in allen drei Zellfraktionen. *Enpp1* wurde in aCF nach Infarkt signifikant hochreguliert (CF vs. aCF: 4-fach). Der Vergleich von EpiSC und aCF offenbarte außerdem, dass EpiSC insgesamt niedrigere Expressionsniveaus von *CD39*, *Enpp1* und *Alp* aufweisen als aCF. *Enpp3* wurde hingegen stärker in EpiSC exprimiert als in aCF (EpiSC vs. aCF: 3-fach).



**Abbildung 35: mRNA-Expression extrazellulärer ATP - abbauender Enzyme in CF, aCF und EpiSC.** (A) Expression ATP- abbauender Enzyme innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzell-Sequenzierung. CF: Cluster 0, 2, 3, 5, 14; aCF: Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16; EpiSC: Cluster 4, 6, 8. (B) mRNA Expression ATP- abbauender Enzyme in CF, aCF und EpiSC gemessen über qRT-PCR. Dargestellt sind Mittel-werte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. \*\*\*\* $p < 0,00005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$ ; \* $p < 0,05$ .



Hinsichtlich der Expression  $\text{NAD}^+$ -abbauender Enzyme konnte in der Einzelzellanalyse (Abb. 36A) und der qRT-PCR-Messung (Abb. 36B) das gleiche Bild erkannt werden. Nach Infarkt wurde *CD38* in aCF signifikant hochreguliert, während *CD157* nur schwach exprimiert wurde und nicht zwischen CF und aCF reguliert war (Abb. 36B). Im Vergleich dazu exprimierten EpiSC *CD157* signifikant stärker als aCF (Abb. 36B), was der Einzelzellanalyse zu Folge auf die hohe Expression des Transkripts in nur einem der drei EpiSC-Cluster (EpiSC4) zurückzuführen war (Abb. 36A). Im direkten Vergleich zu den ebenfalls am  $\text{NAD}^+$ -Abbau beteiligten Enzymen *Enpp1* und *Enpp3*, welche bereits in Abb. 35 illustriert wurden, sind die Expressionsspiegel von *CD157* und *CD38* vergleichsweise gering.

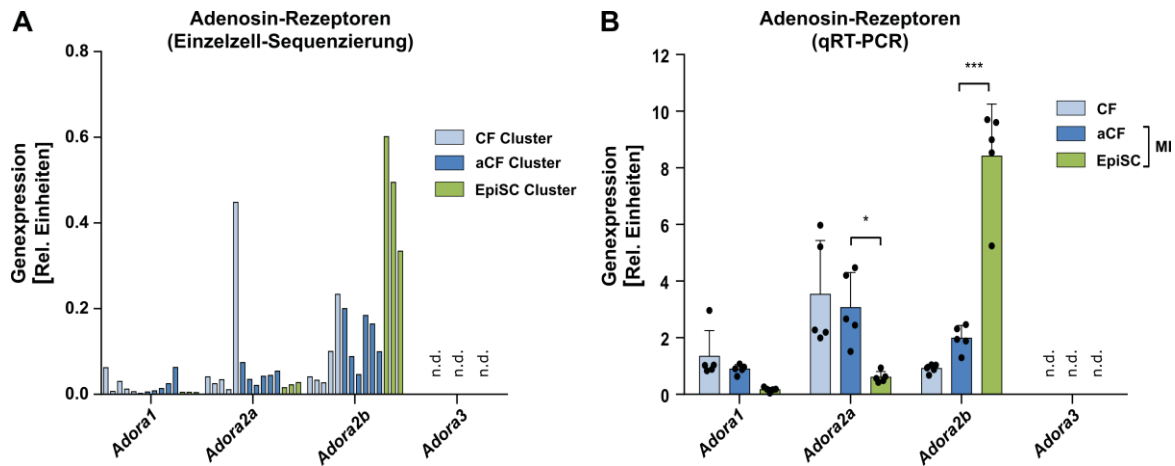


**Abbildung 36: mRNA-Expression der extrazellulären  $\text{NAD}^+$ -abbauenden Enzyme in CF, aCF und EpiSC.** (A) Expression  $\text{NAD}^+$ -abbauender Enzyme innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzell-Sequenzierung. CF: Cluster 0, 2, 3, 5, 14; aCF: Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16; EpiSC: Cluster 4, 6, 8. (B) mRNA Expression  $\text{NAD}^+$ -abbauender Enzyme in CF, aCF und EpiSC gemessen über qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. \*\*\*\*p<0,0001; \*\*\*p<0,001; \*p<0,05.

Hinsichtlich der Expression von Adenosin-Rezeptoren konnten in der Einzelzellanalyse zwischen den CF- und aCF-Clustern nur leichte Unterschiede erkannt werden (Abb. 37A). Interessanterweise zeigte CF-Cluster 14 erneut ein abweichendes Expressionsmuster und exprimierte *Adora2a* sehr stark, während in den restlichen CF- und aCF-Clustern *Adora2b* im Durchschnitt am stärksten exprimiert wurde (Abb. 37A). Über qRT-PCR konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen CF und aCF bezüglich der getesteten Adenosin-Rezeptoren detektiert werden (Abb. 37B). Auffallend war, dass in der qRT-PCR *Adora2a* im Schnitt die höchsten Expressionsspiegel in CF und aCF zeigte, während in der Einzelzellanalyse *Adora2b* am stärksten exprimiert wurde. Der Einzelzellanalyse zu Folge ist dies auf die massive Expression von *Adora2a* in CF Cluster 14 zurückzuführen, welche die Expressionsspiegel in der qRT-PCR, bei der die Expression der Gesamtpopulation erfasst wurde, erhöhte. Beim Vergleich der EpiSC und der aCF-Cluster fällt auf, dass *Adora2b* deutlich stärker in EpiSC exprimiert wurde. Die qRT-PCR bestätigte dies und zeigte, dass die Expressionsspiegel in EpiSC

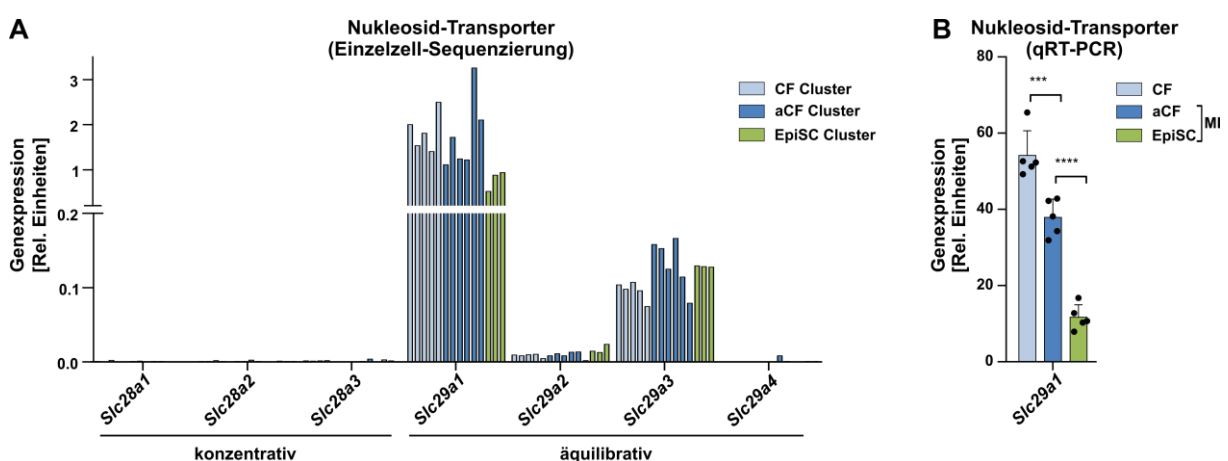


etwa 4-fach höher lagen als in aCF (Abb. 37B). *Adora3* konnte in keiner Population nachgewiesen werden (Abb. 37A+B).



**Abbildung 37: mRNA-Expression der Adenosin-Rezeptoren in CF, aCF und EpiSC.** (A) Expression der Adenosin-Rezeptoren innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzell-Sequenzierung. CF: Cluster 0, 2, 3, 5, 14; aCF: Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16; EpiSC: Cluster 4, 6, 8. (B) mRNA-Expression der Adenosin-Rezeptoren in CF, aCF und EpiSC gemessen über qRT-PCR. n.d. = nicht detektierbar. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über One-way ANOVA bestimmt. \*\*\*\*p < 0,0001; \*\*\*p < 0,001; \*p < 0,05.

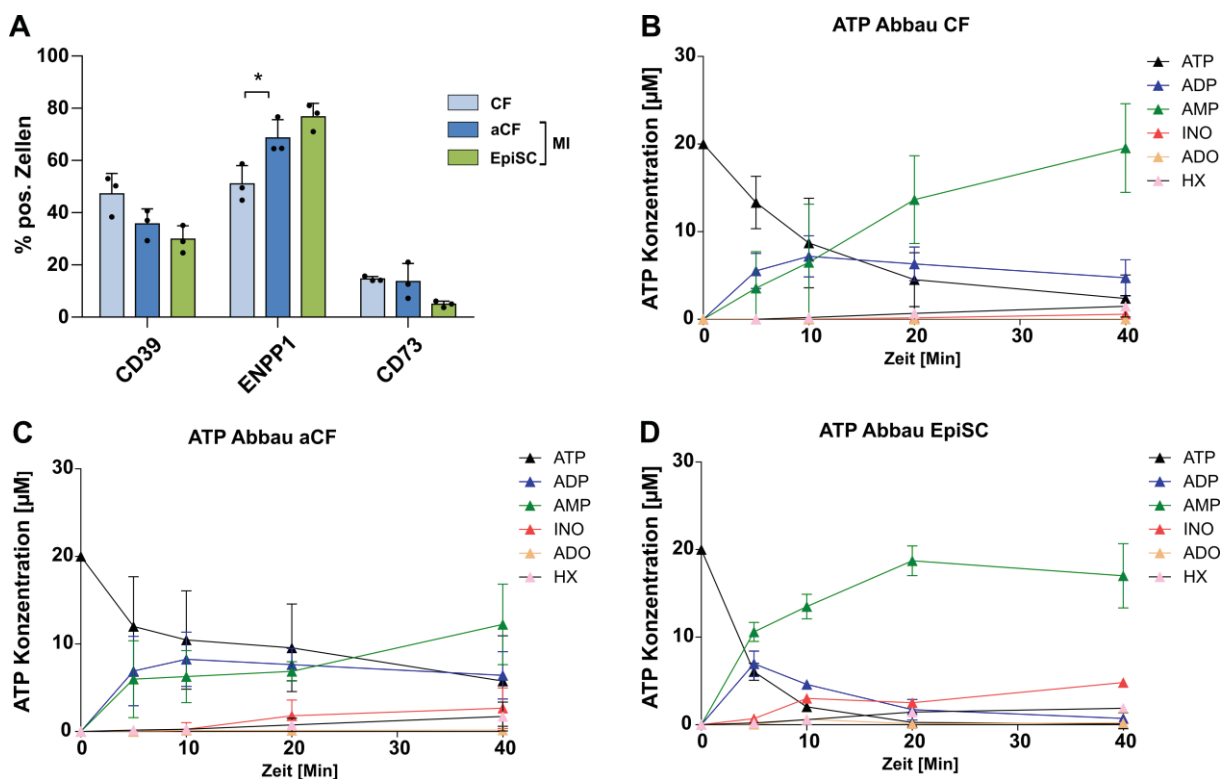
Abschließend wurde die Expression der Nukleosid-Transporter in den kombinierten Clustern der Einzelzellanalyse überprüft (Abb. 38A). Zu erkennen war, dass die Expression der konzentrativen Nukleosidtransporter nur knapp über der Nachweisgrenze lag, während die äquilibrativen Transporter *Slc29a1* und *Slc29a3* vergleichsweise stark exprimiert wurden (Abb. 38A). Die Überprüfung der Ergebnisse für den äquilibrativen Transporter *Slc29a3* über qRT-PCR ergab, dass das Transkript nach Infarkt in aCF runterreguliert wurde. In EpiSC lag das Expressionsniveau von *Slc29a1* deutlich unter dem der aCF (Abb. 38B).



**Abbildung 38: mRNA-Expression der äquilibrativen und konzentrativen Nukleosidtransporter in CF, aCF und EpiSC.** (A) Expression der Nukleosidtransporter innerhalb der kombinierten Cluster der Einzelzell-Sequenzierung. CF: Cluster 0, 2, 3, 5, 14; aCF: Cluster 1, 7, 10, 11, 13, 16; EpiSC: Cluster 4, 6, 8. (B) Expression der Nukleosidtransporter in CF, aCF und EpiSC gemessen über qRT-PCR. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über One-way ANOVA bestimmt. \*\*\*\*p < 0,0001; \*\*\*p < 0,001.

#### 4.7.2 Extrazellulärer ATP-Abbau in kultivierten CF, aCF und EpiSC

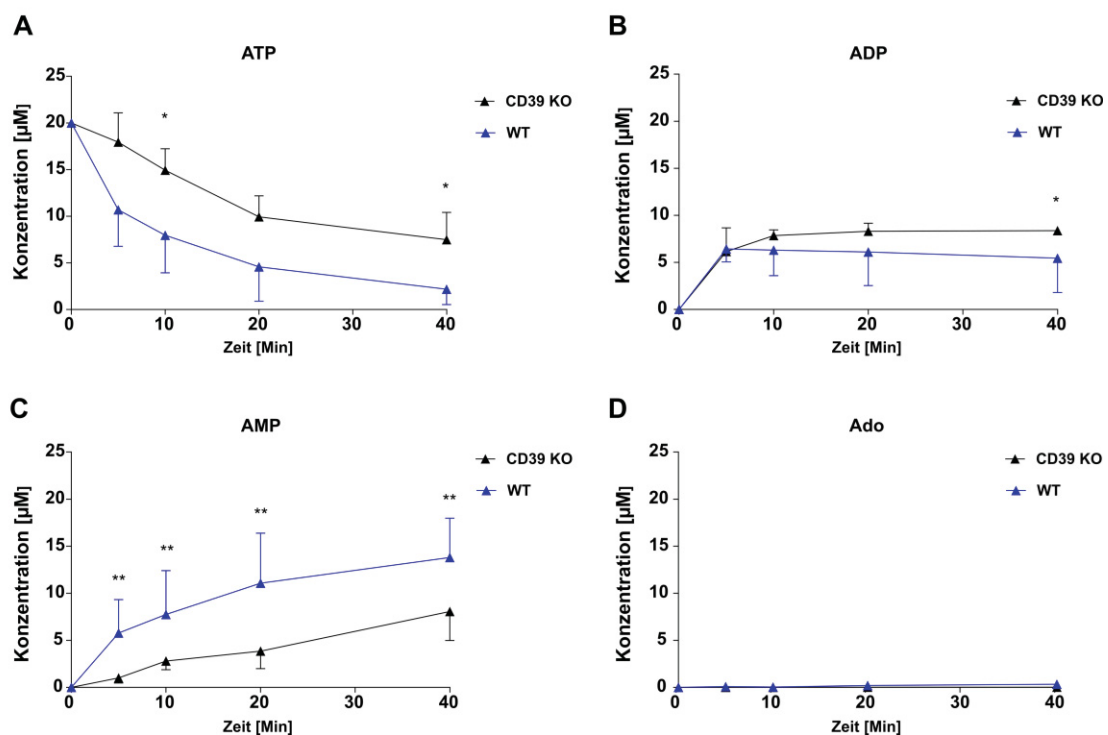
Für die Analyse des extrazellulären ATP-Abbaus wurde zunächst die Oberflächenexpression der ATP-degradierenden Enzyme CD39, ENPP1 und CD73 auf frisch isolierten CF, aCF sowie EpiSC durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 39A). In Übereinstimmung mit den qRT-PCR-Daten war innerhalb der drei Populationen ENPP1 am stärksten exprimiert, während CD39 auf etwa 1/3 der Zellen nachgewiesen wurde und CD73 nur von sehr wenigen Zellen exprimiert wurde. Die Zahl ENPP1-exprimierender Zellen stieg zudem in aCF nach Infarkt an (Abb. 39A). Anschließend wurde geprüft, ob extrazelluläres ATP von den Ektoenzymen auch aktiv abgebaut wird. Dazu wurde das Zellkulturmedium kultivierter Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  ATP versetzt und die ATP-Konzentration im Medium über die Zeit mit Hilfe von HPLC gemessen (Abb. 39 B-D). Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass ATP innerhalb von 40 Minuten von allen drei Zellpopulationen zu AMP abgebaut wurde (Abb. 39B-D). In EpiSC, die ATP innerhalb von 10 Minuten fast vollständig abbauten, erfolgte die Degradation am schnellsten (Abb. 39D). Die Zeitkurve zeigt, dass auch die ADP Konzentration tendenziell über die Zeit abnahm. Das aus ATP generierte ADP wurde demnach weiter zu AMP verstoffwechselt. Die Abbauprodukte Adenosin (Ado), Inosin (Ino) sowie Hypoxanthin (HX) wurden von CF (Abb. 39B) und aCF (Abb. 39C) nur in verschwindend geringem Maße gebildet. In EpiSC zeigt sich hingegen nach 40 Minuten eine Abnahme der AMP-Konzentration und ein Anstieg des Degradationsprodukts Inosin, während die Zwischenstufe Adenosin nicht nachweisbar war (Abb. 39D).



**Abbildung 39: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression ausgewählter purinergere Ektoenzyme sowie ATP-Abbau-Kinetiken von CF, aCF und EpiSC gemessen mit HPLC.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von CD39, ENPP1 und CD73 in frisch isolierten CF, aCF und EpiSC (n=3). (B) ATP-Abbau Kinetik von kultivierten CF isoliert aus nicht infarzierten Herzen (n =

4). (C) ATP-Abbau Kinetik von kultivierten aCF isoliert aus infarzierten Herzen 5 Tage nach Infarkt (n = 2). (D) ATP-Abbau Kinetik von kultivierten EpiSC isoliert aus infarzierten Herzen 5 Tage nach Infarkt (n = 2). Überstände wurden 5, 10, 20 und 40 Minuten nach Gabe von ATP gesammelt und mit HPLC gemessen. Die Reaktion wurde mit 20  $\mu\text{M}$  ATP gestartet. Die statistische Signifikanz wurde über *One-way ANOVA* bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ .

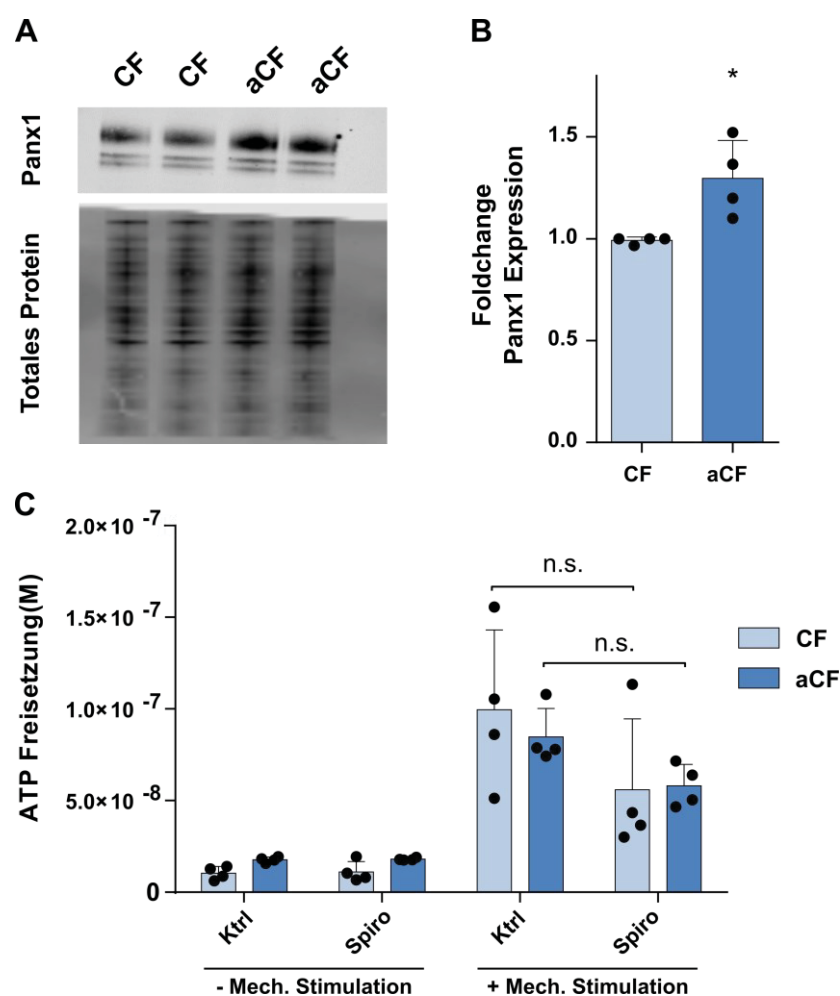
Um zu überprüfen, in welchem Ausmaß CD39 und ENPP 1/3 am beobachteten ATP-Abbau beteiligt sind, wurden CF aus CD39-Verlustmutanten isoliert und deren ATP-Abbau-Kinetik zu der von Wildtyp-CF verglichen (Abb. 40). Wie die Ergebnisse zeigen, bauen die Verlustmutanten über den Zeitraum von 40 Minuten nur etwa die Hälfte des ATPs im Überstand ab (Abb. 40A). Darüber hinaus akkumulierte in den Verlustmutanten mehr ADP (Abb. 40B), während gleichzeitig weniger AMP generiert wurde als in den Wildtypen (Abb. 40C). Adenosin wurde sowohl in den Verlustmutanten als auch in den Wildtypen nur in verschwindend geringem Maße gebildet (Abb. 40D). Neben der CD39 sind unter basalen Bedingungen folglich auch ENPP1/3 wesentlich am Abbau von ATP zu AMP beteiligt.



**Abbildung 40: ATP-Abbau-Kinetiken von kultivierten CF isoliert aus CD39-Verlustmutanten und Wildtypen.** (A) ATP-Konzentration, (B) ADP-Konzentration, (C) AMP-Konzentration (D) Ado-Konzentration im Überstand von kultivierten CF isoliert aus nicht infarzierten Herzen von CD39-Verlustmutanten und Wildtyp Tieren (n = 5 - 9). Überstände wurden 5, 10, 20 und 40 Minuten nach Gabe von 20  $\mu\text{M}$  ATP gesammelt und mit HPLC gemessen. WT: Wildtyp; KO: Knockout; Ado: Adenosin. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz wurde über einen Student's t-Test bestimmt. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ .

Die qRT-PCR zeigte, dass der Infarkt zum Anstieg der *Panx1* Expression in aCF führt (Abb. 33). Durch eine Western Blot Analyse sollte aus diesem Grund getestet werden, ob auch die Proteinexpression von *Panx1* in aCF ansteigt. Wie der Western Blot der Proteinlysate kultivierter CF und aCF zeigt, nahm insbesondere die Expression der glykolysierten Form des *Panx1* (obere Bande) nach Infarkt in aCF zu (Abb. 41A). Die Quantifizierung bestätigte, dass *Panx1* in aCF auch auf Proteinebene signifikant

hochreguliert wurde. Ob die erhöhte Panx-1 Expression auch mit einer vermehrten Ausschüttung von ATP einhergeht wurde anschließend mit Hilfe eines „ATP-Release-Assays“ untersucht. Dazu wurde die ATP-Konzentration im Überstand kultivierter CF und aCF vor (-) und nach (+) mechanischer Stimulation unter Ab- (Ktrl) und Anwesenheit (Spiro) des spezifischen Panx1 Inhibitors Spironolactone<sup>260</sup> über HPLC-Messungen bestimmt. Wie aus Abb. 41C hervor geht, induzierte die mechanische Stimulation in beiden Populationen einen deutlichen Anstieg der ATP-Konzentration im Überstand, die sich zwischen CF und aCF jedoch nicht unterschied. Folglich geht eine erhöhte Panx1 Expression nicht mit einer gesteigerten ATP-Freisetzung einher. Eine pharmakologische Hemmung der Panx1-Hemikanäle konnte die ATP-Freisetzung zudem nur leicht reduzieren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass lediglich ein kleiner Teil des ATPs Panx1-vermittelt freigesetzt wird.



**Abbildung 41: Proteinexpression von Panx1 sowie ATP-Freisetzung aus kultivierten CF und aCF nach mechanischer Stimulation unter Einfluss des Panx1 Inhibitors Spironolactone (Spiro).** (A) Repräsentativer Western Blot von Panx1 in kultivierten CF und aCF sowie Blot des aufgetragenen totalen Proteins. (B) Quantifizierung der Panx1 Protein Expression durch Normalisierung zum totalen Proteingehalt (n=4). Statistische Signifikanz wurde über einen ungepaarten Student's t-Test bestimmt. \*p<0,05. (C) ATP Freisetzung aus kultivierten CF und aCF vor (-) und nach (+) mechanischer Stimulation der Zellen unter Einsatz von Spiro oder DMSO (Ktrl). Ktrl: Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD. Es wurde ein gepaarter Student's t-Test zur Bestimmung der Signifikanz angewendet.

## 5 Diskussion

Ischämische Herzkrankheiten sind immer noch die häufigste Todesursache weltweit<sup>24</sup>. Zur Verbesserung der Herzfunktion nach Infarkt wird intensiv an antifibrotischen sowie regenerativen Therapieansätzen geforscht, die darauf abzielen, die Fibrosierung des Herzens zu reduzieren<sup>261</sup> bzw. das infarzierte Areal mit neuen funktionsfähigen Kardiomyozyten zu repopulieren<sup>262</sup>. Insbesondere aCF und EpiSC stellen nach Infarkt zwei vielversprechende Zielpopulationen für Therapiemaßnahmen dar, weil sie: 1) Hauptakteure bei der Fibrosierung des Herzens sind<sup>75,263</sup>, 2) modulatorisch wirkende parakrine Faktoren ausschütten<sup>81,101</sup>, und 3) das Potential bergen, sich in andere Zelltypen zu differenzieren<sup>87,127</sup>. Aufgrund ihrer entwicklungsgeschichtlichen Abstammung ähneln sich aCF und EpiSC hinsichtlich ihrer Markerexpression<sup>85,101,110</sup> und sind daher nur schwer voneinander zu unterscheiden. Vor diesem Hintergrund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neues robustes Protokoll für die simultane Isolation und Separation von aCF und EpiSC aus dem infarzierten Mäuseherzen etabliert. Dieses Verfahren erlaubte erstmals eine detaillierte Charakterisierung und den Vergleich der beiden stromalen Zellpopulationen nach Infarkt.

### 5.1 Methode zur simultanen Isolation von aCF und EpiSC

Die Isolation kardialer stromaler Zellen von hoher Reinheit mit möglichst nativem Expressionsprofil stellt wegen mangelnder Spezifität von Markern<sup>101</sup>, harscher Isolationsbedingungen<sup>64,77,109,113–116</sup> sowie rascher Aktivierung der Zellen in Kultur<sup>210</sup>, nach wie vor eine experimentelle Herausforderung dar. Erschwerend hinzu kommt, dass insbesondere der Gewebsverband des Herzens aufgrund der stabilen und festen Konsistenz des Organs vergleichsweise schwer aufzulösen ist. Um externe Einflüsse auf die Zellphysiologie zu minimieren, sollte das Isolationsprotokoll so kurz und schonend wie möglich für die Zellen sein. Ein entscheidender Faktor dafür stellt die Isolationsdauer dar.

Das in dieser Arbeit entwickelte Perfusions-Protokoll ermöglicht es, aCF und EpiSC von hoher Vitalität innerhalb kurzer Zeit (8 Minuten) simultan aus dem infarzierten Mäuseherzen zu isolieren (Abb. 8). Das Separationsprinzip nutzt dabei die unterschiedliche anatomische Lokalisation der beiden Zellpopulationen. Dazu werden isoliert perfundierte Herzen enzymatisch zur Gewinnung von aCF aus dem Myokard verdaut. Zeitgleich werden milde Scherkräfte auf die Herzoberfläche ausgeübt, um die dort lokalisierten EpiSC abzutragen, wodurch die beiden stromalen Zellpopulationen separiert und getrennt voneinander analysiert werden können. Durch Kombination des Verfahrens mit anschließender Depletion von Immun- und Endothelzellen ist es somit möglich, sehr reine aCF- und EpiSC-Populationen zu isolieren. Das etablierte Protokoll eignet sich besonders in frühen Phasen nach Infarkt dazu, die Zellpopulationen effizient voneinander zu trennen (Abb. 10) und deren individuellen Einfluss auf das Wundheilungsgeschehen über die Zeit zu verfolgen. Prinzipiell besteht bei einem enzymatischen Gewebeverdau das Risiko, dass die verwendeten proteolytischen Enzyme die Oberflächenepitope der Zellen beeinflussen, wodurch diese über Antikörper nicht mehr nachgewiesen werden können<sup>264</sup>. Da

über die durchflusszytometrischen Analysen die Expression zahlreicher Fibroblasten-Marker (Abb. 12) sowie verschiedener Ektoenzyme (Abb. 39) nachweisbar war, ist dieses Risiko für das neu etablierte Perfusions-Protokoll als gering einzuschätzen. Das Isolationsverfahren eignet sich demnach gut für die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen auf stromalen Zellen.

Aufgrund der koronaren Perfusion des Herzens (Langendorff) mit Kollagenaselösung ermöglicht die Isolationsmethode einen sehr kurzen enzymatischen Dissoziationsprozess des Gewebes und hat somit nur minimalen Einfluss auf die Zellphysiologie (Abb. 11B). Ein enzymatischer Langendorff-freier Isolationsansatz nach ähnlichem Prinzip wurde erst kürzlich publiziert<sup>109</sup>. Bei dieser Vorgehensweise wird die Aorta zunächst *in situ* abgeklemmt und das Herz dann aus dem Brustkorb der Maus entfernt. Anschließend wird der Verdau durch manuelle Injektion eines Dissoziationspuffers in den linken Ventrikel eingeleitet. Durch das Abklemmen der Aorta wird der Puffer wie bei der Perfusions-Methode über die Koronargefäße geleitet, wodurch ein ähnlich effektiver Gewebeverdau gewährleistet wird<sup>109</sup>. Neben der Tatsache, dass die Prozedur keine separate Isolation von aCF und EpiSC erlaubt, kann zudem durch die manuelle Applikation des Dissoziationspuffers kein konstanter Perfusionsdruck aufrecht erhalten werden, der für eine vollständige Perfusion und dem damit verbundenen homogenen Verdau des Gewebes notwendig ist. Die Autoren beschreiben außerdem, dass die für die Injektion des Puffers notwendige Einstichstelle der Nadel sich während der Versuchsdurchführung weitet<sup>109</sup>, wodurch der Puffer aus dem Ventrikel austritt und der Perfusionsdruck ebenfalls sinkt. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass über diese Vorgehensweise keine konstante Temperatur von 37 °C aufrechterhalten wird, was sich negativ auf die enzymatische Aktivität der Kollagenase ausübt<sup>265</sup> und in längeren Verdauzeiträumen resultiert. Die restlichen publizierten Isolationsprotokolle für CF/aCF verzichten hingegen gänzlich auf eine intrakoronare Perfusion und zerkleinern das Herzgewebe mechanisch, um die zu überwindenden Diffusionsabstände für den Dissoziationspuffer zu verkürzen. Im Gegensatz zur koronaren Perfusion benötigt dieses Vorgehen längere enzymatische Verdauzeiträume, die zwischen 30 und 80 Minuten betragen<sup>64,77,113–116</sup>. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, induzieren diese verhältnismäßig langen Isolationszeiträume die Expression früher Stress-assoziiierter Gene und verursachen somit in den Zellen einen deutlich stärkeren Stressimpuls als das Perfusions-Protokoll (Abb. 11B). Darüber hinaus erzielt das Perfusions-Protokoll eine signifikant höhere Zellausbeute als das Mincing-Protokoll (Abb. 11A), was auf einen effizienteren enzymatischen Verdau des Gewebes durch Perfusion hindeutet. Eine unvollständige Dissoziation ist insbesondere für die Durchführung quantitativer Analysen ungünstig und stellt zudem einen limitierenden Faktor bei Experimenten dar, für die hohe Zellausbeuten erforderlich sind. Neben den bereits beschriebenen Nachteilen, ist auch das Mincing-Protokoll nicht dazu geeignet die EpiSC- und aCF-Population voneinander zu separieren.

Die erfolgreiche Anreicherung von aCF und EpiSC wurde sowohl indirekt als auch direkt über eine Reihe verschiedener Experimente bewiesen. So stellte die geringe Zahl an Endothelzellen innerhalb der EpiSC-Fraktion (Abb. 8D) ein Indiz dafür dar, dass über den Einfluss von Scherkräften keine stärker

vaskularisierten Schichten des Myokards<sup>114</sup> abgetragen werden. In diesem Zusammenhang deutete auch die über die Einzelzellanalyse identifizierte epitheliale Zellpopulation im aCF Datensatz (Abb. 30C) darauf hin, dass höchstwahrscheinlich keine myokardialen Schichten durch das Prozedere abgetragen werden. Die Zellen des Myokards sind nämlich mesenchymalen Ursprungs und exprimieren keine Epithelzellmarker. Es ist daher eher anzunehmen, dass die Zellen des Epi-/Subepikards nicht vollständig durch die Scherkräfte vom Myokard gelöst wurden, wodurch sich das epitheliale Zellcluster im aCF-Datensatz erklären lässt. Dies könnte experimentell verbessert werden, indem die Drehzahl des Motors erhöht wird, der für das Schwenken des Reaktionsgefäßes zuständig ist in dem sich das isolierte Herz während des Verdauens befindet. Die höhere Drehzahl übt stärkere Scherkräfte auf die Herzoberfläche aus, wodurch die EpiSC-Population möglicherweise noch präziser vom Myokard abgetragen werden kann. Ein direkter Nachweis über die erfolgreiche Anreicherung von beiden Zellpopulationen wurde hingegen durch die Bestimmung der Expression des epi-/subepikardialen Markers WT-1 erbracht, der sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene deutlich in der EpiSC Population angereichert war (Abb. 9). Überraschenderweise unterschied sich die Zahl Wt-1<sup>+</sup>-Zellen zwischen kultivierten EpiSC (Abb. 9A) und frischen EpiSC-Isolaten enorm (Abb. 24B). Während der prozentuale Anteil Wt-1<sup>+</sup>-Zellen in der frisch isolierten EpiSC Population bei etwa 30% lag, wurden unter Kulturbedingungen knapp 80% Wt-1<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen. Dies deutet auf eine massive Veränderung der zellulären Zusammensetzung innerhalb der EpiSC-Population unter Kulturbedingungen hin, die sich vermutlich durch eine höhere Proliferationskapazität der Wt-1<sup>+</sup>-Zellen ergibt. Ein weiteres Indiz für die effiziente Anreicherung der EpiSC stellte der Nachweis über die Lokalisation verschiedener Marker im Epi-/Subepikard mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen (Abb. 20+21) sowie *in situ* Hybridisierungen (Abb. 28) dar.

Damit über die koronare Perfusion ein effizienter Verdau des Herzens ablaufen kann, ist es technisch von großer Bedeutung, dass sich keine Luftblasen im Schlauchsystem der Apparatur bilden. Die Luftblasen können nämlich zur Verlegung der Koronargefäße (Mikrothromben) führen, wodurch größere Areale des Herzens nicht mehr mit Kollagenase perfundiert werden. Außerdem spielt die genaue Positionierung der Kanüle in der Aorta, knapp über dem Abgang der Koronargefäße, eine entscheidende Rolle. Platziert man die Kanüle zu tief, verhindert auch dies eine effiziente Perfusion über die Koronarien und führt zu einem unvollständigen Gewebeverdau. Die Umsetzung des Protokolls erfordert aus diesem Grund zu Beginn ein hohes Maß an Übung, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Zusätzlich dazu ist eine weitere Limitation der Methode die Tatsache, dass innerhalb der aCF Fraktion nicht zwischen Zellen des rechten und linken Ventrikels unterschieden werden kann. In Vorversuchen wurde ausprobiert, die beiden Ventrikel nach Verdau voneinander zu separieren. Durch die weitgehende enzymatische Auflösung der Gewebestruktur resultierte dies jedoch in einer sehr ungenauen Abtrennung der Ventrikel.

## 5.2 Heterogenität kardialer stromaler Zellen nach Infarkt

Sowohl aCF als auch EpiSC werden als heterogene Zellpopulationen mit hoher Plastizität und vielfältigen Eigenschaften beschrieben<sup>85,100</sup>. Durch technologische Neuerungen auf dem Gebiet der Einzelzell-Sequenzierung<sup>266</sup> konnte das Bild der aCF in jüngsten Studien revolutioniert werden<sup>254,267–272</sup>. Die EpiSC Population erhielt dabei bislang nur wenig Aufmerksamkeit und wurde lediglich als „*minor population*“ beschrieben, auf deren funktionelle Bedeutung nicht weiter eingegangen wurde<sup>254</sup>. Durch die Anreicherung der EpiSC-Population war es in dieser Arbeit erstmals möglich, eine detaillierte Analyse der epi-/subepikardialen Zellen auf Einzelzellebene durchzuführen. Diese lieferte grundlegend neue Erkenntnisse hinsichtlich der zellulären Heterogenität des Epi-/Subepikards.

### 5.2.1 Zelluläre Heterogenität des infarzierten Epi-/Subepikards

Die Einzelzell-Sequenzierung offenbarte eine enorme Komplexität der EpiSC-Population. Insgesamt setzte sich die EpiSC-Population aus 11 transkriptionell verschiedenen Clustern zusammen (Abb. 24) und zeigte somit ähnlich starke Heterogenität wie die aCF-Population (Abb. 30). Die Heterogenität spiegelte sich auch in der Expression der bekannten Aktivierungsmarker des Epi-/Subepikards (*Wt-1*, *Sema3d*, *Aldh1a2*, *Tbx-18*) wider, die innerhalb der identifizierten 11 Subpopulationen sehr heterogen exprimiert wurden (Abb. 25). Überraschend war, dass der Großteil dieser epi-/subepikardialen Marker zudem auch in Clustern der aCF Fraktion nachgewiesen wurde, was deren Spezifität in Frage stellt (Abb. 26E). Lediglich die Expression von *Wt-1* war weitestgehend auf Populationen des Epi-/Subepikards begrenzt, markierte jedoch nur ein Drittel (~30%) der Zellen in der EpiSC-Population (Abb. 24). Mit Hilfe der Einzelzell-Sequenzierungsdaten war es möglich, vier neue Transkriptionsfaktoren (*Maf*, *Myrf*, *Nfe3l2*, *Hoxa5*) zu identifizieren, die ausschließlich von den *Wt-1*<sup>+</sup>-Subpopulationen exprimiert wurden und möglicherweise zur näheren Charakterisierung dieser Cluster geeignet sind (Abb. 26A-D). Vor diesem Hintergrund erscheint insbesondere die Expression der beiden Transkriptionsfaktoren *Nfe3l2* und *Maf* sehr interessant, die laut Literatur Heterodimere miteinander bilden und so die Transkription zellprotektiver Gene induzieren<sup>273</sup>. Welche Effekte diese Transkriptionsfaktoren spezifisch in den EpiSC vermitteln, ist bislang nicht bekannt und bedarf weiterer Analysen.

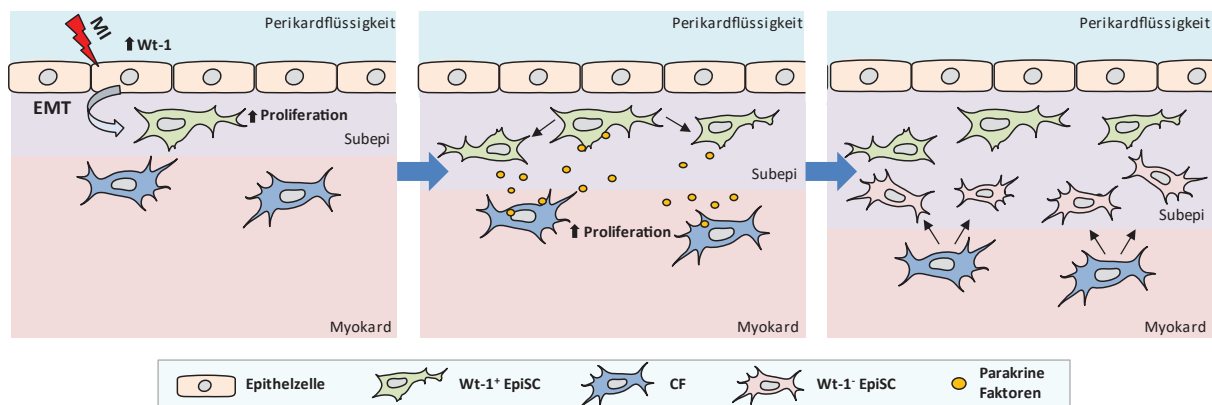
Entgegen der beobachteten Komplexität der EpiSC berichten die bisher publizierten Einzelzell-Studien am Herzen von lediglich einer<sup>254,269,271,272</sup> oder sogar keiner<sup>267,268,270</sup> epikardialen Population. Das hat höchstwahrscheinlich methodische Gründe, da in allen vorangegangenen Einzelzellanalysen die gesamte Nicht-Kardiomyozyten Fraktion untersucht wurde, wodurch die EpiSC-Population anteilig in den Analysen unterrepräsentiert war. Dies hat zur Folge, dass transkriptionelle Unterschiede zwischen kleineren Subpopulationen weniger stringent von der Software erfasst und somit in der Analyse nicht erkannt werden. Zusätzlich dazu wurde in den publizierten Studien mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Teil der EpiSC aufgrund ihrer teilweise starken transkriptionellen Ähnlichkeit zu CF/aCF nicht als solche erkannt, wie anhand der kombinierten Clusteranalyse in dieser Arbeit gezeigt werden konnte



(Abb. 32B). Die Anreicherung der EpiSC über das entwickelte Isolationsprotokoll ermöglichte folglich eine deutlich höhere zelluläre Auflösung der Population, in der die transkriptionellen Unterschiede der EpiSC erstmals stringent erfasst werden konnten.

Hinsichtlich des Differenzierungspotentials der EpiSC beschreiben Zhou et al., dass sich bereits eine Woche nach Infarkt ein Teil der *Wt-1*<sup>+</sup> Zellen zu glatten Muskelzellen und CF/aCF differenziert<sup>81</sup>. In der Einzelzellanalyse der EpiSC-Population wurden ebenfalls Cluster mit Fibroblasten-Signatur identifiziert (Abb. 29). Deren zelluläre Abstammung von *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen wurde jedoch über Lineage tracing Versuche nicht bestätigt (Abb. 31). Lediglich eine kleinere EpiSC-Subpopulation (EpiSC-Cluster 8) zeichnete sich durch die Ko-Expression von Fibroblastenmarkern (*Acta2*, *CD248* und *Colla1*) und *Wt-1* aus und ließ somit ein Differenzierungsverhalten der *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen in die CF/aCF-Linie vermuten. Mit einem prozentualen Anteil von nur 2,8% an der Gesamtpopulation ist dieses Zellcluster jedoch sehr klein, wodurch das Differenzierungspotential der *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen als relativ gering einzuordnen ist. Ein Differenzierungspfad in weitere Zelltypen des Herzens, wie glatte Muskelzellen oder Kardiomyozyten, war anhand der vorliegenden Daten zum Zeitpunkt von 5 Tagen nach Infarkt nicht zu erkennen. Dies passt zu der Annahme, dass adulte EpiSC ihr embryonales Potential nur teilweise rekapitulieren und sich von den embryonalen epikardialen Progenitorzellen (EPDC) unterscheiden<sup>85</sup>.

Ein Teil der identifizierten Subpopulationen des Epi-/Subepikards muss folglich aus anderen kardialen Zellpopulationen hervorgehen. Vorstellbar ist das in Abb. 42 illustrierte Szenario, das nachfolgend näher erläutert wird:



**Abbildung 42: Mögliches Szenario der Epikardaktivierung und der Entstehung der epikardialen stromalen Zellen (EpiSC) nach Infarkt.** CF: kardialer Fibroblast; EMT: Epithelial-mesenchymale Transition; MI: Myokardinfarkt; Subepi: Subepikard.

In Folge des Infarkts werden Signalstoffe vom Herzen in die Perikardflüssigkeit entlassen, die zur Aktivierung des Epikards und der Expression von *Wt-1* in den Epikardzellen führen<sup>82</sup>. Daraufhin durchlaufen einige Epikardzellen den EMT-Prozess und differenzieren sich zu *Wt-1*-exprimierenden, mesenchymalen Zellen, die in das Subepikard migrieren und dort lokal parakrine Faktoren wie

beispielsweise TGF- $\beta$  ausschütten<sup>81</sup>. Diese Faktoren aktivieren umliegende Zellen, höchstwahrscheinlich CF, welche infolgedessen lokal an der Herzoberfläche proliferieren und schließlich zum Zellpool der subepikardialen Zellen beitragen. Diese Hypothese würde auch die beobachtete Proteinexpression des bekannten aCF-Markers POSTN<sup>108</sup> im Subepikard des Herzens erklären (Abb. 21B). Der Einzelzellanalyse zu Folge ist die Expression von *Postn* nämlich auf das EpiSC-Cluster 5 zurückzuführen, in dem kein *Wt-1* exprimiert wurde. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass der Beitrag *Wt-1*-exprimierender EpiSC an der aCF-Population im Infarktbereich nur sehr gering ist und der Großteil der Zellen nach Infarkt im Subepikard lokalisiert bleibt<sup>108</sup>. Ob jedoch Anteile der im Subepikard ansässigen POSTN<sup>+</sup>-Zellen in Folge des Infarkts aktiv in das infarzierte Areal migrieren, um dort zum Wundheilungsgeschehen beizutragen, ist noch nicht bekannt.

### 5.2.2 Zelluläre Heterogenität des infarzierten Myokards

Neben der EpiSC-Population wurde im Rahmen der Arbeit auch die aCF-Population des Myokards hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung untersucht. Setzt man die Ergebnisse der erhobenen Einzelzellanalyse von aCF (Abb. 30) in Relation zu den bereits publizierten Einzelzell-Studien des adulten Herzens<sup>254,267-270</sup>, können die bislang beschriebenen Charakteristika der Subpopulationen weitgehend bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur fanden sich nach Infarkt 11 aCF-Cluster im Myokard<sup>269</sup>, die über die Expression von *Scal* (*Ly6a*), in *Scal*<sup>high</sup> und *Scal*<sup>low</sup> exprimierende Cluster unterschieden werden konnten<sup>254</sup>. Innerhalb dieser Cluster fand sich eine Subpopulation, in der mRNA-Transkripte des Wnt-Signalwegs stark angereichert waren. Diese entspricht dem Genexpressionsprofil der kürzlich beschriebenen WntX-Population, für die eine wichtige Rolle bei der kardialen Heilung vermutet wird<sup>254,270</sup>. Ein kleineres aCF-Cluster zeichnete sich zudem durch die Expression Interferon-induzierter Gene aus. Die spezifische Gensignatur dieses Clusters wurde ebenfalls in zwei vorangegangenen Studien beschrieben<sup>254,269</sup>. Darüber hinaus wurden in der aCF-Population zwei proliferative Zell-Cluster identifiziert, von deren Existenz in den vorangegangenen Studien auch berichtet wurde<sup>254,268,269</sup>. Betrachtet man die Markergene, die zur Charakterisierung dieser proliferativen Cluster in den Publikationen erwähnt werden, so fällt auf, dass sich diese zwischen den Studien stark unterscheiden. Vermutlich hängt das mit den gewählten unterschiedlichen Versuchszeitpunkten nach Infarkt zusammen. Die Zellproliferation ist bekanntermaßen ein streng regulierter Prozess<sup>274</sup>. Das Transkriptionsprofil der proliferierenden aCF kann sich daher innerhalb kürzester Zeiträume stark ändern, wodurch sich die Differenzen zwischen den Studien erklären lassen. Ein Markergen der proliferativen Cluster, das in allen Studien erwähnt wurde war *Mki67*<sup>254,268,269</sup>, welches auch in der hier durchgeführten Einzelzellanalyse stark in den proliferativen Clustern angereichert war (siehe Datenträger, Liste3\_ScRNAseq\_Markerexpression). Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse, dass die identifizierten Subpopulationen der aCF-Fraktion stark heterogene Expressionsprofile aufweisen, die verschiedene biologische Funktionen vermuten lassen. Zu bemerken ist an dieser Stelle, dass die Ableitung einer biologischen Funktion über Einzelzell-

Sequenzierung ein stark deskriptives Verfahren darstellt. Aus diesem Grund sollten die erhobenen Daten in zukünftigen Studien auch durch funktionelle Analysen gestützt werden.

### 5.3 Expression kardialer Gene in CF/aCF und EpiSC

Bislang gibt es nach Infarkt keine effektiven therapeutischen Ansätze, die eine Regeneration des infarzierten Areals durch die Neubildung von Kardiomyozyten fördert<sup>101,122</sup>. Vor diesem Hintergrund repräsentieren myokardiale (CF,aCF) sowie epikardiale stromale Zellen (EpiSC) aufgrund ihrer hohen Plastizität vielversprechende Zielpopulationen für Therapieansätze<sup>275</sup>. Furtado et al. beschrieb erstmals, dass CF frühe kardiale Gene exprimieren und vermutete dahinter kardiogenes Potential<sup>113</sup>. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Ergebnisse und belegt darüber hinaus ähnliches Potential für adulte EpiSC. Neben der bereits von Temme et al. beschriebenen Expression von *Gata4* und *Nkx2.5*<sup>86</sup> fand sich in EpiSC eine ganze Reihe weiterer kardialer Gene (Abb. 14; *Mef2c*, *Hand2*, *Tbx-5*, *Tbx-18*, *Tbx-20*) mit funktioneller Bedeutung für die Kardiomyozytendifferenzierung<sup>276</sup>.

In der Vergangenheit wurden CF bereits erfolgreich durch die Kombination der vier Transkriptionsfaktoren *Mef2c*, *Gata4*, *Tbx-5* und *Hand2* in Kardiomyozyten differenziert<sup>125,126,129</sup>. Unter *in vivo* Bedingungen findet dieser Differenzierungsprozess nach Infarkt interessanterweise trotz vorhandener Expression der notwendigen Transkriptionsfaktoren nicht selbstständig in den Zellen statt. Es muss folglich eine Situation vorliegen, welche die Zellen an der Differenzierung zu Kardiomyozyten hindert. Bei genauerer Betrachtung der Daten fällt auf, dass sowohl *Tbx-5*, welches als Hauptregulator der Kardiomyogenese gilt<sup>277</sup> als auch *Nkx2.5*, dessen Anwesenheit notwendig für den Abschluss der Kardiomyogenese ist<sup>222</sup>, nur sehr schwach von den stromalen Zellpopulationen (CF, aCF, EpiSC) exprimiert werden (Abb. 14). Furtado et al. verglichen in ihrer Studie die Expressionsspiegel verschiedener kardialer Gene zwischen CF und Kardiomyozyten. Bei dem Vergleich fiel auf, dass CF insbesondere die beiden mRNA-Transkripte *Nkx2.5* und *Tbx-5* vergleichsweise gering exprimierten<sup>113</sup>. Demzufolge sind die Expressionsspiegel bestimmter kardialer Gene in den stromalen Zellen möglicherweise schlichtweg zu gering, um eine spontane Differenzierung in Kardiomyozyten zu induzieren. Des Weiteren könnte das Vorhandensein bislang unbekannter Repressoren eine Rolle spielen, welche die Transkription essentieller Gene unterdrücken und somit eine Differenzierung der Zellen verhindern<sup>101</sup>.

Smart et al. belegen, dass adulte *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen sich nach *Priming* mit Tβ4 zu Kardiomyozyten differenzieren, was mit der Expression des kardialen Gens *Nkx2.5* einhergeht<sup>87</sup>. Bisher ist bekannt, dass Tβ4 modulierend auf das Chromatingerüst der Zellen wirkt<sup>278</sup>. Ob Tβ4 dabei möglicherweise auch Repressoren hemmt und somit die Kardiomyogenese durch vermehrte Expression kardialer Gene wie *Nkx2.5* fördert, ist bislang nicht untersucht. Interessanterweise wurde in der Einzelzell-Sequenzierung die Expression von *Tβ4* auf einem kleinen Teil der *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 27; EpiSC-Cluster 8) nachgewiesen. Eine Differenzierung dieser Zellen in Kardiomyozyten war zum untersuchten Zeitpunkt

(5 Tage nach Infarkt) anhand des Transkriptionsprofils nicht zu erkennen. Wie jedoch bereits unter 5.2.1 beschrieben, waren in diesem Cluster im Vergleich zu den anderen beiden *Wt-I<sup>+</sup>*-Clustern verschiedene Fibroblastenmarker angereichert. Hierdurch lässt sich vermuten, dass dieses Cluster zu späteren Zeitpunkten in Fibroblasten ausdifferenzieren könnte. Möglicherweise verbirgt sich hinter dieser Subpopulation eine kleine Fraktion von Zellen, die durch entsprechende Stimuli wie beispielsweise eine Erhöhung der Tβ4 Konzentration auch in Kardiomyozyten differenziert werden kann. Diese Hypothese ist jedoch rein spekulativ und bedarf in Zukunft weiterer Untersuchungen.

#### **5.4 Purinstoffwechsel kardialer stromaler Zellen vor (CF) und nach Infarkt (aCF, EpiSC)**

Extrazelluläre Nukleotide und deren Abbauprodukte beeinflussen nach Infarkt die verschiedenen Phasen des Wundheilungsgeschehens, indem sie inflammatorische<sup>143</sup> sowie fibrotische Prozesse modulieren<sup>161</sup>. Wie bereits in der Einleitung erklärt, wird die Konzentration und Verweildauer der Nukleotide/Nukleoside im Extrazellularraum dabei durch eine Vielzahl purinerner Ektoenzyme und Transporter bestimmt (siehe 1.7). Der extrazelluläre Purinstoffwechsel in stromalen Zellen des Herzens wurde bisher nur unvollständig untersucht.

Durch das entwickelte Isolationsprotokoll war es möglich eine vergleichende Genexpressionsanalyse des purinergen Systems in stromalen Zellen vor Infarkt (CF) und nach Infarkt (aCF, EpiSC) durchzuführen. Die Analyse bestätigte, dass der Großteil der purinergen Kanäle, Transporter, Enzyme und Rezeptoren sowohl von CF, aCF als auch von EpiSC exprimiert werden (Abb. 33-38). Folglich sind stromale Zellen des Herzens in der Lage, Einfluss auf die extrazelluläre Konzentration von Nukleotiden/Nukleosiden zu nehmen und die darüber vermittelten Prozesse nach Infarkt zu beeinflussen. Ein beobachtetes gemeinsames Charakteristikum der drei untersuchten stromalen Zellpopulationen stellt die starke Expression der Nukleotid-abbauenden Pyrophosphatasen ENPP1/3 (Abb. 35+39A) und der damit verbundene Abbau von extrazellulärem ATP zu AMP dar (Abb. 39B-D), welches von den Zellen jedoch nicht weiter zu Adenosin hydrolysiert wird (Abb. 39). Passend dazu wurde die Expression der AMP-degradierenden CD73 in den erhobenen durchflusszytometrischen Analysen nur auf einem verschwindend geringen Teil der stromalen Zellen nachgewiesen (Abb. 39A). Borg et al. berichteten in früheren Studien über die Abwesenheit der CD73 auf CF von Kontroll-Herzen<sup>176</sup>. Ergänzend dazu fand sich in dieser Arbeit, dass auch nach Infarkt in aCF sowie EpiSC keine vermehrte CD73 Expression bzw. Aktivität zu verzeichnen war (Abb. 39). Im Falle der EpiSC war dieses Ergebnis überraschend, da in der Vergangenheit eine starke CD73 Expression und der damit verbundene Abbau von ATP bis zur Stufe des Adenosins in EpiSC der Ratte beschrieben wurde<sup>110</sup>. Es bestehen folglich erhebliche speziesspezifische Unterschiede zwischen der Maus und der Ratte. Das von stromalen Zellen generierte AMP hat *in vivo* somit zwei Möglichkeiten auf das System einzuwirken. Zum einen gibt es in der Literatur Hinweise darauf, dass auch AMP an den A2B-Rezeptor binden kann

und über einen Gq-gekoppelten Signalweg den Influx von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle erhöht<sup>279</sup>. Zum anderen könnte das gebildete AMP als Substrat für die CD73 auf umliegenden Zellen zur Verfügung stehen. Fünf Tage nach Infarkt infiltrieren insbesondere T-Zellen das Infarktareal<sup>56</sup>, für die eine hohe CD73 Expression bekannt ist<sup>176</sup>. Denkbar ist aus diesem Grund, dass das gebildete AMP im Infarktareal von umliegenden T-Zellen weiter zu Adenosin abgebaut wird, das dann über die Bindung an Adenosin-Rezeptoren verschiedene Signalkaskaden in Gang setzt<sup>182</sup>. Der positive Einfluss auf die Wundheilung des Infarkts durch die CD73 Aktivität der T-Zellen und die damit verbundene Generierung von Adenosin wurde bereits in der Vergangenheit beschrieben<sup>280</sup>. Da auch im Epi-/Subepikard eine hohe Zahl an Immunzellen ansässig ist<sup>281</sup>, könnten dort ähnliche Prozesse nach Infarkt zum Tragen kommen. Welche Art von Immunzellen im Epi-/Subepikard lokalisiert sind und ob sie wirklich AMP zu Adenosin degradieren, ist bisher nicht im Detail untersucht und bedarf weiterer Forschung.

#### 5.4.1 Das purinerge Signalsystem kardialer Fibroblasten vor (CF) und nach Infarkt (aCF)

Grundsätzlich können Nukleotide aus intakten Zellen über membranständige Kanäle, wie Panx oder Cx, in den Extrazellularraum gelangen<sup>146</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg der Panx1 Expression nach Infarkt in aCF erkannt werden (Abb. 41A+B), welcher jedoch keinen Einfluss auf die Menge an ausgeschüttetem ATP aus der Zelle hatte (Abb. 41C). Die spezifische Hemmung von Panx1 mit Spironolactone<sup>260</sup> reduzierte zudem die ATP-Freisetzung nur geringfügig (Abb. 41C), wodurch anzunehmen ist, dass Panx1 für die Freisetzung von ATP nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dies ist im Einklang mit einer publizierten Studie von Lu et al., die beschreibt, dass der Großteil des ATPs durch Cx43- und Cx45 in den Extrazellularraum gelangt<sup>49</sup>. Die erhöhte Panx1 Expression muss folglich eine andere Funktion auf aCF erfüllen. Erst kürzlich wurde publiziert, dass Panx1 auf humanen Endothelzellen regulatorische Wirkung auf inflammatorische Prozesse hat, indem es den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle kontrolliert<sup>282</sup>. Die Autoren demonstrieren in der Studie, dass die Hemmung von Panx1-Hemikanälen bei  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation der Zellen zu einer Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx führt. Der reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx blockiert wiederum die Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B und reduziert somit die Expression von pro-inflammatorischem IL-1 $\beta$ <sup>282</sup>. Möglicherweise übernimmt Panx1 auf aCF nach Infarkt eine ähnliche regulative Rolle im Inflammationsprozess.

Nach Infarkt können Nukleotide durch passiv lytische Prozesse oder aktiv über Transporter in den Extrazellularraum gelangen. Dabei wird extrazelluläres ATP durch die Ektoenzyme CD39, ENPP1 und ENPP3 zu AMP hydrolysiert, während der Abbau von  $\text{NAD}^+$  durch CD38, CD157, ENPP1 sowie ENPP3 erfolgt. Nach Infarkt steigt in aCF die mRNA-Expression von *Enpp1* und *CD38* an (Abb. 35+36), wodurch die Vermutung nahe liegt, dass aCF extrazelluläres ATP sowie  $\text{NAD}^+$  vermehrt zu AMP hydrolysieren. Anhand der vorliegenden Daten konnte diese Annahme zumindest für den Abbau von ATP nicht bestätigt werden, da trotz erhöhter Proteinexpression von ENPP1 kein beschleunigter

ATP-Abbau zu verzeichnen war (Abb. 39). Während dies darauf hindeutet, dass die Aktivität der ENPP1 für den ATP-Abbau eine eher untergeordnete Rolle spielt, zeigten die ATP-Abbau Kinetiken kultivierter CF aus CD39-Verlustmutanten im Kontrast dazu, dass unter basalen Bedingungen neben CD39 auch ENPP1 und ENPP3 an der Degradation von ATP zu AMP beteiligt sind (Abb. 40). Möglicherweise handelt es sich hierbei um kompensatorische Effekte, bei der die Pyrophosphatasen die Funktion der CD39 im transgenen Tier übernehmen. Um dies zu überprüfen, wären Studien mit einem potenten Inhibitor der CD39 oder einer induzierbaren CD39-Verlustmutante notwendig, bei der die Enzymaktivität erst kurz vor dem Versuch zum Erliegen kommt. Ob aCF aufgrund der erhöhten *CD38* Expression vermehrt  $\text{NAD}^+$  nach Infarkt degradieren, ist noch nicht untersucht und wird derzeit im Institut für Molekulare Kardiologie erforscht.

Wie bereits oben beschrieben, bauen aCF das aus der  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Hydrolyse stammende AMP nicht weiter ab, wodurch es unter *in vivo* Bedingungen mit hoher Wahrscheinlichkeit rasch von umliegenden Immunzellen zu Adenosin hydrolysiert wird. Dieses kann dann über eine A2B-Rezeptoraktivierung fibrotische und inflammatorische Prozesse modulieren<sup>182</sup>. In den Genexpressionsanalysen wurden die mRNA-Transkripte der Adenosin-Rezeptoren mit Ausnahme von *Adora3* in CF und aCF nachgewiesen, wobei *Adora2a* und *Adora2b* dominierend waren (Abb. 37). Insbesondere fünf Tage nach Infarkt spielen aCF eine wichtige Rolle für die fibrotische Antwort des Herzens, indem sie proliferieren und EZM-Moleküle in die Umgebung sezernieren<sup>29</sup>. Da die Aktivierung des A2B-Rezeptors erst bei hohen Adenosin-Konzentrationen erfolgt<sup>188</sup>, ist dieser Rezeptor nach Infarkt von besonderem Interesse. Für den A2B-Rezeptor wurden in der Vergangenheit sowohl antifibrotische<sup>194-197</sup> als auch profibrotische<sup>191-193</sup> Effekte beschrieben. In welchem Ausmaß die Hemmung bzw. Aktivierung des A2B-Rezeptors in aCF das Wundheilungsgeschehen nach Infarkt beeinflusst, wird immer noch kontrovers diskutiert<sup>182</sup>. In diesem Zusammenhang wäre der Phänotyp einer aCF-spezifischen Verlustmutante des A2B-Rezeptors nach Infarkt interessant.

Durch die Einzelzell-Sequenzierung wurde des Weiteren eine Subpopulation identifiziert, die sich hinsichtlich des Purinstoffwechsels stark von dem Expressionsmuster der restlichen stromalen Zellen unterschied (Kombiniertes Cluster 14). Innerhalb dieses Clusters wurde eine massive Expression von *Cx37*, *Cx45*, *P2yr14* sowie *Adora2a* detektiert, die hingegen in den restlichen stromalen Zellclustern deutlich geringer war. Hinsichtlich des purinergeren Signalings stromaler Zellen erscheint diese Population als besonders interessant. Welche biologische Funktion hinter dem charakteristischen Expressionsprofil der Population steckt, ist derzeit unklar und bedarf weiterer Forschung.

#### 5.4.2 Das purinerge Signalsystem von aCF und EpiSC

Bezüglich des extrazellulären Purinstoffwechsels fanden sich zwischen EpiSC und aCF signifikante Genexpressionsunterschiede hinsichtlich der Connexine (Cx) (Abb. 33) und der Adenosinrezeptoren (Abb. 37). Während EpiSC ein breites Spektrum verschiedener Cx exprimierten, war die Expression in

aCF vergleichsweise gering (Abb. 33). Insbesondere für epitheliale Zellen ist eine starke Expression verschiedener Cx beschrieben, die eine entscheidende Rolle für die Migration und Polarisierung der Zellen in Folge einer Gewebsschädigung spielen<sup>283</sup>. Da EpiSC nach Infarkt durch EMT aus epithelialen Zellen des Epikards hervorgehen<sup>85</sup> und ins Subepikard migrieren, kann hier eine ähnliche Funktion der Cx für die EpiSC vermutet werden. Besonders *Cx43*, dessen Expressionsspiegel in der qRT-PCR Analyse 6-fach höher in EpiSC lag (Abb. 33B), spielt eine bedeutende Rolle für den Migrationsprozess von Epithelzellen<sup>284</sup>. So führt der Verlust von *Cx43* in Folge eines Gewebsschadens zu einem abnormen Wundheilungsprozess, der Einfluss auf die Zellpolarität der Epithelzellen hat und zu einer ungleichmäßigen und weniger gerichteten Migration der Zellen führt<sup>284</sup>. Ein weiterer grundlegender Unterschied zwischen EpiSC und aCF bestand in der Expression von *Adora2b*, welches in EpiSC vierfach stärker exprimiert wurde (Abb. 37B). In kultivierten EpiSC der Ratte resultierte die Stimulation des von *Adora2b* codierten A2B-Rezeptors mit dem spezifischen Agonisten Bay60-6583 in der Sekretion von IL-6, IL-10 und VEGF<sup>110</sup>. Während IL-6 ein pro-inflammatorisches Cytokin darstellt<sup>285</sup>, hat IL-10 anti-inflammatorische Wirkung<sup>286</sup>. Es stellt sich somit die Frage, ob der A2B-Rezeptor auf EpiSC positive oder negative Effekte im Wundheilungsprozess vermittelt. Das etablierte Protokoll erlaubt in Zukunft die Rolle des A2B-Rezeptors auf EpiSC näher zu analysieren.

## 5.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein effizientes und schnelles Protokoll für die simultane Isolation von aCF und EpiSC entwickelt, welches den nativen Zustand der Zellen nur minimal beeinflusst und Zellpopulationen von hoher Reinheit liefert. Dieses Protokoll ist besonders für vergleichende Studien von aCF und EpiSC geeignet, um die Biologie der stromalen Zellpopulationen und deren individuellen Beiträge zum Wundheilungsgeschehen nach Infarkt zu untersuchen. Schon jetzt war es darüber möglich, neue Erkenntnisse hinsichtlich der Markerexpression, der zellulären Heterogenität, dem kardiogenem Potential sowie des extrazellulären Purinstoffwechsels von CF, aCF und EpiSC zu gewinnen.

Die etablierte Methode in Kombination mit der seit einiger Zeit verfügbar gewordenen Einzelzell-Sequenzierungs-Technik erlaubt eine hochaufgelöste Analyse der EpiSC Population. In diesem Zusammenhang erscheint insbesondere die Verfolgung der *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen über die Zeit besonders interessant. Eine engmaschige Analyse der Zelldynamik über einen Zeitraum von 2-3 Wochen würde einen umfassenden Überblick auf das Differenzierungspotential und das Schicksal der *Wt-1*<sup>+</sup>-Zellen geben.

Ein weiterer interessanter Forschungsaspekt stellt die Rolle des Epikards in Folge anderer Herzpathologien dar. So sind beispielsweise Herzen mit ischämischer Kardiomyopathie durch einen vollständigen Verlust des Epikards gekennzeichnet<sup>287</sup>, während das Epikard bei einer durch Aortenkonstriktion (TAC = *Transverse Aortic Constriction*) induzierten Hypertrophie gänzlich

unbeeinflusst bleibt<sup>7</sup>. Die Prozesse, die zur Epikardaktivierung und der Proliferation der Zellen führen, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt<sup>82</sup> und scheinen sich zwischen verschiedenen Krankheitsmodellen zu unterscheiden. Die Analyse des Epikards und dessen Aktivierung in Folge weiterer kardiovaskulärer Pathologien ist bislang nicht gut untersucht und sollte in zukünftigen Projekten analysiert werden.

Die beobachtete Expression kardialer Gene lässt kardiogenes Potential der stromalen Zellpopulationen vermuten und könnte eine Basis für neue regenerative Therapieansätze darstellen. Vor diesem Hintergrund wäre es in zukünftigen Studien interessant, nach “molekularen Schaltern” zu suchen, welche die stromalen Zellen trotz Expression der notwendigen kardialen Gene an der Differenzierung zu Kardiomyozyten hindern. Ein tieferes Verständnis dieser regulatorischen Mechanismen könnte dabei helfen, die bislang nur sehr geringe Differenzierungseffizienz der Zellen in die kardiomyozytäre Richtung zu verbessern.

Die kürzlich für Endothelzellen beschriebene Funktion von Panx1 an der Regulation inflammatorischer Prozesse<sup>282</sup> wirft die Frage auf, ob die erhöhte Panx1 Expression auf aCF nach Infarkt möglicherweise mit einer ähnlichen Funktionen in Verbindung gebracht werden kann. Vor diesem Hintergrund ist es lohnend, die funktionelle Rolle von Panx1 auf aCF zu analysieren, was derzeit mit Hilfe einer aCF-spezifischen Panx1-Verlustmutante im Institut für Molekulare Kardiologie untersucht wird. In diesem Kontext soll auch das Zusammenspiel von aCF und Immunzellen beim Abbau extrazellulärer Nukleotide näher analysiert werden, um die funktionelle Rolle der Zellen im Purinstoffwechsel weiter aufzuschlüsseln.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Buckingham, M., Meilhac, S. & Zaffran, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 826–835 (2005).
2. Klinke, R. *Physiologie*. (Thieme, 2014).
3. Lighthouse, J. K. & Small, E. M. Transcriptional control of cardiac fibroblast plasticity. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **91**, 52–60 (2016).
4. Katz, T. C. *et al.* Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells. *Dev. Cell* **22**, 639–650 (2012).
5. Schlueter, J. & Brand, T. Epicardial Progenitor Cells in Cardiac Development and Regeneration. *J Cardiovasc. Transl. Res.* **5**, 641–653 (2012).
6. Doppler, S. A. *et al.* Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. *J. Thorac. Dis.* **9**, S36–S51 (2017).
7. Moore-Morris, T. *et al.* Resident fibroblast lineages mediate pressure overload–induced cardiac fibrosis. *J. Clin. Invest.* **124**, 2921–2934 (2014).
8. Ali Shah R. *et al.* Developmental Heterogeneity of Cardiac Fibroblasts Does Not Predict Pathological Proliferation and Activation. *Circ. Res.* **115**, 625–635 (2014).
9. Vega-Hernández, M., Kovacs, A., De Langhe, S. & Ornitz, D. M. FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 3331–3340 (2011).
10. Lajiness, J. D. & Conway, S. J. Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **0**, 2–8 (2014).
11. Niderla-Bielińska, J. *et al.* Proepicardium: Current Understanding of its Structure, Induction, and Fate. *Anat. Rec.* **302**, 893–903 (2019).
12. Kraus, F., Haenig, B. & Kispert, A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech. Dev.* **100**, 83–86 (2001).
13. Braitsch, C. M., Combs, M. D., Quaggin, S. E. & Yutzey, K. E. Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Dev. Biol.* **368**, 345–357 (2012).
14. Hastie, N. D. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development* **144**, 2862–2872 (2017).
15. von Gise, A. *et al.* WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through  $\beta$ -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Dev. Biol.* **356**, 421–431 (2011).
16. Kirschner, K. M., Wagner, N., Wagner, K.-D., Wellmann, S. & Scholz, H. The Wilms tumor suppressor Wt1 promotes cell adhesion through transcriptional activation of the alpha4integrin gene. *J. Biol. Chem.* **281**, 31930–31939 (2006).
17. Moore, A. W., McInnes, L., Kreidberg, J., Hastie, N. D. & Schedl, A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 1845–1857 (1999).
18. Acharya, A. *et al.* The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 2139–2149 (2012).
19. Wu, S.-P., Dong, X.-R., Regan, J. N., Su, C. & Majesky, M. W. Tbx18 Regulates Development of the Epicardium and Coronary Vessels. *Dev. Biol.* **383**, 307–320 (2013).
20. Thygesen Kristian *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation* **138**, e618–e651 (2018).
21. Louvard, Y., Lefèvre, T. & Morice, M.-C. Percutaneous coronary intervention for bifurcation coronary disease. *Heart Br. Card. Soc.* **90**, 713–722 (2004).

22. Reimer K A, Lowe J E, Rasmussen M M & Jennings R B. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* **56**, 786–794 (1977).
23. Bulluck, H., Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities. *Heart* **102**, 341–348 (2016).
24. World Health Organisation (WHO) Fact Sheet No 310: The top 10 causes of death. (2013)
25. Ibanez, B. *et al.* 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **39**, 119–177 (2018).
26. Kempf, T., Zarbock, A., Vestweber, D. & Wollert, K. C. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **90**, 361–369 (2012).
27. Frantz, S., Bauersachs, J. & Ertl, G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Res.* **81**, 474–481 (2009).
28. Blankesteyn, W. M. *et al.* Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol. Scand.* **173**, 75–82 (2001).
29. Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubryt, M. P. & Lindsey, M. L. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 448–458 (2017).
30. Jennings, R. B. Early phase of myocardial ischemic injury and infarction. *Am. J. Cardiol.* **24**, 753–765 (1969).
31. Kübler, W. & Spieckermann, P. G. Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1**, 351–377 (1970).
32. Jennings, R. B. & Reimer, K. A. Lethal Myocardial Ischemic Injury. *Am. J. Pathol.* **102**, 241–255 (1981).
33. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. & Korthuis, R. J. Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **298**, 229–317 (2012).
34. Lemasters, J. J. *et al.* The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. in *Myocardial Ischemia: Mechanisms, Reperfusion, Protection* (ed. Karmazyn, M.) 99–114 (Birkhäuser, 1996).
35. Raedschelders, K., Ansley, D. M. & Chen, D. D. Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol. Ther.* **133**, 230–255 (2012).
36. Baines, C. P. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* **104**, 181–188 (2009).
37. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J. Clin. Invest.* **123**, 92–100 (2013).
38. Zhao, Z.-Q. *et al.* Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* **6**, 279–290 (2001).
39. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 826–837 (2010).
40. Ravichandran, K. S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–455 (2011).
41. Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair and remodeling. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 255–265 (2014).
42. Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **0**, 74–82 (2014).

43. Turner, N. A. *et al.* Mechanism of TNF $\alpha$ -induced IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: Effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc. Res.* **76**, 81–90 (2007).
44. Turner, N. A. *et al.* Interleukin-1 $\alpha$  stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **297**, H1117–H1127 (2009).
45. Bujak, M. & Frangogiannis, N. G. The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **57**, 165–176 (2009).
46. Koudssi, F., López, J. E., Villegas, S. & Long, C. S. Cardiac Fibroblasts Arrest at the G1/S Restriction Point in Response to Interleukin (IL)-1 $\beta$  EVIDENCE FOR IL-1 $\beta$ -INDUCED HYPOPHOSPHORYLATION OF THE RETINOBLASTOMA PROTEIN. *J. Biol. Chem.* **273**, 25796–25803 (1998).
47. Frangogiannis, N. G. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* **97**, 738–747 (2007).
48. Sandanger, Ø. *et al.* The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* **99**, 164–174 (2013).
49. Lu, D., Soleymani, S., Madakshire, R. & Insel, P. A. ATP released from cardiac fibroblasts via connexin hemichannels activates profibrotic P2Y2 receptors. *FASEB J.* **26**, 2580–2591 (2012).
50. Frangogiannis, N. G. *et al.* Cytokines and the Microcirculation in Ischemia and Reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **30**, 2567–2576 (1998).
51. Frangogiannis, N. G. *et al.* Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF $\alpha$ , initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**, 699–710 (1998).
52. Frangogiannis, N. G. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* **58**, 88–111 (2008).
53. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* **204**, 3037–3047 (2007).
54. Dewald, O. *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts. *Circ. Res.* **96**, 881–889 (2005).
55. Horckmans, M. *et al.* Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *Eur. Heart J.* **38**, 187–197 (2017).
56. Yang, F. *et al.* Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp. Physiol.* **87**, 547–555 (2002).
57. Tang, T.-T. *et al.* Regulatory T cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* **107**, 232 (2011).
58. Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**, 945–953 (2013).
59. Takemura Genzou *et al.* Role of Apoptosis in the Disappearance of Infiltrated and Proliferated Interstitial Cells After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* **82**, 1130–1138 (1998).
60. Cleutjens, J. P., Verluyten, M. J., Smiths, J. F. & Daemen, M. J. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am. J. Pathol.* **147**, 325–338 (1995).
61. Dewald, O. *et al.* Of Mice and Dogs: Species-Specific Differences in the Inflammatory Response Following Myocardial Infarction. *Am. J. Pathol.* **164**, 665–677 (2004).
62. Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G. & Daemen, M. J. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.* **145**, 868–875 (1994).
63. Furtado, M. B., Costa, M. W. & Rosenthal, N. A. The cardiac fibroblast: Origin, identity and role in homeostasis and disease. *Differ. Res. Biol. Divers.* **92**, 93–101 (2016).
64. Kaur Harmandeep *et al.* Targeted Ablation of Periostin-Expressing Activated Fibroblasts Prevents Adverse Cardiac Remodeling in Mice. *Circ. Res.* **118**, 1906–1917 (2016).

65. Virag, J. A. I. *et al.* Fibroblast Growth Factor-2 Regulates Myocardial Infarct Repair: Effects on Cell Proliferation, Scar Contraction, and Ventricular Function. *Am. J. Pathol.* **171**, 1431–1440 (2007).
66. Zymek, P. *et al.* The Role of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Healing Myocardial Infarcts. *J. Am. Coll. Cardiol.* **48**, 2315–2323 (2006).
67. Booz, G. W. & Baker, K. M. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Res.* **30**, 537–543 (1995).
68. Dobaczewski, M., Chen, W. & Frangogiannis, N. G. Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 600–606 (2011).
69. Derynck, R. & Zhang, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* **425**, 577–584 (2003).
70. Shi-Wen, X. *et al.* Endothelin-1 Promotes Myofibroblast Induction through the ETA Receptor via a rac/Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-dependent Pathway and Is Essential for the Enhanced Contractile Phenotype of Fibrotic Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2707–2719 (2004).
71. House, S. L., Branch, K., Newman, G., Doetschman, T. & Schultz, J. E. J. Cardioprotection induced by cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 is mediated by the MAPK cascade. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **289**, H2167–H2175 (2005).
72. Laan, A. M. van der, Piek, J. J. & Royen, N. van. Targeting angiogenesis to restore the microcirculation after reperfused MI. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 515–523 (2009).
73. Cochain, C., Channon, K. M. & Silvestre, J.-S. Angiogenesis in the Infarcted Myocardium. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1100–1113 (2013).
74. Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl. Sci.* **4**, 449–467 (2019).
75. Ma, Y. *et al.* Myofibroblasts and the extracellular matrix network in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **466**, 1113–1127 (2014).
76. Holmes, J. W., Borg, T. K. & Covell, J. W. Structure and Mechanics of Healing Myocardial Infarcts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **7**, 223–253 (2005).
77. Fu, X. *et al.* Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J. Clin. Invest.* **128**, 2127–2143 (2018).
78. Pallero, M. A., Elzie, C. A., Chen, J., Mosher, D. F. & Murphy-Ullrich, J. E. Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J.* **22**, 3968–3979 (2008).
79. Gittenberger-de Groot, A. C. *et al.* The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation* **84**, 41–53 (2012).
80. Wijk, B. van, Gunst, Q. D., Moorman, A. F. M. & Hoff, M. J. B. van den. Cardiac Regeneration from Activated Epicardium. *PLOS ONE* **7**, e44692 (2012).
81. Zhou, B. *et al.* Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J. Clin. Invest.* **121**, 1894–1904 (2011).
82. Smits, A. M., Dronkers, E. & Goumans, M.-J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacol. Res.* **127**, 129–140 (2018).
83. Huang, G. N. *et al.* C/EBP Transcription Factors Mediate Epicardial Activation During Heart Development and Injury. *Science* **338**, 1599–1603 (2012).
84. Quijada Pearl, Trembley Michael A. & Small Eric M. The Role of the Epicardium During Heart Development and Repair. *Circ. Res.* **126**, 377–394 (2020).
85. Bollini, S. *et al.* Re-Activated Adult Epicardial Progenitor Cells Are a Heterogeneous Population Molecularly Distinct from Their Embryonic Counterparts. *Stem Cells Dev.* **23**, 1719–1730 (2014).

86. Temme, S. *et al.* Genetic profiling and surface proteome analysis of human atrial stromal cells and rat ventricular epicardium-derived cells reveals novel insights into their cardiogenic potential. *Stem Cell Res.* **25**, 183–190 (2017).
87. Smart, N. *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* **474**, 640–644 (2011).
88. Limana, F., Capogrossi, M. C. & Germani, A. The epicardium in cardiac repair: From the stem cell view. *Pharmacol. Ther.* **129**, 82–96 (2011).
89. Ding, Z. *et al.* Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. *STEM CELLS Transl. Med.* **5**, 639–650 (2016).
90. Weeke-Klump, A. *et al.* Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **49**, 606–616 (2010).
91. Winter E.M. *et al.* Preservation of Left Ventricular Function and Attenuation of Remodeling After Transplantation of Human Epicardium-Derived Cells Into the Infarcted Mouse Heart. *Circulation* **116**, 917–927 (2007).
92. Wei, K. *et al.* Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* **525**, 479–485 (2015).
93. Foglio, E. *et al.* Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *Int. J. Cardiol.* **197**, 333–347 (2015).
94. Lekic, P. C., Pender, N. & McCulloch, C. A. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases, and treatments of periodontal tissues? *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **8**, 253–268 (1997).
95. Ko, S. D., Page, R. C. & Narayanan, A. S. Fibroblast heterogeneity and prostaglandin regulation of subpopulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 3429–3432 (1977).
96. Bordin, S., Page, R. C. & Narayanan, A. S. Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. *Science* **223**, 171–173 (1984).
97. Hassell, T. M. & Stanek, E. J. Evidence that healthy human gingiva contains functionally heterogeneous fibroblast subpopulations. *Arch. Oral Biol.* **28**, 617–625 (1983).
98. Angello, J. C., Pendergrass, W. R., Norwood, T. H. & Prothero, J. Proliferative potential of human fibroblasts: An inverse dependence on cell size. *J. Cell. Physiol.* **132**, 125–130 (1987).
99. Souders, C. A., Bowers, S. L. K. & Baudino, T. A. Cardiac Fibroblast: The Renaissance Cell. *Circ. Res.* **105**, 1164–1176 (2009).
100. Lynch, M. D. & Watt, F. M. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J. Clin. Invest.* **128**, 26–35 (2018).
101. Furtado, M. B., Nim, H. T., Boyd, S. E. & Rosenthal, N. A. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development* **143**, 387–397 (2016).
102. Zeisberg, E. M. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat. Med.* **13**, 952–961 (2007).
103. Widyantoro Bambang *et al.* Endothelial Cell-Derived Endothelin-1 Promotes Cardiac Fibrosis in Diabetic Hearts Through Stimulation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Circulation* **121**, 2407–2418 (2010).
104. Kramann, R. *et al.* Perivascular Gli1+ Progenitors Are Key Contributors to Injury-Induced Organ Fibrosis. *Cell Stem Cell* **16**, 51–66 (2015).
105. Haudek, S. B. *et al.* Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18284–18289 (2006).
106. Amerongen, M. van *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *J. Pathol.* **214**, 377–386 (2008).

107. Möllmann, H. *et al.* Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovasc. Res.* **71**, 661–671 (2006).
108. Kanisicak, O. *et al.* Genetic lineage tracing defines myofibroblast origin and function in the injured heart. *Nat. Commun.* **7**, 12260 (2016).
109. Ackers-Johnson Matthew *et al.* A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart. *Circ. Res.* **119**, 909–920 (2016).
110. Hesse, J. *et al.* CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction. *FASEB J.* **31**, 3040–3053 (2017).
111. Takashima, A. Establishment of Fibroblast Cultures. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **00**, 2.1.1-2.1.12 (1998).
112. Eghbali-Webb, M. & Agocha, A. E. A simple method for preparation of cultured cardiac fibroblasts from adult human ventricular tissue. in *Novel Methods in Molecular and Cellular Biochemistry of Muscle* (eds. Pierce, G. N. & Claycomb, W. C.) 195–198 (Springer US, 1997).
113. Furtado Milena B. *et al.* Cardiogenic Genes Expressed in Cardiac Fibroblasts Contribute to Heart Development and Repair. *Circ. Res.* **114**, 1422–1434 (2014).
114. Pinto Alexander R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* **118**, 400–409 (2016).
115. Weber, S. C. *et al.* Isolation and Culture of Fibroblasts, Vascular Smooth Muscle, and Endothelial Cells From the Fetal Rat Ductus Arteriosus. *Pediatr. Res.* **70**, 236–241 (2011).
116. Melzer, M., Beier, D., Young, P. P. & Saraswati, S. Isolation and Characterization of Adult Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts. *J. Vis. Exp. JoVE* (2020).
117. Stellato, M., Czepiel, M., Distler, O., Błyszczuk, P. & Kania, G. Identification and Isolation of Cardiac Fibroblasts From the Adult Mouse Heart Using Two-Color Flow Cytometry. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, (2019).
118. Clunie-O'Connor, C. *et al.* The Derivation of Primary Human Epicardium-Derived Cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **35**, 2C.5.1-2C.5.12 (2015).
119. Zhou, B. & Pu, W. T. Isolation and Characterization of Embryonic and Adult Epicardium and Epicardium-Derived Cells. in *Cardiovascular Development: Methods and Protocols* (eds. Peng, X. & Antonyak, M.) 155–168 (Humana Press, 2012).
120. Wernly, B. *et al.* Regenerative Cardiovascular Therapies: Stem Cells and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
121. Orlic, D. *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701–705 (2001).
122. Fisher, S. A., Zhang, H., Doree, C., Mathur, A. & Martin-Rendon, E. Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2015)
123. Takeda, N. *et al.* Cardiac fibroblasts are essential for the adaptive response of the murine heart to pressure overload. *J. Clin. Invest.* **120**, 254–265 (2010).
124. Kim, J., Shapiro, L. & Flynn, A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* **151**, 8–15 (2015).
125. Ieda, M. *et al.* Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell* **142**, 375–386 (2010).
126. Nam, Y.-J. *et al.* Induction of diverse cardiac cell types by reprogramming fibroblasts with cardiac transcription factors. *Dev. Camb. Engl.* **141**, 4267–4278 (2014).
127. Klose, K., Gossen, M. & Stamm, C. Turning fibroblasts into cardiomyocytes: technological review of cardiac transdifferentiation strategies. *FASEB J.* **33**, 49–70 (2018).
128. Fu, J.-D. *et al.* Direct Reprogramming of Human Fibroblasts toward a Cardiomyocyte-like State. *Stem Cell Rep.* **1**, 235–247 (2013).

129. Qian, L. *et al.* In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* **485**, 593–598 (2012).
130. Sluijter, J. P. G. *et al.* MicroRNA-1 and -499 Regulate Differentiation and Proliferation in Human-Derived Cardiomyocyte Progenitor Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 859–868 (2010).
131. Jayawardena, T. M. *et al.* MicroRNA-Mediated In Vitro and In Vivo Direct Reprogramming of Cardiac Fibroblasts to Cardiomyocytes. *Circ. Res.* **110**, 1465–1473 (2012).
132. Sánchez-Abarca, L. I. *et al.* Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood* **115**, 107–121 (2010).
133. Chang, Y. *et al.* Multiple Directional Differentiation Difference of Neonatal Rat Fibroblasts from Six Organs. *Cell. Physiol. Biochem.* **39**, 157–171 (2016).
134. Cao, N. *et al.* Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science* **352**, 1216–1220 (2016).
135. Burnstock, G. Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circ. Res.* **120**, 207–228 (2017).
136. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Jr, G. J. G. & Stryer, L. *Stryer Biochemie*. (Springer Spektrum, 2018).
137. Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Verkhratsky, A. & Zimmermann, H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* **32**, 19–29 (2009).
138. Burnstock, G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *BioEssays* **34**, 218–225 (2012).
139. Taruno, A. ATP Release Channels. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
140. Yang, H. *et al.* Nutrient-Sensitive Mitochondrial NAD<sup>+</sup> Levels Dictate Cell Survival. *Cell* **130**, 1095–1107 (2007).
141. Kim, U. H. *et al.* Purification and Characterization of NAD Glycohydrolase from Rabbit Erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 147–152 (1993).
142. Lazarowski, E. R., Boucher, R. C. & Harden, T. K. Constitutive Release of ATP and Evidence for Major Contribution of Ecto-nucleotide Pyrophosphatase and Nucleoside Diphosphokinase to Extracellular Nucleotide Concentrations. *J. Biol. Chem.* **275**, 31061–31068 (2000).
143. Eltzschig, H. K. & Eckle, T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat. Med.* **17**, 1391–1401 (2011).
144. Lazarowski, E. R. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal.* **8**, 359–373 (2012).
145. Lohman, A. W., Billaud, M. & Isakson, B. E. Mechanisms of ATP release and signalling in the blood vessel wall. *Cardiovasc. Res.* **95**, 269–280 (2012).
146. Cogliati, B. *et al.* Connexins, pannexins and their channels in fibroproliferative diseases. *J. Membr. Biol.* **249**, 199–213 (2016).
147. Wang, N. *et al.* Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 35–50 (2013).
148. Quinn, T. A. *et al.* Electrotonic coupling of excitable and nonexcitable cells in the heart revealed by optogenetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 14852–14857 (2016).
149. Zhang, Y. *et al.* Connexin43 Expression Levels Influence Intercellular Coupling and Cell Proliferation of Native Murine Cardiac Fibroblasts. *Cell Commun. Adhes.* **15**, 289–303 (2008).
150. Rhee, D. Y. *et al.* Connexin 43 regulates epicardial cell polarity and migration in coronary vascular development. *Development* **136**, 3185–3193 (2009).
151. Burnstock, G. Introduction: P2 Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* vol. 4 793–803 (2004).

152. Jarvis, M. F. & Khakh, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* **56**, 208–215 (2009).
153. Hattori, M. & Gouaux, E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* **485**, 207–212 (2012).
154. Erb, L., Liao, Z., Seye, C. I. & Weisman, G. A. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflüg. Arch.* **452**, 552–562 (2006).
155. Chen, J.-B. *et al.* Adenosine-5'-triphosphate up-regulates proliferation of human cardiac fibroblasts. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 1140–1150 (2012).
156. Certal, M. *et al.* ADP-Induced Ca<sup>2+</sup> Signaling and Proliferation of Rat Ventricular Myofibroblasts Depend on Phospholipase C-Linked TRP Channels Activation Within Lipid Rafts. *J. Cell. Physiol.* **232**, 1511–1526 (2017).
157. Kukulski, F., Lévesque, S. A. & Sévigny, J. Chapter 9 - Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. in *Advances in Pharmacology* (eds. Jacobson, K. A. & Linden, J.) vol. 61 263–299 (Academic Press, 2011).
158. Kukulski, F. *et al.* Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal.* **1**, (2005).
159. Robson, S. C., Sévigny, J. & Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* **2**, 409–430 (2006).
160. Zimmermann, H., Zebisch, M. & Sträter, N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal.* **8**, 437–502 (2012).
161. Ferrari, D. *et al.* Purinergic signaling in scarring. *FASEB J.* **30**, 3–12 (2016).
162. Müller, T., Cicko, S. & Idzko, M. CD39 deficiency results in increased inflammation in an animal model of pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* **44**, (2014).
163. Lu, D. & Insel, P. A. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **306**, C779–C788 (2014).
164. Gijssbers, R., Aoki, J., Arai, H. & Bollen, M. The hydrolysis of lysophospholipids and nucleotides by autotaxin (NPP2) involves a single catalytic site. *FEBS Lett.* **538**, 60–64 (2003).
165. Hubert, S. *et al.* Extracellular NAD<sup>+</sup> shapes the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *J. Exp. Med.* **207**, 2561–2568 (2010).
166. Haag, F. *et al.* Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* **3**, 71 (2007).
167. Lu, D. & Insel, P. A. Hydrolysis of Extracellular ATP by Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase (ENTPD) Establishes the Set Point for Fibrotic Activity of Cardiac Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **288**, 19040–19049 (2013).
168. Grahnert, A. *et al.* Review: NAD<sup>+</sup>: A modulator of immune functions: *Innate Immun.* doi:10.1177/1753425910361989 (epub). (2010).
169. Flora, A. D., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L. & Bruzzone, S. Autocrine and Paracrine Calcium Signaling by the CD38/NAD<sup>+</sup>/Cyclic ADP-Ribose System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 176–191 (2004).
170. Gustafsson, A. J. *et al.* ADP ribose is an endogenous ligand for the purinergic P2Y1 receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **333**, 8–19 (2011).
171. Hirata, Y. *et al.* ADP ribosyl cyclase activity of a novel bone marrow stromal cell surface molecule, BST-1. *FEBS Lett.* **356**, 244–248 (1994).
172. Hussain, A. M. M., Lee, H. C. & Chang, C. F. Functional Expression of Secreted Mouse BST-1 in Yeast. *Protein Expr. Purif.* **12**, 133–137 (1998).



173. Hunsucker, S. A., Mitchell, B. S. & Sychala, J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.* **107**, 1–30 (2005).
174. Zimmermann, H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* **285**, 345–365 (1992).
175. Schutz, W., Schrader, J. & Gerlach, E. Different sites of adenosine formation in the heart. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **240**, H963–H970 (1981).
176. Bönner, F., Borg, N., Burghoff, S. & Schrader, J. Resident Cardiac Immune Cells and Expression of the Ectonucleotidase Enzymes CD39 and CD73 after Ischemic Injury. *PLoS ONE* **7**, (2012).
177. Chen, J.-F., Eltzschig, H. K. & Fredholm, B. B. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 265–286 (2013).
178. Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J. & Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol. Rev.* **63**, 1–34 (2011).
179. Klinger, M., Freissmuth, M. & Nanoff, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. *Cell. Signal.* **14**, 99–108 (2002).
180. Gessi, S., Merighi, S., Varani, K. & Borea, P. A. Chapter 2 - Adenosine Receptors in Health and Disease. in *Advances in Pharmacology* (eds. Jacobson, K. A. & Linden, J.) vol. 61 41–75 (Academic Press, 2011).
181. Fernandez, L. G., Sharma, A. K., LaPar, D. J., Kron, I. L. & Laubach, V. E. Adenosine A1 receptor activation attenuates lung ischemia–reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **145**, 1654–1659 (2013).
182. Vecchio, E. A., White, P. J. & May, L. T. Targeting Adenosine Receptors for the Treatment of Cardiac Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
183. Milne, G. R. & Palmer, T. M. Anti-Inflammatory and Immunosuppressive Effects of the A2A Adenosine Receptor. *TheScientificWorldJournal.* **11**, 320–39 (2011)
184. Haskó, G. *et al.* Adenosine inhibits IL-12 and TNF- $\alpha$  production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* **14**, 2065–2074 (2000).
185. Hamad, E. A. *et al.* Cardioprotection of Controlled and Cardiac-Specific Over-Expression of A2A-Adenosine Receptor in the Pressure Overload. *PLoS ONE* **7**, (2012).
186. 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. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **288**, H1851–H1858 (2005).
187. Lasley, R. D., Jahania, M. S. & Mentzer, R. M. Beneficial effects of adenosine A2a agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **280**, H1660–H1666 (2001).
188. Fredholm, B. B., Irenius, E., Kull, B. & Schulte, G. Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells | Abbreviations: cAMP, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate; CHO, Chinese hamster ovary; NBMPR, nitrobenzylthioinosine; and NECA, 5'-N-ethyl carboxamido adenosine. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 443–448 (2001).
189. Fredholm, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* **14**, 1315–1323 (2007).
190. Takahashi, H. K. *et al.* Effects of adenosine on adhesion molecule expression and cytokine production in human PBMC depend on the receptor subtype activated. *Br. J. Pharmacol.* **150**, 816–822 (2007).

191. Toldo, S. *et al.* GS-6201, a Selective Blocker of the A2B Adenosine Receptor, Attenuates Cardiac Remodeling after Acute Myocardial Infarction in the Mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343**, 587–595 (2012).
192. Zhang, H. *et al.* Blockade of A2B adenosine receptor reduces left ventricular dysfunction and ventricular arrhythmias 1 week after myocardial infarction in the rat model. *Heart Rhythm* **11**, 101–109 (2014).
193. Feng, W., Song, Y., Chen, C., Lu, Z. Z. & Zhang, Y. Stimulation of adenosine A2B receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC- $\delta$ -P38 signalling pathway. *Br. J. Pharmacol.* **159**, 1598–1607 (2010).
194. Villarreal, F., Epperson, S. A., Ramirez-Sanchez, I., Yamazaki, K. G. & Brunton, L. L. Regulation of cardiac fibroblast collagen synthesis by adenosine: roles for Epac and PI3K. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **296**, C1178–C1184 (2009).
195. Wakeno Masakatsu *et al.* Long-Term Stimulation of Adenosine A2b Receptors Begun After Myocardial Infarction Prevents Cardiac Remodeling in Rats. *Circulation* **114**, 1923–1932 (2006).
196. Epperson, S. A., Brunton, L. L., Ramirez-Sanchez, I. & Villarreal, F. Adenosine receptors and second messenger signaling pathways in rat cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **296**, C1171–C1177 (2009).
197. Lu, D., Aroonsakool, N., Yokoyama, U., Patel, H. H. & Insel, P. A. Increase in Cellular Cyclic AMP Concentrations Reverses the Profibrogenic Phenotype of Cardiac Myofibroblasts: A Novel Therapeutic Approach for Cardiac Fibrosis. *Mol. Pharmacol.* **84**, 787–793 (2013).
198. Cheong, S. L. *et al.* The A3 adenosine receptor as multifaceted therapeutic target: pharmacology, medicinal chemistry, and in silico approaches. *Med. Res. Rev.* **33**, 235–335 (2013).
199. Blackburn, M. R., Vance, C. O., Morschl, E. & Wilson, C. N. Adenosine Receptors and Inflammation. in *Adenosine Receptors in Health and Disease* (eds. Wilson, C. N. & Mustafa, S. J.) 215–269 (Springer, 2009).
200. Dubey Raghvendra K., Gillespie Delbert G., Zacharia Lefteris C., Mi Zaichuan & Jackson Edwin K. A2B Receptors Mediate the Antimitogenic Effects of Adenosine in Cardiac Fibroblasts. *Hypertension* **37**, 716–721 (2001).
201. Dubey Raghvendra K., Gillespie Delbert G. & Jackson Edwin K. Adenosine Inhibits Collagen and Protein Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Hypertension* **31**, 943–948 (1998).
202. Chen, Y. *et al.* Functional effects of enhancing or silencing adenosine A2b receptors in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **287**, H2478–H2486 (2004).
203. Phosri, S. *et al.* Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway. *Front. Pharmacol.* **8**, (2017).
204. Yegutkin, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1783**, 673–694 (2008).
205. Young, J. D., Yao, S. Y. M., Baldwin, J. M., Cass, C. E. & Baldwin, S. A. The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29. *Mol. Aspects Med.* **34**, 529–547 (2013).
206. Boison, D. Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacol. Rev.* **65**, 906–943 (2013).
207. Enyoloji, K. *et al.* Targeted disruption of cd39 /ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. *Nat. Med.* **5**, 1010–1017 (1999).
208. Kim, H., Kim, M., Im, S.-K. & Fang, S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab. Anim. Res.* **34**, 147–159 (2018).

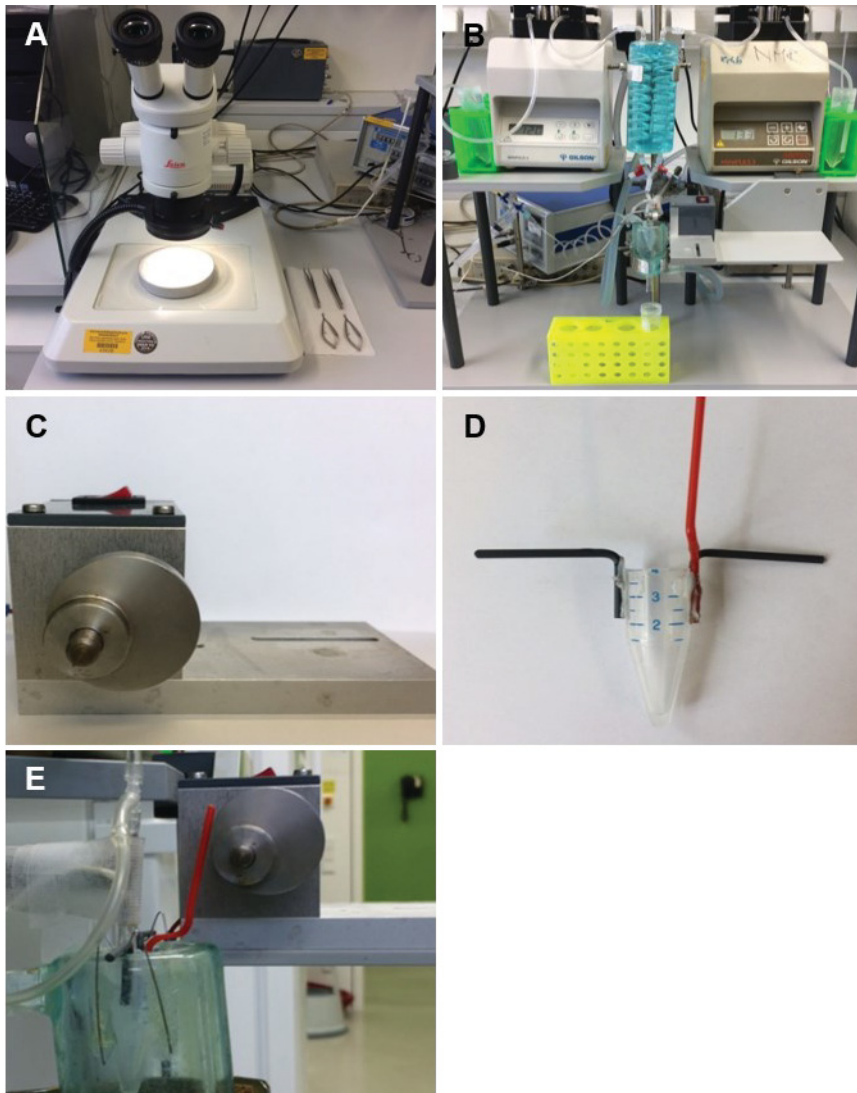
209. Cao, J. & Poss, K. D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat. Rev. Cardiol.* **15**, 631–647 (2018).
210. Yeung, T. *et al.* Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil. Cytoskeleton* **60**, 24–34 (2005).
211. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
212. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. in *Methods in Enzymology* vol. 155 335–350 (Academic Press, 1987).
213. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
214. Salomon, R. *et al.* Droplet-based single cell RNAseq tools: a practical guide. *Lab. Chip* **19**, 1706–1727 (2019).
215. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat. Biotechnol.* **36**, 411–420 (2018).
216. McGinnis, C. S., Murrow, L. M. & Gartner, Z. J. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. *Cell Syst.* **8**, 329–337.e4 (2019).
217. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**, 48 (2009).
218. Hu, H. *et al.* AnimalTFDB 3.0: a comprehensive resource for annotation and prediction of animal transcription factors. *Nucleic Acids Res.* **47**, D33–D38 (2019).
219. Wang, F. *et al.* RNAscope. *J. Mol. Diagn. JMD* **14**, 22–29 (2012).
220. Smolenski, R. T., Lachno, D. R., Ledingham, S. J. M. & Yacoub, M. H. Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* **527**, 414–420 (1990).
221. Simões, F. C. & Riley, P. R. The ontogeny, activation and function of the epicardium during heart development and regeneration. *Development* **145**, (2018).
222. Anderson, D. J. *et al.* NKX2-5 regulates human cardiomyogenesis via a HEY2 dependent transcriptional network. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
223. Adams, R. H. & Eichmann, A. Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001875 (2010).
224. Grouleff, J., Irudayam, S. J., Skeby, K. K. & Schiøtt, B. The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1848**, 1783–1795 (2015).
225. Bastiaanse, E. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc. Res.* **33**, 272–283 (1997).
226. Rooney, N. & Streuli, C. H. How integrins control mammary epithelial differentiation: A possible role for the ILK–PINCH–Parvin complex. *FEBS Lett.* **585**, 1663–1672 (2011).
227. Vaynberg, J. *et al.* Non-catalytic signaling by pseudokinase ILK for regulating cell adhesion. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
228. Chang, S. S., Rape, A. D., Wong, S. A., Guo, W. & Wang, Y. Migration regulates cellular mechanical states. *Mol. Biol. Cell* **30**, 3104–3111 (2019).
229. Braungart, E., Degitz, K. & Magdolen, V. Retinoic Acid Upregulates the Plasminogen Activator System in Human Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 778–784 (2001).
230. Wu, L. *et al.* IL-10-producing B cells are enriched in murine pericardial adipose tissues and ameliorate the outcome of acute myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 21673–21684 (2019).

231. Kim, S.-L. *et al.* Lipocalin 2 negatively regulates cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition through changing metabolic gene expression in colorectal cancer. *Cancer Sci.* **108**, 2176–2186 (2017).
232. Bochmann, L. *et al.* Revealing New Mouse Epicardial Cell Markers through Transcriptomics. *PLOS ONE* **5**, e11429 (2010).
233. Tie, L., Wang, D., Shi, Y. & Li, X. Aquaporins in Cardiovascular System. in *Aquaporins* (ed. Yang, B.) 105–113 (Springer Netherlands, 2017).
234. Li, L., Weng, Z., Yao, C., Song, Y. & Ma, T. Aquaporin-1 Deficiency Protects Against Myocardial Infarction by Reducing Both Edema and Apoptosis in Mice. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
235. Bornstein, P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 189–200 (2009).
236. Nagy, J. A., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. VEGF-A and the Induction of Pathological Angiogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2**, 251–275 (2007).
237. Mouton, A. J. *et al.* Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis. *Basic Res. Cardiol.* **114**, (2019).
238. Serpico, A. F. & Grieco, D. Recent advances in understanding the role of Cdk1 in the Spindle Assembly Checkpoint. *F1000Research* **9**, (2020).
239. Furtado, M. B. *et al.* Microarray profiling to analyse adult cardiac fibroblast identity. *Genomics Data* **2**, 345–350 (2014).
240. Pyagay Peter *et al.* Collagen Triple Helix Repeat Containing 1, a Novel Secreted Protein in Injured and Diseased Arteries, Inhibits Collagen Expression and Promotes Cell Migration. *Circ. Res.* **96**, 261–268 (2005).
241. LeClair Renée J. *et al.* Cthrc1 Is a Novel Inhibitor of Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling and Neointimal Lesion Formation. *Circ. Res.* **100**, 826–833 (2007).
242. Yoshida, H. *et al.* KIAA1199, a deafness gene of unknown function, is a new hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 5612–5617 (2013).
243. West, D. C., Hampson, I. N., Arnold, F. & Kumar, S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* **228**, 1324–1326 (1985).
244. Hou, L. *et al.* Cardiomyocyte dimethylarginine dimethylaminohydrolase1 attenuates left-ventricular remodeling after acute myocardial infarction: involvement in oxidative stress and apoptosis. *Basic Res. Cardiol.* **113**, 28 (2018).
245. Golan-Lagziel, T. *et al.* Analysis of rat cardiac myocytes and fibroblasts identifies combinatorial enhancer organization and transcription factor families. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **116**, 91–105 (2018).
246. Sandell, L. L., Guan, X.-J., Ingram, R. & Tilghman, S. M. Gtm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4622–4627 (2003).
247. Guimarães-Ferreira, L. Role of the phosphocreatine system on energetic homeostasis in skeletal and cardiac muscles. *Einstein* **12**, 126–131 (2014).
248. Bradshaw, A. D. The role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in cardiac repair and fibrosis: Does expression of SPARC by macrophages influence outcomes? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **93**, 156–161 (2016).
249. Wittmann, J. *et al.* Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Sci. Rep.* **8**, 13140 (2018).
250. Friedl, P. & Mayor, R. Tuning Collective Cell Migration by Cell–Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **9**, a029199 (2017).
251. Bollini, S., Riley, P. R. & Smart, N. Thymosin  $\beta$ 4: multiple functions in protection, repair and regeneration of the mammalian heart. *Expert Opin. Biol. Ther.* **15 Suppl 1**, S163-174 (2015).

252. Poggi, L., Casarosa, S. & Carl, M. An Eye on the Wnt Inhibitory Factor Wif1. *Front. Cell Dev. Biol.* **6**, (2018).
253. Foulquier, S. *et al.* WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol. Rev.* **70**, 68–141 (2018).
254. Farbehi, N. *et al.* Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *eLife* **8**, e43882 (2019).
255. Shindo, K. *et al.* Cartilage Intermediate Layer Protein 1 Suppresses TGF- $\beta$  Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Int. J. Gerontol.* **11**, 67–74 (2017).
256. Muppala, S. *et al.* Thrombospondin-4 mediates TGF- $\beta$ -induced angiogenesis. *Oncogene* **36**, 5189–5198 (2017).
257. Roche, P. L. *et al.* Role of scleraxis in mechanical stretch-mediated regulation of cardiac myofibroblast phenotype. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **311**, C297–C307 (2016).
258. Stewart, A. G., Thomas, B. & Koff, J. TGF- $\beta$ : Master regulator of inflammation and fibrosis. *Respirology* **23**, 1096–1097 (2018).
259. Choong, O. K. *et al.* Hypoxia-induced H19/YB-1 cascade modulates cardiac remodeling after infarction. *Theranostics* **9**, 6550–6567 (2019).
260. Good Miranda E. *et al.* Pannexin 1 Channels as an Unexpected New Target of the Anti-Hypertensive Drug Spironolactone. *Circ. Res.* **122**, 606–615 (2018).
261. Fan, Z. & Guan, J. Antifibrotic therapies to control cardiac fibrosis. *Biomater. Res.* **20**, (2016).
262. Liew, L. C., Ho, B. X. & Soh, B.-S. Mending a broken heart: current strategies and limitations of cell-based therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, (2020).
263. Smart, N. & Riley, P. R. The epicardium as a candidate for heart regeneration. *Future Cardiol.* **8**, 53–69 (2012).
264. Van Damme, N. *et al.* Chemical agents and enzymes used for the extraction of gut lymphocytes influence flow cytometric detection of T cell surface markers. *J. Immunol. Methods* **236**, 27–35 (2000).
265. Peterson, M. E., Daniel, R. M., Danson, M. J. & Eisenthal, R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem. J.* **402**, 331–337 (2007).
266. Walter, J. & Schickl, H. EINZELZELLANALYSE IN FORSCHUNG UND MEDIZIN. 95.
267. Gladka Monika M. *et al.* Single-Cell Sequencing of the Healthy and Diseased Heart Reveals Cytoskeleton-Associated Protein 4 as a New Modulator of Fibroblasts Activation. *Circulation* **138**, 166–180 (2018).
268. Kretzschmar, K. *et al.* Profiling proliferative cells and their progeny in damaged murine hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E12245–E12254 (2018).
269. Forte, E. *et al.* Dynamic Interstitial Cell Response during Myocardial Infarction Predicts Resilience to Rupture in Genetically Diverse Mice. *Cell Rep.* **30**, 3149-3163.e6 (2020).
270. Skelly, D. A. *et al.* Single-Cell Transcriptional Profiling Reveals Cellular Diversity and Intercommunication in the Mouse Heart. *Cell Rep.* **22**, 600–610 (2018).
271. Asp, M. *et al.* A Spatiotemporal Organ-Wide Gene Expression and Cell Atlas of the Developing Human Heart. *Cell* **179**, 1647-1660.e19 (2019).
272. Cui, Y. *et al.* Single-Cell Transcriptome Analysis Maps the Developmental Track of the Human Heart. *Cell Rep.* **26**, 1934-1950.e5 (2019).
273. Kannan, M. B., Solovieva, V. & Blank, V. The small MAF transcription factors MAFF, MAFG and MAFK: Current knowledge and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1823**, 1841–1846 (2012).
274. Duronio, R. J. & Xiong, Y. Signaling Pathways that Control Cell Proliferation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).

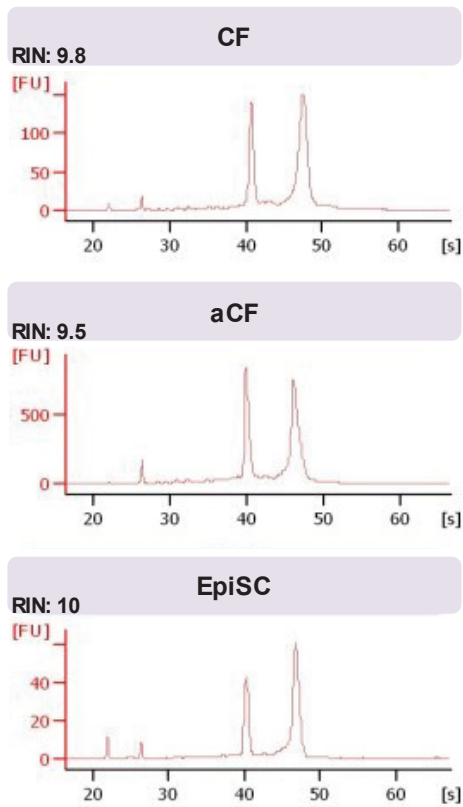
275. Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P. & Kovacic, J. C. Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Dev. Camb. Engl.* **143**, 1242–1258 (2016).
276. Paige, S. L., Plonowska, K., Xu, A. & Wu, S. M. Molecular Regulation of Cardiomyocyte Differentiation. *Circ. Res.* **116**, 341–353 (2015).
277. Steimle, J. D. & Moskowitz, I. P. TBX5: A Key Regulator of Heart Development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **122**, 195–221 (2017).
278. Vieira, J. M. *et al.* BRG1-SWI/SNF-dependent regulation of the Wt1 transcriptional landscape mediates epicardial activity during heart development and disease. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
279. Holien, J. K. *et al.* AMP and adenosine are both ligands for adenosine 2B receptor signaling. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 202–206 (2018).
280. Borg Nadine *et al.* CD73 on T Cells Orchestrates Cardiac Wound Healing After Myocardial Infarction by Purinergic Metabolic Reprogramming. *Circulation* **136**, 297–313 (2017).
281. Balmer, G. M. *et al.* Dynamic haematopoietic cell contribution to the developing and adult epicardium. *Nat. Commun.* **5**, 1–12 (2014).
282. Yang, Y. *et al.* Endothelial Pannexin 1 Channels Control Inflammation by Regulating Intracellular Calcium. *J. Immunol.* (2020) doi:10.4049/jimmunol.1901089.
283. Matsuuchi, L. & Naus, C. C. Gap junction proteins on the move: Connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1828**, 94–108 (2013).
284. Simpson, K. J. *et al.* Identification of genes that regulate epithelial cell migration using an siRNA screening approach. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1027–1038 (2008).
285. Fontes, J. A., Rose, N. R. & Čiháková, D. The varying faces of IL-6: from cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* **74**, 62–68 (2015).
286. Commins, S., Steinke, J. W. & Borish, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**, 1108–1111 (2008).
287. Meglio, F. D. *et al.* Epicardial cells are missing from the surface of hearts with ischemic cardiomyopathy: A useful clue about the self-renewal potential of the adult human heart? *Int. J. Cardiol.* **145**, e44–e46 (2010).

## 7 Appendix



**Ergänzende Abbildung 1: Bilder des modifizierten Langendorff-Aufbaus und Arbeitsbereichs zur Isolation von CF, aCF und EpiSC.** (A) Arbeitsbereich zur Präparation des murinen Herzens. Das Herz wird in einem gekühlten Metall Gefäß platziert und unter dem Binokular frei von Thymus und Fettgewebe präpariert. (B) Übersicht des Langendorff-Aufbaus. (C) Motor-betriebene exzentrische Platte zur Ausübung von Scherkräften. (D) Modifiziertes 5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit zwei Seitenarmen zur Halterung im Aufbau und einem Plastikstab zur Übertragung der Bewegung von Motor auf das Reaktionsgefäß. (E) Bild zur Illustration der Position von Motor und Plastikstab.

A



B

| Sample  | RIN |
|---------|-----|
| CF 1    | 9.4 |
| CF 2    | 9.4 |
| CF 3    | 9.8 |
| CF 4    | 9.2 |
| CF 5    | 9.9 |
| aCF 1   | 9.2 |
| aCF 2   | 9.5 |
| aCF 3   | 9.3 |
| aCF 4   | 8.7 |
| aCF 5   | 9.7 |
| EpiSC 1 | 10  |
| EpiSC 2 | 10  |
| EpiSC 3 | 9.9 |
| EpiSC 4 | 10  |
| EpiSC 5 | 9.6 |

**Ergänzende Abbildung 2: Qualitätskontrolle der aus CF, aCF und EpiSC isolierten mRNA-Proben. (A)** Repräsentatives Elektropherogramm für CF, aCF und EpiSC. **(B)** Tabellarische Auflistung der RNA-Integritäts-Nummern (RIN) jeder individuellen Probe (n=5).



**Ergänzende Tabelle 1: Nachweis von Kontamination innerhalb der identifizierten EpiSC-Cluster der Einzelzell-RNA-Sequenzierung über Bestimmung der durchschnittlichen Expression von zellspezifischen Markern. CM: Kardiomyozyten; Ery: Erythrozyten.**

| EpiSC                    |        | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | Dubletten (6) | 7    | 8    | 10   | 11   | 12   | Ery (13) | CM (14) |
|--------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|---------------|------|------|------|------|------|----------|---------|
| Kardiomyozyten<br>Marker | Mb     | 0,13 | 0,28 | 0,30 | 0,19 | 0,23 | 0,39 | 0,50          | 0,31 | 0,14 | 0,34 | 0,23 | 0,24 | 1,89     | 112,53  |
|                          | Myl3   | 0,12 | 0,24 | 0,23 | 0,20 | 0,19 | 0,30 | 0,38          | 0,29 | 0,12 | 0,35 | 0,21 | 0,24 | 1,20     | 107,50  |
|                          | Tnni3  | 0,13 | 0,25 | 0,25 | 0,21 | 0,22 | 0,30 | 0,39          | 0,34 | 0,18 | 0,40 | 0,20 | 0,25 | 1,37     | 109,91  |
|                          | Tnnt2  | 0,19 | 0,30 | 0,29 | 0,20 | 0,31 | 0,41 | 0,53          | 0,40 | 0,19 | 0,46 | 1,32 | 0,23 | 2,25     | 173,97  |
| Erythrozyten<br>Marker   | Alas2  | 0,11 | 0,06 | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,05 | 0,00          | 0,44 | 0,02 | 0,01 | 0,00 | 0,03 | 17,27    | 0,00    |
|                          | Gypa   | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 3,80     | 0,00    |
|                          | Hba-a1 | 0,72 | 3,70 | 1,12 | 0,32 | 1,68 | 4,23 | 1,91          | 0,45 | 0,24 | 0,31 | 0,61 | 0,37 | 2133,58  | 2,61    |
|                          | Hbb-bt | 0,14 | 1,01 | 0,13 | 0,09 | 0,22 | 1,06 | 0,26          | 0,15 | 0,09 | 0,11 | 0,17 | 0,08 | 705,09   | 0,24    |

**Ergänzende Tabelle 2: Nachweis von Kontamination innerhalb der identifizierten aCF-Cluster der Einzelzell-RNA-Sequenzierung über Bestimmung der durchschnittlichen Expression von zellspezifischen Markern. CM: Kardiomyozyten; EC: Endothelzellen; IC: Immunzellen, Ery: Erythrozyten, MC: Murale Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen).**

| aCF                      |        | 0    | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | Dubletten (7) | 8    | 9    | 10   | MC (11) | EC (12) | 13   | IC (14) | CM (15) | Ery (16) |
|--------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|---------------|------|------|------|---------|---------|------|---------|---------|----------|
| Kardiomyozyten<br>Marker | Mb     | 0,07 | 0,08 | 0,09 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06          | 0,07 | 0,05 | 0,07 | 0,16    | 0,10    | 0,05 | 0,22    | 32,82   | 0,03     |
|                          | Myl3   | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,03          | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,06    | 0,06    | 0,04 | 0,19    | 24,40   | 0,00     |
|                          | Tnni3  | 0,06 | 0,05 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,03          | 0,07 | 0,06 | 0,06 | 0,07    | 0,13    | 0,05 | 0,22    | 22,47   | 0,11     |
|                          | Tnnt2  | 0,12 | 0,18 | 0,12 | 0,08 | 0,10 | 0,19 | 0,11 | 0,08          | 0,15 | 0,09 | 0,11 | 0,30    | 0,19    | 0,51 | 0,38    | 38,26   | 0,00     |
| Erythrozyten<br>Marker   | Alas2  | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,23 | 0,00 | 0,04          | 0,00 | 0,03 | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 12,54    |
|                          | Gypa   | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,95     |
|                          | Hba-a1 | 0,03 | 0,30 | 0,37 | 0,45 | 0,35 | 0,42 | 0,06 | 1,60          | 0,05 | 1,89 | 0,07 | 0,05    | 0,03    | 0,08 | 0,31    | 0,01    | 1634,27  |
|                          | Hbb-bt | 0,01 | 0,13 | 0,16 | 0,06 | 0,03 | 0,06 | 0,02 | 0,06          | 0,02 | 0,68 | 0,01 | 0,00    | 0,01    | 0,01 | 0,01    | 0,01    | 572,19   |
| Murale Zell-<br>Marker   | Cspg4  | 0,03 | 0,13 | 0,10 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,06 | 0,02          | 0,07 | 0,05 | 0,12 | 0,89    | 0,03    | 0,11 | 0,01    | 0,03    | 0,00     |
|                          | Pdgfrb | 1,12 | 1,07 | 1,11 | 0,74 | 0,86 | 0,32 | 1,07 | 0,68          | 1,18 | 0,61 | 1,10 | 6,31    | 0,77    | 0,91 | 0,57    | 0,91    | 0,27     |
|                          | Mcam   | 0,06 | 0,09 | 0,13 | 0,02 | 0,01 | 0,02 | 0,10 | 0,03          | 0,07 | 0,02 | 0,13 | 1,73    | 0,44    | 0,03 | 0,01    | 0,02    | 0,00     |
|                          | Myh11  | 0,00 | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,01 | 0,03 | 0,01 | 0,00          | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,57    | 0,05    | 0,27 | 0,01    | 0,00    | 0,00     |
| Endothelzell<br>Marker   | Kdr    | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,40 | 0,02 | 0,03          | 0,02 | 0,09 | 0,01 | 0,01    | 1,96    | 0,03 | 0,09    | 0,03    | 0,00     |
|                          | Pecam1 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,11 | 0,13 | 0,03 | 0,02 | 0,03          | 0,04 | 0,04 | 0,05 | 0,02    | 2,73    | 0,40 | 0,07    | 0,03    | 0,00     |
|                          | Tek    | 0,28 | 0,25 | 0,15 | 0,52 | 0,39 | 0,13 | 0,17 | 0,09          | 0,29 | 0,13 | 0,33 | 0,02    | 0,76    | 0,05 | 0,08    | 0,07    | 0,00     |
|                          | Vwf    | 0,00 | 0,00 | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,01 | 0,00 | 0,01 | 0,03    | 0,59    | 0,00 | 0,09    | 0,01    | 0,00     |
| Immunzell<br>Marker      | Cd3d   | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,00 | 0,11    | 0,00    | 0,00     |
|                          | FCGR1  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,00 | 2,07    | 0,00    | 0,03     |
|                          | Itgam  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00    | 0,00    | 0,00 | 0,34    | 0,00    | 0,00     |
|                          | Ptprc  | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00          | 0,01 | 0,00 | 0,00 | 0,01    | 0,00    | 0,00 | 1,49    | 0,05    | 0,00     |

## 8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung der Dissertation stets unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schrader, welcher mir die Möglichkeit bot an einem spannenden Forschungsthema in einem tollem Arbeitsumfeld zu arbeiten. Vielen Dank für die vielen fachlichen Diskussionen und Anregungen, die inspirierende Atmosphäre und die zahlreichen Gelegenheiten, meine Daten auf internationalen Kongressen präsentieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller möchte ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Bedanken möchte ich mich zudem beim gesamten IRTG1902 für die Möglichkeit ein Teil dieses großartigen Austauschprogramms sein zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Prof. Dr. Axel Gödecke und Sandra Berger, die einen immer unterstützt haben und einige Möglichkeiten eröffnet haben.

Furthermore, I would like to thank Prof. Dr. Brant Isakson and the whole Lab for supporting me during my time abroad. You welcomed me with open arms and helped me to feel home in Charlottesville.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Karl Köhler aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum und seinen Mitarbeitern Tobias Lautwein und Patrick Petzsch, mit denen eine tolle und fruchttragende Kooperation während meiner Doktorarbeit zustande kam.

Danken möchte ich auch Katharina Raba aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika für die Hilfe bei der Durchführung der Zellsortierung.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die stets gute Zusammenarbeit und die tatkräftige Unterstützung bei praktischen und fachlichen Problemen. Besonders hervor heben möchte ich Christina Alter, ohne die ich wohl bis heute noch nichts von Kompensation am Durchflusszytometer verstehen würde sowie Julia Hesse, die mir bei Fragen rund um EpiSC stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Zhaoping Ding danke ich zudem für die Durchführung der Herzinfarkt-Operationen und Bodo Steckel möchte ich für seine großartige Hilfe bei den HPLC-Experimenten danken. Großer Dank gilt auch der Doktoranden-Runde bestehend aus Pascal Bouvain, Vera Flocke, Ria Zalfen und Tamara Straub. Besonderer Dank gilt dabei Vera, mit der ich schon zu Schulzeiten die Herausforderungen des Bio-Unterrichts meistern durfte sowie Pascal, ohne den meine Zeit im Institut nur halb so lustig geworden wäre.

Danken möchte ich auch den Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie für den fachlichen Austausch, das tolle Arbeitsklima und die Möglichkeit zur Mitbenutzung der Gerätschaften. Besonders bedanken möchte ich mich bei Lisa Kalhues, Rianne Nederlof und Vici Oenarto mit denen

des Öfteren das ein oder andere alkoholische Kaltgetränk nach einem erfolgreichen Arbeitstag verzehrt wurde.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihren Beistand in den guten und schweren Zeiten meiner Doktorarbeit bedanken. Danke Mama, Oma und Tante, dass ihr immer für mich da wart und mir stets Mut zugesprochen habt. Unter meinen Freunden möchte ich besonders Juliette, Asli, Alex, Bahu und Beate hervorheben, die während dieser Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich zum Lachen bringen konnten.

## 9 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Berücksichtigung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ verfasst wurde. Alle Zitate sind entsprechend § 6 Abs. 7 MAPO kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch an keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift, Christoph Owenier)