

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

Einfluss von extrazellulärem ATP und Adenosin auf die Proliferation, Migration
und Zytokinexpression epikardialer Progenitorzellen nach Myokardinfarkt

Dissertation

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

vorgelegt von

Elisabeth Sophia Marie Boden

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachter: PD Dr. Dr. med. André Heinen

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Julia Hesse, Stella Leberling, Elisabeth Boden, Daniela Friebe, Timo Schmidt, Zhaoping Ding, Peter Dieterich, Andreas Deussen, Claudia Roderigo, Christine R. Rose, Doreen M. Floss, Jürgen Scheller, Jürgen Schrader (2017).

CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction.

FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 31 (7), 3040–3053

Zusammenfassung

In Deutschland erleiden jährlich über 300.000 Menschen einen Myokardinfarkt (MI), der mit Fibrose und Narbenbildung einhergeht. Hieraus resultieren Folgeerkrankungen, wie Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen. Infarkt-bedingt kommt es zu einer Aktivierung von epikardialen Zellen, die eine sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition durchlaufen und dabei ein embryonales Programm rekapitulieren. Diese *epicardium-derived-cells* (EPDCs) bilden eine subepikardiale Zellschicht aus, wandern in das infarzierte Myokard ein und können als multipotente Progenitorzellen in Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und in geringen Umfang auch in Kardiomyozyten differenzieren. Gleichzeitig stellen EPDCs eine wichtige Quelle parakriner Faktoren, z.B. inflammatorischer Zytokine, dar, die die Gewebsumbildung und -heilung nach Infarkt regulieren. Wie die biologische Aktivität von EPDCs im Einzelnen kontrolliert wird und welche Rolle purinerge Signalmoleküle dabei spielen, ist bislang nicht erforscht. Nach MI kommt es Ischämie-bedingt zu einer vermehrten Freisetzung von ATP und Adenosin, die über spezifische Rezeptoren die Entzündungsreaktion und damit die Heilung des Herzens nach Infarkt beeinflussen können.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welchen Einfluss extrazelluläres ATP- und Adenosin auf die Proliferation, Migration und Expression von Zytokinen in kultivierten EPDCs haben. Zu diesem Zweck wurden EPDCs der Ratte 5 Tage nach MI (60 min Ischämie/Reperfusion) durch selektiven enzymatischen Verdau der Herzoberfläche gewonnen. Die Effekte von ATP-Rezeptor-Agonisten sowie von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Proliferation von EPDCs wurden mit Hilfe eines BrdU-Proliferations-Assays untersucht. Die Migration der EPDCs wurde mit einem Transwellmigrationsassay analysiert. Des Weiteren wurde die Expression der Zytokine IL-6, IL-11, sowie IL-12A in EPDCs mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht.

Nach der Aktivierung von ATP- und Adenosin-Rezeptoren mittels Agonisten waren weder die Proliferationsrate noch die Migrationsrate von EPDCs signifikant verändert. Auch zeigte sich keine chemotaktische Wirkung von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf EPDCs. Im Gegensatz dazu war ein deutlicher Einfluss von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Zytokin-Expression von EPDCs feststellbar. Eine Aktivierung von ATP-Rezeptoren mit dem ATP-Analog BzATP führte zu einer signifikanten Steigerung der IL-6-Expression. Auch ein Trend zu einer erhöhten IL-11-Expression war nach Aktivierung von ATP-Rezeptoren zu beobachten. Hingegen verminderte die Aktivierung von ATP-Rezeptoren die Expression von IL-12A. Hieran schien der ATP-Rezeptor P2Y2 beteiligt zu sein, denn auch seine selektive Aktivierung mittels 2-Thio-UTP führte zu einer Reduktion der IL-12A-Expression, wenn auch in einem etwas geringeren Ausmaß. Die Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A2B führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von IL-6 und IL-11, während die Aktivierung des Adenosin-Rezeptors A2A die Expression beider Zytokine unbeeinflusst ließ. Eine Aktivierung des Rezeptors A2B bewirkte darüber hinaus eine signifikante Hemmung der Expression von IL-12A, während auch hier eine Aktivierung des Rezeptors A2A keinen signifikanten Effekt zeigte.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Aktivierung von ATP- und Adenosin-Rezeptoren keinen Einfluss auf die Proliferation und die Migration von EPDCs hat. Vielmehr scheint die Aktivierung von ATP- und Adenosin-Rezeptoren die Expression parakriner Faktoren durch EPDCs zu modulieren, die an der Regulation der Inflammationsreaktion und des kardialen Heilungsprozesses beteiligt sind.

Summary

In Germany, every year more than 300,000 people have a myocardial infarction, which is associated with cardiac fibrosis and scarring. This leads to functional loss and secondary diseases such as heart failure and cardiac arrhythmias. Myocardial infarction activates epicardial cells to undergo a so-called epithelial-mesenchymal transition, thereby recapitulating an embryonic program. These epicardium-derived cells (EPDCs) are multipotent progenitor cells that form a subepicardial cell layer, migrate into the infarcted myocardium and can differentiate into fibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells, and to a small extent, into cardiomyocytes. Moreover, EPDCs are an important source of paracrine factors such as inflammatory cytokines that regulate tissue remodelling and healing after infarction. The regulation of the biological activity of EPDCs and the role of purinergic signaling herein has not been investigated yet. After myocardial infarction an ischemia-induced release of ATP and adenosine occurs, which via specific receptors may affect the inflammatory response and thus the healing of the infarcted heart.

The aim of this work was to investigate the effect of extracellular ATP and adenosine on proliferation, migration, and cytokine expression in cultured EPDCs. For this, EPDCs were isolated from rat hearts 5 days after infarction (60 min ischemia/reperfusion) by selective enzymatic digestion. The effects of ATP and adenosine receptor agonists on the proliferation of EPDCs was investigated using a BrdU proliferation assay. The migration of EPDCs was analyzed using a transwell migration assay. The expression of cytokines IL-6, IL-11, and IL-12A in EPDCs was investigated by quantitative Real-Time PCR.

Activation of ATP and adenosine receptors had no significant effect on proliferation and migration of cultured EPDCs. Neither did ATP and adenosine receptor agonists show chemotactic effects on EPDCs. In contrast, a profound effect of ATP and adenosine receptor agonists on cytokine expression was observed. Activation of ATP receptors with the ATP analog BzATP resulted in a significant increase in IL-6. Also, a trend for an increase of IL-11 expression was observed, while the expression of IL12A was significantly decreased after ATP receptor activation. Here the ATP receptor P2Y2 seemed to be involved, since a selective P2Y2 activation with 2-Thio-UTP also reduced the IL-12A expression, although to lesser extent. The activation of the adenosine receptor A2B significantly increased the expression of IL-6 and IL-11, whereas the activation of the adenosine receptor A2A did not alter their expression. Furthermore, A2B receptor activation resulted in a significant inhibition of IL-12A expression, while A2A receptor activation again showed no significant effect.

In summary, the results of the present work indicate, that activation of ATP and adenosine receptors does not affect proliferation and migration of EPDCs. However, activation of ATP and adenosine receptors seems to modulate the expression of paracrine factors by EPDCs, which are involved in the fine-tuning of the inflammatory response and the cardiac healing process.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	komplementäre DNA
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ECM	extrazellulärer Matrix
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EPDC	<i>epicardium-derived cell</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
Fn	Fibronectin
fw-Primer	<i>forward-Primer</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HI	Herzinsuffizienz
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
KHK	koronare Herzkrankheit
MI	Myokardinfarkt
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
PDGFR- α	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PE	Proepikardium
Raldh2	Retinaldehyd Dehydrogenase 2
rv-Primern	<i>reverse-Primer</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
S α A	sarcomeric α -actinin
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNC	Tenascin-C
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Myokardinfarkt	1
1.1.1	Kardiale Wundheilung	2
1.1.2	Regenerationsfähigkeit des Herzens	3
1.2	Das Epikard und epikardiale Zellen	5
1.2.1	Embryonale Entwicklung des Herzens und Rolle des Epikards	6
1.2.1.1	Das Proepikardium	6
1.2.1.2	EMT - Bildung von EPDCs	7
1.2.1.3	Differenzierung embryonaler EPDCs	9
1.2.2	Epikard im adulten Herzen	10
1.2.2.1	Bildung adulter EPDCs	11
1.2.2.2	Migration adulter EPDCs	11
1.2.2.3	Differenzierung adulter EPDCs	12
1.2.2.4	Sekretion parakriner Faktoren durch EPDCs	13
1.3	Tenascin-C	14
1.3.1	Struktur von TNC	15
1.3.2	TNC im Herzen	16
1.4	Purine und purinerge Signalwege	17
1.4.1	Freisetzung von Adenosin und ATP	18
1.4.2	Ektoenzyme – extrazellulärer Purinstoffwechsel	20
1.4.3	Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren)	20
1.4.3.1	A2A-Rezeptor Subtyp	21
1.4.3.2	A2B-Rezeptor Subtyp	22
1.4.4	ATP-Rezeptoren (P2-Rezeptoren)	23
1.4.4.1	P2Y-Rezeptoren	24
1.4.4.2	P2X-Rezeptoren	25
1.5	Adulte EPDCs und purinerge Signalwege	25
1.6	Ziele der Arbeit	26
2	Material	28
2.1	Geräte und Apparaturen	28
2.2	Verbrauchsmaterialien	28
2.3	Lösungen, Medium und Puffer	29
2.4	Rezeptor-Agonisten	30

2.5	Kits für Isolierung und Nachweis von RNA und DNA	30
2.6	Software	31
3	Methoden	32
3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	32
3.2	Kardiale I/R (Induktion eines künstlichen Herzinfarktes)	32
3.3	Präparation von EPDCs zur Kultivierung	32
3.4	Kultivierung von isolierten EPDCs	33
3.5	BrdU Cell Proliferation Assay	33
3.6	Migrationsassay	34
3.6.1	Coating der Membran	35
3.6.2	Durchführung des Migrationsassay	35
3.6.3	Fixierung der migrierten Zellen auf der Membran	36
3.6.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung	36
3.6.5	DAPI Färbung	37
3.6.6	Detektion und Quantifizierung der migrierten Zellen	37
3.7	Untersuchung der Genexpression von Zytokinen	37
3.7.1	Präparation von RNA	38
3.7.2	Messung der RNA im Spektralphotometer (Nanodrop)	39
3.7.3	Reverse Transkription	39
3.7.4	Quantitative Echtzeit-PCR	40
3.8	Statistik	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Proliferation von EPDCs	43
4.2	Migration von EPDCs	44
4.2.1	Einfluss unterschiedlicher coatings auf die Migration von EPDCs	44
4.2.2	Migration von EPDCs bei verschiedenen Inkubationszeiten und unterschiedlich konzentrierten EPDC-Suspensionen	47
4.2.3	Einfluss von purinergen Signalwegen auf die Migration von EPDCs	50
4.2.3.1	Effekt von ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs	50
4.2.3.2	Wirkung von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs	52
4.3	Einfluss von purinergen Signalwegen auf die Expression von Zytokinen in EPDCs	54
4.3.1	Effekte von ATP-Rezeptor-Agonisten auf die Expression von Zytokinen	55
4.3.2	Effekte von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Expression von Zytokinen	56
5	Diskussion	57
5.1	Einfluss von purinergen Signalen auf die Proliferation von EPDCs nach MI	58
5.1.1	Wirkung von ATP auf die Proliferation von EPDCs	58

5.1.2	Wirkung von Adenosin auf die Proliferation von EPDCs	59
5.2	Einfluss extrazellulärer Matrix auf die Migration von EPDCs.....	59
5.3	Einfluss von purinergen Signalen auf die Migration von EPDCs nach MI	61
5.3.1	Chemotaktische Wirkung von ATP auf EPDCs	61
5.3.2	Stimulation der Migration durch ATP.....	62
5.3.3	Chemotaktische Wirkung von Adenosin auf EPDCs.....	63
5.3.4	Stimulation der Migration durch Adenosin	63
5.4	Einfluss purinerner Signale auf die Zytokinexpression von EPDCs nach MI	64
5.4.1	Einfluss von ATP auf die Zytokinexpression von EPDCs.....	64
5.4.2	Einfluss von Adenosin auf die Zytokinexpression von EPDCs.....	65
5.5	Ausblick	68
6	Literatur	70
7	Danksagung.....	89

1 Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Laut WHO sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigste Todesursache weltweit und mit Abstand die häufigste Todesursache in einkommensstarken Ländern (World Health Organization 2017, 2019). Sie stellen daher einen immensen gesundheitlichen und wirtschaftlichen Belastungsfaktor dar (Benjamin et al. 2018). Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist in den USA mit 43,8% die häufigste Todesursache innerhalb der kardiovaskulären Erkrankungen, obwohl die Prävalenz der KHK in den letzten zehn Jahren zurückgegangen ist (Benjamin et al. 2018). Die KHK ist die häufigste Ursache des Myokardinfarkts (MI) und entsteht durch atherosklerotische Veränderungen der Koronargefäße (Smits und Riley 2014). Durch Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque kann es zur Anlagerung von Thromben bis hin zum vollständigen Gefäßverschluss, einem MI, kommen (Kelm und Strauer 2005). Die unterbrochene Durchblutung führt in dem betroffenen Areal zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff und dadurch zum Tod von Kardiomyozyten und Nekrose des betroffenen Herzmuskelgewebes (Klinke et al. 2010; Curley et al. 2018). Etwa 20 Minuten nach Verschluss einer Koronararterie kommt es zur Desintegration von Kardiomyozyten und zur Destabilisierung der Zellmembran mit Freisetzung von Zellbestandteilen und Markern wie Troponin (Klinke et al. 2010; Curley et al. 2018).

Der Myokardinfarkt kann aufgrund der guten medizinischen Versorgung und den technischen Fortschritten bei der Behandlung oft rechtzeitig und erfolgreich mittels perkutaner transluminaler Coronar-Angioplastie oder Thrombolysetherapie behandelt werden (Buchta et al. 2008). Dadurch ist zwar die Mortalitätsrate beim Myokardinfarkt gesunken (Go et al. 2013), dennoch liegt die Wahrscheinlichkeit, innerhalb von 5 Jahren nach dem ersten Myokardinfarkt zu versterben, bei 47 % für Frauen und bei 36% für Männer (Benjamin et al. 2018). Denn der massive Verlust von Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt führt aufgrund der limitierten Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen zu permanenten Schäden. Umbauprozesse des Herzmuskels mit Fibrose und Narbenbildung (Bergmann et al. 2009) können zu schweren Folgeerkrankungen, wie Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz (HI), führen (Pfeffer und Braunwald 1990). Besonders die HI geht mit einer eingeschränkten Lebenserwartung und einer hohen Mortalität einher (Ponikowski et al. 2016), da es trotz vieler Fortschritte nur limitierte Therapiemöglichkeiten ohne Heilungschancen gibt (Jameel und Zhang 2009). Das Risiko, nach einem Myokardinfarkt eine schwere Folgeerkrankung wie eine

HI zu entwickeln und daran zu versterben, steigt mit zunehmendem Alter an (Benjamin et al. 2018).

1.1.1 Kardiale Wundheilung

Die kardiale Wundheilung kann in vier Phasen unterteilt werden. Sie beginnt mit der ischämischen Phase (Phase 1), in der es zum Tod von Kardiomyozyten kommt. Es folgen die akute inflammatorische Phase (Phase 2) und die proliferative Phase (Phase 3) mit Bildung von Granulationsgewebe. Die letzte Phase (Phase 4) ist die Umbau- bzw. Reifungsphase mit Bildung einer stabilen Narbe (Cleutjens 1999; Kong et al. 2014).

Die Minderversorgung des Myokards mit Sauerstoff führt zeitnah zu einem massiven Zelltod durch Apoptose und Nekrose (Phase 1) (Cleutjens 1999; Teringova und Tousek 2017). Die Hypoxie bedingt einen Wechsel vom aeroben Stoffwechsel zum anaeroben Stoffwechsel in Kardiomyozyten (Curley et al. 2018). Der anaerobe Stoffwechsel lässt sich jedoch nur eine gewisse Zeit aufrechterhalten, da die anaerobe Glykolyse durch anfallende Stoffwechselprodukte (vor allem Laktat) bereits nach wenigen Minuten gehemmt wird (Rovetto et al. 1975). Es kommt zur Destabilisierung der Zellmembran, Desintegration der Zellen und schließlich zum Zelltod mit Freisetzung zellulärer Bestandteile sowie einem Anstieg kardialer Marker im Serum (Curley et al. 2018; Cleutjens 1999). Dadurch wird eine akute Inflammationsreaktion mit Ödembildung hervorgerufen (Phase 2) (Fishbein et al. 1978b): Immunzellen wandern in das Gewebe ein und phagozytieren apoptotische und nekrotische Zellen. Hierdurch kann es zu einem Ausdünnen der infarzierten Wand (Fishbein et al. 1978a) und Dilatation des Ventrikels, einer sog. Infarkt-Expansion, kommen (Hutchins und Bulkley 1978). Im Infarktareal besteht durch die ausgedünnte Ventrikelwand die Gefahr einer Aneurysma-Bildung (Braunwald 2013). Eine weitere Dehnung und Ruptur des Ventrikels wird durch die Bildung des Granulationsgewebes zwei bis drei Tage nach Infarkt verhindert (Phase 3) (Vracko et al. 1989; Cleutjens 1999). Es kommt zur Migration und Proliferation von Bindegewebszellen (Fibroblasten, Myofibroblasten), und es wird neue extrazelluläre Matrix (ECM) unter anderem aus Kollagen III, Fibronectin und Tenascin-C (TNC) gebildet (Cleutjens 1999; Fishbein et al. 1978b). Im Verlauf der Reifungsphase (Phase 4) wird das Granulationsgewebes aufgrund der limitierten Regenerationsfähigkeit von Kardiomyozyten nicht durch funktionelles Herzmuskelgewebe ersetzt (Prabhu und Frangogiannis 2016). Stattdessen entsteht eine permanente Narbe (Cleutjens 1999). Diese vermindert die Dehnbarkeit des Ventrikels, was Deformierungen (Parmley et al. 1973) und einer Ruptur der Ventrikelwand entgegenwirkt (Smits und Riley 2014). Gleichzeitig kommt es jedoch zu lokalen

Wandbewegungsstörungen, verminderter Kontraktilität (Tennant und Wiggers 1935) und einer reduzierten Relaxationsfähigkeit (Braunwald 2013). Insgesamt führt dies zu einer Verschlechterung der Pumpfunktion mit Ausbildung einer HI (Braunwald 2013).

Die komplexen kurz- und langfristigen Veränderungen des Myokards nach MI im infarzierten und nicht-infarzierten Bereich werden als „adverses Remodelling“ bezeichnet. Es kommt zu Veränderungen der Größe, Form und Funktion des Ventrikels, die mit einer erhöhten Mortalität, einem erhöhten Auftreten von Arrhythmien und HI einhergehen (Pfeffer und Braunwald 1990; Curley et al. 2018). Besonders die Infarktgröße, aber auch die Dauer und Lokalisation des Infarktes beeinflussen das ungünstige Remodelling (Pfeffer et al. 1991; Gaudron et al. 1993).

Der Prozess des Remodellings beginnt direkt nach Auftreten des MIs (Rossini et al. 2010) und unterliegt mechanischen, neurohormonellen, biochemischen und genetischen Faktoren (Sutton und Sharpe 2000). Besonders die Inflammation, die Sekretion extrazellulärer Matrix und die Fibroblastenproliferation haben einen Einfluss auf das Remodelling. So führt beispielsweise eine Verlängerung der notwendigen Inflammationsreaktion nach MI zu einem vermehrten adversen Remodelling (Prabhu und Frangogiannis 2016). Ebenso begünstigt die Bildung von extrazellulärer Matrix und die Proliferation von Fibroblasten einerseits die Entstehung einer Fibrose, andererseits sind diese Vorgänge nach MI für die Wundheilung essenziell (Shinde und Frangogiannis 2014; Vecchio et al. 2017). Diese ungünstigen zellulären und extrazellulären Umbauprozesse bleiben dabei nicht auf das geschädigte Areal beschränkt, sondern betreffen auch das intakte Herzmuskelgewebe (Gaudron et al. 1993; Sutton und Sharpe 2000).

Die Minimierung der Infarktgröße und der Infarktdauer durch eine rechtzeitige Reperfusionstherapie, eine Verbesserung der Wundheilung sowie eine Reduzierung der Wandspannung können das Remodelling und damit die Überlebenschance und Langzeitprognose nach MI positiv beeinflussen (Pfeffer und Braunwald 1990).

1.1.2 Regenerationsfähigkeit des Herzens

Anders als lange Zeit angenommen wurde, ist das Herz kein postmitotisches Organ (Bergmann et al. 2009; Lázár et al. 2017). Es ist in der Lage, neue Kardiomyozyten zu bilden, wobei die Rate der neugebildeten Kardiomyozyten von ca. 1% / Jahr im Alter von 20 Jahren auf ca. 0,3% / Jahr im Alter von 75 Jahren sinkt (Bergmann et al. 2009). Obwohl die Bildung neuer Kardiomyozyten nach MI zunimmt (Senyo et al. 2013), ist die Regenerationsfähigkeit des Herzens limitiert und reicht nicht aus, um den Verlust von bis zu einer Billion Kardiomyozyten nach einem MI zu ersetzen (Bergmann et al. 2009; Masters und Riley 2014).

Aufgrund der schweren Folgeerkrankungen nach MI und der hohen Mortalitätsrate ist die Verbesserung der kardialen Regenerationsfähigkeit wichtiger Bestandteil der aktuellen Forschung. Frühere Therapieansätze versuchten, Knochenmarksstammzellen für eine verbesserte kardiale Regeneration, durch Bildung neuer Kardiomyozyten, zu nutzen (Cahill et al. 2017). Transplantierte hämatopoetische Stammzellen zeigen jedoch keine Differenzierung in funktionelle Kardiomyozyten (Murry et al. 2004). Eine mögliche Verbesserung der kardialen Funktion nach Transplantation hämatopoetischer Zellen lässt sich daher vermutlich auf die Sekretion parakriner Faktoren der Zellen zurückführen (Smart et al. 2013; Cahill et al. 2017).

Die Entdeckung, dass sich Kardiomyozyten während des physiologischen Alterungsprozesses erneuern (Bergmann et al. 2009) führt zu der Fragestellung, wie sich Kardiomyozyten erneuern. Dies ist jedoch bislang nicht eindeutig geklärt. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass neue Kardiomyozyten aus bereits existierenden Kardiomyozyten durch De-Differenzierung und Zellteilung entstehen; zum anderen ist es möglich, dass sich neue Kardiomyozyten aus ansässigen Stammzellen oder Progenitorzellen bilden (Lázár et al. 2017; Cahill et al. 2017). Im Gegensatz zu einigen anderen Autoren stellen Senyo et al. (2013) weder unter physiologischen noch unter pathologischen Bedingungen einen relevanten Beitrag kardialer Progenitorzellen zur Bildung neuer Kardiomyozyten fest (Ellison et al. 2013; Beltrami et al. 2003; Hsieh et al. 2007). Senyo et al. (2013) kommen zu dem Schluss, dass neue Kardiomyozyten vor allem durch De-Differenzierung und Teilung bereits existierender Kardiomyozyten entstehen. Die Ergebnisse von Senyo et al. (2013) passen zu den Erkenntnissen beim Zebrafisch (Jopling et al. 2010; Kikuchi et al. 2010). Im Gegensatz zu Säugetieren weisen Zebrafische, eine robuste Herzregeneration auf (Porrello et al. 2011; Poss et al. 2002). Dabei erfolgt die Regeneration des Ventrikels überwiegend durch De-Differenzierungen und Proliferation von GATA4-positiven Kardiomyozyten (Jopling et al. 2010; Kikuchi et al. 2010).

Vergleichbar zur Regenerationsfähigkeit des Herzens beim Zebrafisch zeigt sich bei Säugetieren ein kurzes Zeitfenster mit einer ähnlichen Regenerationskapazität (Porrello et al. 2011). Porrello et al. (2011) zeigen, dass Mäuse in der ersten Woche postnatal nach partieller Resektion des Herzens eine nahezu komplette Regeneration aufweisen. Die dabei neu gebildeten Kardiomyozyten im regenerierten Gewebe entstehen vor allem durch die Proliferation bereits vorhandener Kardiomyozyten (Porrello et al. 2011). Einzelberichte legen nahe, dass es beim Menschen im Neugeborenenalter ebenfalls eine kurze Spanne mit ausgeprägter Regenerationsfähigkeit gibt (Haubner et al. 2016). Es liegen hierzu jedoch keine fundierten Studien vor, weshalb die Existenz eines regenerativen Fensters bei größeren Säugetieren und Menschen kritisch gesehen wird (Eschenhagen et al. 2017).

Neben der Neubildung von Kardiomyozyten wird bei der Herzregeneration des Zebrafisches eine Neovaskularisierung beobachtet. Hieran ist maßgeblich eine Subpopulation des Epikards beteiligt (Lepilina et al. 2006). Nach Resektion exprimiert das Epikard des Zebrafisches embryonale Marker und dehnt sich aus, um das Myokard erneut zu bedecken. Eine Subpopulation der Epikardzellen durchläuft eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die für die Bildung neuer Gefäße essenziell ist (Lepilina et al. 2006). Zusätzlich unterstützen epikardiale Zellen die Migration von Kardiomyozyten (Itou et al. 2012) und regulieren die dynamische Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, welche die Regeneration beim Zebrafisches unterstützt (Kikuchi 2014).

Für die kardiale Regeneration beim Menschen rückt das Epikard zunehmend in den Fokus (van Wijk et al. 2012). Das Epikard erfüllt bei Säugern und Vögeln in der embryonalen Entwicklung wichtige Funktionen: Es unterstützt die regelrechte Myokardentwicklung, es trägt zur Bildung glatter Muskelzellen, Fibroblasten, Kardiomyozyten und zur Bildung der Koronargefäße bei (Mikawa und Gourdie 1996; Dettman et al. 1998; Cai et al. 2008; Zhou et al. 2008). Nach MI zeigt sich sowohl beim Zebrafisch als auch bei Säugetieren eine Hochregulation embryonaler Gene auf Epikardzellen (Lepilina et al. 2006; van Wijk et al. 2012; Zhou et al. 2011). Die Aktivierung des Epikards nach MI stellt bei Säugern eine mögliche Quelle multipotenter Progenitorzellen dar, die einen Ansatz zur Verbesserung der kardialen Regeneration darstellen (Gittenberger-De Groot et al. 2010).

1.2 Das Epikard und epikardiale Zellen

Das Epikard ist das viszerale Blatt des Pericardium serosum und bildet mit dem parietalen Blatt des Pericardium serosum die Herzbeutelhöhle. In dem Spaltraum zwischen den beiden Blättern befindet sich perikardiale Flüssigkeit, die ein besseres Gleiten des Herzens im Herzbeutel ermöglicht (Aumüller und Wurzinger 2010). Das Epikard stellt die äußere Schicht der dreiteiligen Herzwand dar. Es bedeckt das mehrschichtige Myokard, das innen von einer weiteren Schicht, dem Endokard ausgekleidet wird. Epikard und Endokard bestehen jeweils aus einer Schicht epithelialer Zellen, die als Mesothel (Epikard) und Endothel (Endokard) bezeichnet werden. Beide Schichten sind jeweils über einen bindegewebigen Raum, dem subepi- und subendokardialen Raum, mit dem Myokard verbunden. Der subepikardiale Raum beherbergt wichtige nicht kardiale Bestandteile, wie Stammzellen für Koronar- und Lymphgefäße sowie neuronale Elemente (Munoz-Chapuli et al. 2002; Männer und Ruiz-Lozano 2007).

Die Rolle des Epikards wurde sowohl in der Kardiogenese als auch unter pathologischen Bedingungen lange Zeit unterschätzt. In der embryonalen Entwicklung des Herzens ist das Epikard essenziell für die regelrechte Entwicklung des Myokards (Munoz-Chapuli et al. 2002; Smits et al. 2018). Im adulten gesunden Herzen ist das Epikard nahezu ruhend, nach MI kommt es jedoch zu einer „Reaktivierung“ des Epikards (van Wijk et al. 2012; Bollini et al. 2014). Es kommt zu einer Proliferation der Epikardzellen, und fetale epikardiale Gene werden exprimiert, wie zum Beispiel Wilms-Tumor-Gen 1, T-Box-18 (Tbx18) und Retinaldehyd Dehydrogenase 2 (Raldh2) (Zhou et al. 2011; Masters und Riley 2014; van Wijk et al. 2012). Eine Subpopulation der Epikardzellen durchläuft analog zur Embryonalentwicklung eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT), also eine Umwandlung von epithelialen zu mesenchymalen Zellen (Zhou et al. 2011). Diese Zellen werden als vom Epikard-stammende Zellen (*epicardium-derived cells*, EPDCs) bezeichnet. EPDCs sind durch Differenzierung in verschiedene Zelltypen und durch die Sekretion parakriner Faktoren maßgeblich an der Regeneration des Myokards nach MI beteiligt (Zhou et al. 2011). In den folgenden Abschnitten wird die Rolle des Epikards in der embryonalen Entwicklung und die Funktion des Epikards im adulten Herzen nach MI genauer erläutert.

1.2.1 Embryonale Entwicklung des Herzens und Rolle des Epikards

In der embryonalen Entwicklung ist das Herz zunächst eine einfache tubuläre Struktur, die aus zwei Zelltypen besteht, dem primitiven Myokard und dem Endokard. Erst später entwickelt sich das Epikard (His 1885; Kurkiewicz 1909), das zur regelrechten Entwicklung des Myokards, der Klappen und des Erregungsleitungssystems notwendig ist. Neben parakrinen Faktoren des Epikards trägt die heterogene Zellpopulation des Epikards wesentlich zur Bildung des Bindegewebes und der Gefäße einschließlich der Koronargefäße bei (Munoz-Chapuli et al. 2002; Männer und Ruiz-Lozano 2007; Smits et al. 2018).

1.2.1.1 Das Proepikardium

Das Epikard bildet sich aus einem paarig angelegten Zellcluster (Muñoz-Chápuli et al. 1997), dem Proepikardium (PE) (Virágh et al. 1993). Dieses blumenkohlartige Gewebe entsteht an der perikardialen Wand des Septum transversum nahe dem Sinus venosus (Ho und Shimada 1978; Virágh und Challice 1981; Komiyama et al. 1987) an der Basis des venösen Pols des sich entwickelnden Herzens (Männer 1992). Das PE besteht zunächst aus mesothelialen Zellvorsprüngen rundlicher Zellen, die im Verlauf abflachen. Die Zellen bedecken die

entstehenden fingerförmigen Ausstülpungen aus extrazellulärer Matrix, in der sich Mesenchymzellen befinden (Männer et al. 2001; Munoz-Chapuli et al. 2002; Viragh und Challice 1981). Die proepikardialen Vorsprünge weisen eine hohe Teilungsrate auf (Kuhn und Liebherr 1988). Im Mausembryo entwickeln sich die PE-Anlagen symmetrisch auf beiden Seiten am Tag 8.5 post coitum (Sylva et al. 2014). Die beiden Anlagen wachsen beidseits symmetrisch auf die embryonale Mittellinie zu, wo sie sich zu einem einzigen PE am Tag 9.25 vereinigen (Männer und Ruiz-Lozano 2007; Munoz-Chapuli et al. 2002; Sylva et al. 2014). Je nach Spezies dominiert ein Übertragungsweg der proepikardialen Zellen auf das Myokard (Männer und Ruiz-Lozano 2007), dazu gehören:

- die Bildung einer sekundären Gewebsbrücke zur dorsalen Ventrikelwand bei Vögeln (Männer 1992; Vrancken Peeters et al. 1995),
- die Freisetzung vesikulärer oder solider Zellansammlungen des PE in die Perikardhöhle (*floating*) bei Fischen und einigen Säugetieren (Kuhn und Liebherr 1988; Muñoz-Chápuli et al. 1997; Komiyama et al. 1987),
- und die weniger relevante kontinuierliche Zellmigration entlang des Sinus venosus (Männer 1993).

Damit die proepikardialen Zellen am Myokard haften und sich als Epikardschicht ausbreiten, ist die Interaktion des vaskulären Adhäsionsmoleküls-1 (*vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1) der myokardialen Zellen und dem $\alpha 4\beta 1$ -Integrin der epikardialen Zellen essenziell. (Pérez-Pomares und La Pompa 2011). Wird die Expression von VCAM-1 oder $\alpha 4\beta 1$ -Integrin unterdrückt, verhindert dies die regelrechte Ausbildung des Epikards und führt zu einer unzureichenden Myokardentwicklung (Kwee et al. 1995; Sengbusch et al. 2002).

1.2.1.2 EMT - Bildung von EPDCs

Am Tag 11.5 - 12.5 post coitum bei Mäusen bedeckt das Epikard vollständig das Myokard (Smits et al. 2018) und es entsteht ein subepikardialer Raum mit ungeordneter extrazellulärer Matrix zwischen der epithelialen Zellschicht und dem Myokard. Dieser subepikardiale Raum weitet sich, und es kommt zu einer vermehrten Kollagenproduktion (Viragh und Challice 1981) sowie zu einer lokalen Transformation epikardialer Mesothelzellen in Mesenchymzellen (Pérez-Pomares et al. 1997; Perez-Pomares et al. 1998). Aus epikardialen Zellen, die eine EMT durchlaufen, entstehen EPDCs, die in den subepikardialen Raum eindringen (Gittenberger-de Groot et al. 1998). Ob prinzipiell alle Zellen des Epikards die Fähigkeit zur EMT besitzen oder

lediglich eine Subpopulation ist bislang unklar. Da das Epikard eine heterogene Zellpopulation darstellt, wird vermutet, dass lediglich eine Subpopulation zur EMT fähig ist (Pérez-Pomares und La Pompa 2011; Katz et al. 2012; Gittenberger-de Groot et al. 2012).

In der heterogenen Zellpopulation des Epikards exprimieren die Zellen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren. Besonders stark werden die Transkriptionsfaktoren WT1 und Tbx18 exprimiert (Pérez-Pomares et al. 2002; Cai et al. 2008). In einigen Zellen werden die Transkriptionsfaktoren Scleraxis und Semaphorin3D exprimiert, wobei deren Expression nur zum Teil mit der Expression von WT1 und Tbx18 übereinstimmt (Katz et al. 2012). Zudem sind im Epikard GATA5-exprimierende Zellen (MacNeill et al. 2000) sowie CD45-positive hämatopoetische Zellen zu finden (Balmer et al. 2014).

Die Steuerung der EMT erfolgt über verschiedene Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Botenstoffe und Adhäsionsmoleküle. Myokard und Epikard beeinflussen die EMT, indem sie Wachstumsfaktoren, wie *transforming growth factor beta* (TGF- β), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) und *bone morphogenetic protein* freisetzen (Wessels und Pérez-Pomares 2004; Perez-Pomares et al. 1998). Unter den verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die an der Steuerung der EMT beteiligt sind, ist der Transkriptionsfaktor WT1 besonders wichtig. Ein Verlust von WT1 führt zu schweren Defekten im Epikard und einem Ausbleiben der EMT. Es werden keine EPDCs gebildet, und es kommt zu einer fehlerhaften Bildung der Koronargefäße, einer eingeschränkten Myokardentwicklung und schließlich zum Tod des Embryos (Moore et al. 1999; Martínez-Estrada et al. 2010; Gise et al. 2011).

Über welchen Mechanismus WT1 die EMT reguliert, wird kontrovers diskutiert (Pérez-Pomares und La Pompa 2011). Eine WT1-regulierte Snail1-Expression, die indirekt die Expression von E-Cadherine reguliert (Martínez-Estrada et al. 2010), konnten Gise et al. (2011) nicht bestätigen. Stattdessen fanden Gise et al. (2011), dass durch WT1 der epikardiale Wnt/ β -catenin Signalweg stimuliert wird, der für die epikardiale EMT notwendig ist. Des Weiteren reguliert WT1 die epikardiale Expression der Raldh2 (Guadix et al. 2011). Der Verlust von Raldh2 führt zu ähnlichen Fehlern im kardialen Wachstum und in der Entwicklung von Koronargefäßen wie der Verlust von WT1 (Gise et al. 2011). Die Raldh2 katalysiert die Bildung von Retinsäure, einem Botenstoff, der für die kardiale Entwicklung essenziell ist (Gise et al. 2011). Ein weiterer wichtiger Transkriptionsfaktor ist der transcription factor 21 (Tcf21), bei dessen Verlust die Migration von Epikardzellen durch eine defekte EMT ausbleibt (Acharya et al. 2012).

1.2.1.3 Differenzierung embryonaler EPDCs

Die durch EMT gebildeten EPDCs wandern teilweise in das sich entwickelnde Myokard ein und tragen zur Bildung verschiedener Zellpopulationen bei (Dettman et al. 1998). Dabei gilt die Differenzierung von EPDCs in interstitielle Fibroblasten, adventitielle Fibroblasten und glatte Muskelzellen der Koronargefäße als wahrscheinlich (Mikawa und Gourdie 1996; Dettman et al. 1998; Gittenberger-de Groot et al. 1998; Wessels und Pérez-Pomares 2004; Smith et al. 2011). Eine Differenzierung in Endothelzellen und Kardiomyozyten wird hingegen kontrovers diskutiert (Tian et al. 2015). Nachfolgend wird der aktuelle Forschungsstand zur Differenzierung von EPDCs in Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten kurz beschrieben.

Verschiedene Lineage tracing-Studien unterstützen den Beitrag von EPDCs zur Population von Fibroblasten und glatten Muskelzellen im sich entwickelnden Herzen (Tian et al. 2015). Unter anderem differenzieren sich WT1-positive und Tbx18-positive EPDCs in Fibroblasten und glatte Muskelzellen (Wessels et al. 2012; Zhou et al. 2008; Cai et al. 2008). Des Weiteren spielt der Transkriptionsfaktor Tcf21, der durch Retinsäure reguliert wird, bei der Bildung kardialer Fibroblasten eine wichtige Rolle (Braitsch et al. 2012). Eine Subpopulation von Epikardzellen exprimiert Tcf21. Dieser Faktor scheint für die EMT epikardialer Zellen, welche die Zelllinie der kardialen Fibroblasten einschlagen, essenziell zu sein (Acharya et al. 2012). Ein Mangel an Tcf21 bewirkt eine verminderte Bildung von kardialen Fibroblasten und es kommt zu einer verstärkten Bildung glatter Muskelzellen (Braitsch et al. 2012).

Neben Tcf21 wirkt sich die Signalvermittlung des *platelet-derived growthfactor receptor alpha* (PDGFR- α) auf die Bildung von Fibroblasten aus. Der Verlust von PDGFR- α führt zu einer Unterbrechung in der Entwicklung kardialer Fibroblasten, während die Entwicklung koronarer glatter Muskelzellen unbeeinträchtigt bleibt (Smith et al. 2011).

Während der Beitrag von EPDCs zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen in vielen Studien gezeigt werden konnte (Mikawa und Gourdie 1996; Dettman et al. 1998; Gittenberger-de Groot et al. 1998; Zhou et al. 2008), wird die Differenzierung von EPDCs in Endothelzellen kontrovers diskutiert. Bei Küken zeigen verschiedene Studien, dass EPDCs zur Population der Endothelzellen beitragen (Mikawa und Gourdie 1996; Männer 1999). Diese Versuche werden jedoch kritisch diskutiert, da die Untersuchungen keine quantitative Aussage über den Beitrag von (pro-) epikardialen Zellen zu vaskulären Endothelzellen machen (Tian et al. 2015). Bei Mäusen kann mittels WT1-basierten Lineage tracing-Studien hingegen nur ein geringer Beitrag

von EPDCs zu Endothelzellen ausgemacht werden (Zhou et al. 2008; Grieskamp et al. 2011). Die Aussagekraft der WT1-basierten Lineage tracing-Studien ist ebenfalls limitiert, da WT1 nicht nur in embryonalen epikardialen Zellen exprimiert wird, sondern auch auf den kardialen Endothelzellen während der Kardiogenese (Duim et al. 2015). Ein Beitrag von EPDCs zu Endothelzellen kann daher nicht sicher bestätigt werden (Rudat und Kispert 2012).

Die Differenzierung von EPDCs in Kardiomyozyten wird kontrovers diskutiert. Tbx18-basierte Lineage tracing- Studien zeigen, dass EPDCs in das Myokard einwandern und dort zu Bildung von Kardiomyozyten beitragen (Cai et al. 2008). Diese Ergebnisse werden durch WT1-basierte Lineage tracing-Studien unterstützt. WT1-positive Epikardzellen, die von *Homeobox protein* (Nkx2.5) und *Insulin gene enhancer protein* (Isl-1) - exprimierenden Progenitorzellen abstammen, scheinen 7-10% der Kardiomyozyten im Ventrikel und 18% der Kardiomyozyten in den Vorhöfen zu bilden (Zhou et al. 2008).

Ein Problem der WT1-basierten Lineage tracing-Studien und Tbx18-basierten Lineage tracing-Studie ist jedoch, dass diese Marker nicht nur exklusiv im Epikard exprimiert werden; stattdessen sind sie zum Teil in Progenitorzellen des Myokards (im sekundären Herzfeld) und zu einem gewissen Grad im Myokard selbst zu finden (Christoffels et al. 2009). Daher scheinen Tbx18- und WT1-basierte Lineage tracing-Studien nur bedingt geeignet zu sein, um das „Schicksal“ von epikardialen Zellen zu verfolgen (Pérez-Pomares und La Pompa 2011; Rudat und Kispert 2012).

1.2.2 Epikard im adulten Herzen

Im gesunden adulten Herzen befindet sich das einschichtige Epikard nahezu in einem ruhenden Zustand (Smart et al. 2011). Bei Schädigung des Myokards durch Ischämie kommt es zu einer „Reaktivierung“ des Epikards mit gesteigerter Proliferation (Braitsch et al. 2013; van Wijk et al. 2012; Zhou et al. 2011). Das embryonale Programm des Epikards wird teilweise aktiviert, bestimmte embryonale Gene werden verstärkt exprimiert, und EPDCs werden erneut gebildet (Zhou et al. 2011; van Wijk et al. 2012; Duan et al. 2012). Diese adulten EPDCs können in verschiedene Zelltypen differenzieren und stellen damit eine wichtige Quelle ortsansässiger Progenitorzellen dar (Bollini et al. 2014).

Im Folgenden werden die Aktivierung des Epikards, die Migration von EPDCs und die Differenzierungsmöglichkeiten von EPDCs genauer erläutert.

1.2.2.1 Bildung adulter EPDCs

Nach ischämischer Schädigung kommt es zu einer vorübergehenden Reaktivierung des sonst ruhenden adulten Epikards. Durch Proliferation der Epikardzellen verdickt sich das Epikard über dem gesamten Herzen, wobei die Infarktregion besonders betroffen ist (van Wijk et al. 2012; Zhou et al. 2011). Die Expansion des Epikards erreicht zusammen mit der Expression embryonaler Gene (wie WT1, Tbx18, Raldh2, Tcf21) nach etwa fünf bis sieben Tagen ihr Maximum (Duan et al. 2012; Smart et al. 2011; van Wijk et al. 2012; Braitsch und Yutzey 2013) und innerhalb eines Monats verschwinden die embryonalen Marker wieder nahezu vollständig (Zhou et al. 2011). Insgesamt ist die Expression embryonaler Marker nach MI deutlich geringer als während der Embryonalentwicklung (van Wijk et al. 2012). Neben der Proliferation der Epikardzellen und Expression embryonaler Marker weitet sich der subepikardiale Raum, und es reichert sich dort extrazelluläre Matrix an (Braitsch et al. 2013). Der subepikardiale Raum wird mit mesenchymalen Zellen besiedelt, die durch EMT aus Epikardzellen hervorgehen und die als adulte EPDCs bezeichnet werden (van Wijk et al. 2012). Wie in der Kardiogenese wird die EMT im adulten Epikard unter anderem WT1-abhängig über den Wnt1/ β -catenin Signalweg reguliert und eingeleitet (Duan et al. 2012). Dabei kommt es vermutlich durch reaktive Sauerstoffspezies zu einer Hochregulation der Wnt-Expression im Epikard und in den Fibroblasten der Infarktregion (Duan et al. 2012). Zusätzlich kommt es zu einer Hypoxie-bedingten Hochregulation von HIF-1a, wodurch vermehrt proangiogene Faktoren gebildet werden, welche die EMT epikardialer Zellen unterstützen (Blom und Feng 2018). Die durch EMT gebildeten adulten EPDCs sind eine heterogene Zellgruppe, die kardiale Progenitor- und mesenchymale Stammzell-Marker (ckit, Sca-1, CD44, CD90) exprimieren (Limana et al. 2010; Bollini et al. 2014). Trotz der Aktivierung eines embryonalen Programms erreichen adulte EPDCs keinen vollständigen embryonalen Phänotyp (Bollini et al. 2014), und es wird kein kardiogenes Programm mit ausreichender kardialer Regeneration initiiert (Smart et al. 2011).

1.2.2.2 Migration adulter EPDCs

Die Migration adulter EPDCs ins Myokard wird kontrovers diskutiert. So können beispielsweise Zhou et al. (2011) mit einer WT1-basierten Lineage tracing-Studie keine Migration adulter EPDCs in das Myokard detektieren. Weitere Studien können die Migration adulter EPDCs ebenfalls nicht sicher beweisen (Gise und Pu 2012; Duan et al. 2012; Zangi et al. 2013).

In einer anderen WT1-basierten Lineage tracing-Studie hingegen kann nach Infarkt die Migration fluoreszenzmarkierte Zellen des Epikards in das darunter liegende Myokard beobachtet werden (Smart et al. 2011). Andere Methoden, wie die lentivirale Fluoreszenz-Markierung epikardialer Zellen, zeigen ebenfalls, dass nach MI gebildete EPDCs in die Grenzzone des Infarkts einwandern (Gittenberger-De Groot et al. 2010; Limana et al. 2007). Das methodische Vorgehen dieser Untersuchungen wird jedoch kritisch gesehen (Gise und Pu 2012). Zangi et al. (2013) konnten erst durch Behandlung des Epikards mit modifizierter RNA des VEGF-A eine Mobilisierung und Migration von EPDCs ins Myokard beobachten.

Insgesamt scheint eine geringe Migration epikardialer Zellen ins Myokard als Bestandteil der "Reaktivierung" des Epikards im adulten Herzen nach einem MI wahrscheinlich zu sein (Smits et al. 2018). Die widersprüchlichen Ergebnisse zur Migration adulter EPDCs lassen sich zum Teil methodisch erklären (Smits et al. 2018).

1.2.2.3 Differenzierung adulter EPDCs

Vergleichbar zur Embryonalentwicklung tragen adulte EPDCs durch Differenzierung zur Bildung verschiedener Zelltypen bei. Eine Vielzahl von Studien zeigt, dass adulte EPDCs sich nach MI in Fibroblasten, Myofibroblasten und glatte Muskelzellen differenzieren (Zhou et al. 2011; van Wijk et al. 2012; Duan et al. 2012).

Der Beitrag von adulten EPDCs zu neuen Kardiomyozyten ist bislang nicht eindeutig geklärt. Einige Studien geben Hinweise darauf, dass EPDCs neben Fibroblasten und glatte Muskelzellen auch Endothelzellen und später Kardiomyozyten bilden (van Wijk et al. 2012; Limana et al. 2007; Smart et al. 2011; Zangi et al. 2013). Eine WT1-basierte Lineage tracing-Studie zeigt, dass markierte WT1-positive Zellen des Epikards frühe Kardiomyozyten-Marker, wie Isl-1 und das Nkx2.5, exprimieren und ins Myokard einwandern (Smart et al. 2011). Die Zellen zeigen eine Koexpression von *sarcomeric α -actinin* (SaA) und kardialem Troponin und ähneln morphologisch reifen Kardiomyozyten (Smart et al. 2011). Eine weitere WT1-basierte Lineage tracing-Studie suggeriert ebenfalls, dass nach MI in der Infarktzone gebildete Kardiomyozyten von Epikardzellen abstammen; dabei wird ein anderer Ursprung der Kardiomyozyten in der Studie jedoch nicht ausgeschlossen (van Wijk et al. 2012).

Im Gegensatz dazu konnten andere WT1-basierte *Lineage tracing*-Studien keine Differenzierung von EPDCs in Kardiomyozyten oder Endothelzellen feststellen (Zhou et al. 2011; Gise und Pu 2012). Des Weiteren kann eine Co-Expression der kardialen Markergene

troponin T2, cardiac type (TNNT2) und actinin alpha 2 (ACTN2) nicht beobachtet werden, weshalb Zhou et al. (2011) einen Beitrag von EPDCs zu neuen Kardiomyozyten für unwahrscheinlich halten.

Die verschiedenen Ergebnisse zur Differenzierung der EPDCs lassen sich durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erklären. So kann bei *Lineage tracing*-Studien mit konstitutiv genetisch markiertem WT1 (WT1Cre) die Detektion von WT1-positiven Kardiomyozyten keine genaue Aussage über die Herkunft dieser Zellen liefern (van Wijk et al. 2012). Neben einer Abstammung von WT1-positiven Epikardzellen ist ein Ursprung aus WT1-positiven Stammzellen, die schon früh WT1 exprimieren und im Herzen verbleiben, möglich. Des Weiteren können WT1-positive Kardiomyozyten aus einer Fusion von bereits existierenden Kardiomyozyten mit WT1-positiven Mesenchymzellen entstehen (van Wijk et al. 2012). Die Methode der lentiviralen Markierung, die eine Bildung von Kardiomyozyten aus Epikardzellen nachweist (Limana et al. 2010), wird kritisiert, da hierbei eine ungewollte Markierung von Kardiomyozyten nicht ausgeschlossen wurde (Gise und Pu 2012).

Die Studienlage zur Differenzierung von adulten EPDCs in Kardiomyozyten ist nicht eindeutig. Die Fähigkeit adulter EPDCs in Kardiomyozyten zu differenzieren, scheint für die Bildung neuer Kardiomyozyten nicht relevant zu sein (Smits et al. 2018). Die Bildung neuer Kardiomyozyten reicht nicht aus, um die untergegangenen Kardiomyozyten zu ersetzen (Smart et al. 2011; Zangi et al. 2013).

Die Differenzierung von EPDCs in Endothelzellen ist ebenfalls nicht abschließend geklärt. Es konnten einerseits WT1-positive Zellen, die ebenfalls CD31 exprimieren, als Endothelzellen identifiziert werden (van Wijk et al. 2012). Andererseits ist der Ursprung WT1-exprimierender CD31-positiver Zellen nicht eindeutig, da es nach MI auf CD31-positiven Endothelzellen zu einer Re-Expression von WT1 kommen kann. Eine Differenzierung von WT1-positiven Epikardzellen in Endothelzellen bleibt im erwachsenen Herzen daher fraglich (Duim et al. 2015).

1.2.2.4 Sekretion parakriner Faktoren durch EPDCs

Neben der Differenzierung von EPDCs in verschiedenen Zelltypen hat die Sekretion parakriner Faktoren durch EPDCs nach MI einen großen Einfluss auf die kardiale Wundheilung und Regeneration (Zhou et al. 2011). EPDCs sezernieren eine Vielzahl von pro-angiogenen Faktoren, wie VEGF-A, FGF2, PDGF und Interleukin (IL)-6. Dabei scheinen vor allem FGF2

und VEGF-A zusammen mit weiteren Faktoren das Wachstum von Endothelzellen zu stimulieren und das Überleben und Wachsen von Koronargefäßen nach MI zu verbessern (Zhou et al. 2011). Die frühe Gabe von EPDC-konditioniertem Medium bei MI reduziert signifikant die Infarktgröße und verbessert die Herzfunktion. Eine späte Gabe des EPDC-konditioniertem Medium (9 Tage nach MI) reduziert zwar ebenfalls das „adverse Remodelling“, sie führt aber nicht zu einer Verbesserung der kardialen Funktion (Zhou et al. 2011).

Das Zytokin IL-6 besitzt neben pro-angiogenen Eigenschaften vor allem pro-inflammatorische Funktionen (Fontes et al. 2015; Feng et al. 2022). Dadurch trägt IL-6 nach MI zu einer anhaltenden Inflammation und Entstehung einer myokardialen Fibrose bei (Feng et al. 2022). Zwar werden auch anti-inflammatorische Effekte des pleiotroben Zytokins beobachtet (Frangogiannis 2014), die pro-inflammatorische Wirkung nach MI scheint jedoch zu überwiegen (Libby 2021). Weitere Mitglieder der IL-6-Zytokin-Familie, wie IL-11 und IL-12, spielen bei der Heilung nach MI ebenfalls eine wichtige Rolle. IL-11 besitzt neben pro-inflammatorischen Effekten durch Steigerung der Myofibroblastenproliferation und ECM-Produktion eine starke pro-fibrotische Wirkung und begünstigt die Entstehung einer Fibrose (Schafer et al. 2017; Corden et al. 2020). Eine Unterdrückung des pro-inflammatorischen IL-12 mittels genetischen Knockout geht mit einer reduzierten kardialen Schädigung nach MI einher (Kan et al. 2016).

In *vitro* verbessert die Co-Kultivierung von Kardiomyozyten mit EPDCs die Proliferation und Zellreifung der Kardiomyozyten (Weeke-Klimp et al. 2010). Außerdem steigern transplantierte EPDCs die kardiale Funktion des ischämischen Myokards und verhindern ein adverses Remodelling (Winter et al. 2007). Neben pro-angiogenen Faktoren sezernieren EPDCs das pro-fibrotische Protein TNC (Hesse et al. 2017). EPDCs sind daher vermutlich an der Inflammationsreaktion, der Bildung von Granulationsgewebe und der Neovaskularisierung nach Infarkt beteiligt (Frangogiannis 2008; Zhou et al. 2011; Hesse et al. 2017). Insgesamt scheinen EPDCs durch die Sekretion parakriner Faktoren einen wichtigen Beitrag zur kardialen Wundheilung nach MI zu leisten (Zhou et al. 2011).

1.3 Tenascin-C

TNC gehört zu den matrizellulären Proteinen, die wichtige Komponenten der extrazellulären Matrix darstellen (Sage und Bornstein 1991; Bornstein 1995). Zusammen mit weiteren Komponenten der ECM, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen, steuern matrizelluläre Proteine zelluläre Funktionen (Bornstein und Sage 2002). Unter anderem

regulieren sie die Beweglichkeit, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen (Bornstein und Sage 2002). Im Gegensatz zu vielen Matrixproteinen weisen die makromolekularen Glykoproteine Thrombospondin-1, *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC) und TNC, eine de-adhäsive Funktion auf (Murphy-Ullrich 2001). Die dynamische Expression matrizellulärer Proteine spielt in der Embryonalentwicklung (Sage und Bornstein 1991) sowie nach Gewebeschädigung und in der Onkogenese eine Rolle (Bornstein und Sage 2002).

In der Embryonalentwicklung ist die dynamische TNC-Expression vor allem an Orten der EMT (Ekblom und Aufderheide 1989) sowie bei starker Migration und Proliferation sehr hoch (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012; Huang et al. 2001). Im adulten Gewebe verschwindet TNC nahezu komplett. Es wird jedoch bei Gewebeschädigung, Wundheilung und Onkogenese erneut exprimiert (Huang et al. 2001; Jones und Jones 2000). Die Bildung wird unter anderem durch mechanischen Stress und durch verschiedene Wachstumsfaktoren, wie PDGF, FGF2 und TGF- β , stimuliert. Im adulten Gewebe ist TNC an der Modulation der Zellmigration und Proliferation beteiligt, wobei es je nach Kontext und Zelltyp eine unterschiedliche Wirkung entfaltet. So scheint TNC beispielsweise bei Immunzellen die Migration von Lymphozyten *in vitro* zu unterstützen, während die Migration von Monozyten gehemmt wird. Ebenso zeigt TNC einen fördernden Effekt auf die Migration von Fibroblasten, wohingegen es einen hemmenden Effekt auf ihre Proliferation ausübt (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012). Tenascin-C stimuliert die Proliferation von Endothelzellen und glatten Muskelzellen, indem es Wachstumsfaktor-abhängige Reaktionen unterstützt (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012).

1.3.1 Struktur von TNC

TNC ist ein oligomeres Glykoprotein, das sechs Polypeptide mit einem Molekulargewicht zwischen 180-300 kDa beinhaltet (Jones und Jones 2000). Dabei besteht ein Polypeptid jeweils am N-Terminus aus Heptad-Wiederholungen, gefolgt von *EGF-like* Wiederholungen und verschiedenen Fibronectin-III-Wiederholungen sowie einer rundlichen *Fibrinogen-like* Region am C-Terminus (Sage und Bornstein 1991; Jones und Jones 2000). Die Cysteinreste am N-Terminus der Polypeptide lagern sich zusammen (Jones und Jones 2000), wodurch eine sechsarmige Struktur entsteht (Ekblom und Aufderheide 1989).

1.3.2 TNC im Herzen

Bei der Kardiogenese steht die Expression von TNC im räumlich-zeitlichen Zusammenhang mit der Migration von Zellen und der EMT von Zellen (Imanaka-Yoshida et al. 2003; Imanaka-Yoshida 2012). Tenascin-C wird unter anderem im proepikardialen Organ, einer blumenkohlartigen Vorstülpung des Septum Transversum, exprimiert, aus dem sich später das Epikard bildet. Des Weiteren tritt TNC bei der Bildung der Koronargefäße auf, und es scheint bei der Differenzierung von Kardiomyozyten eine Rolle zu spielen (Imanaka-Yoshida 2012). Obwohl TNC an der Entwicklung des Herzens beteiligt ist, führt ein Knockout von TNC nicht zu einer abnormalen Herzentwicklung (Imanaka-Yoshida et al. 2003; Nikolaos G. Frangiogiannis 2012).

Nach MI kommt es bei Säugern im Herzen zu dynamischen Veränderungen der extrazellulären Matrix, wie der Hochregulation von matrizellulären Proteinen (z.B. TNC), die sonst im gesunden adulten Herzen nicht präsent sind (Prabhu und Frangiogiannis 2016). Die Zusammensetzung der ECM nach Herzinfarkt ist für den Heilungsprozess enorm wichtig (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012). Die ECM dient dabei als Gerüst für migrierende und proliferierende Zellen und ist für die Bildung des Granulationsgewebes wichtig (Willems et al. 1996; Cleutjens 1999). Durch die dynamischen Veränderungen in der extrazellulären Matrix werden die zelluläre Aktivität und der Phänotyp der Zellen gesteuert (Prabhu und Frangiogiannis 2016; Nikolaos G. Frangiogiannis 2012).

Das matrizelluläre Protein TNC wird nach MI während der Inflammationsreaktion und der Bildung des Granulationsgewebes exprimiert (Imanaka-Yoshida 2012). Zunächst kann TNC in der Grenzzone nachgewiesen werden. Zwei bis drei Wochen später ist es in der Infarktzone zu finden, wo es überlebende Kardiomyozyten umgibt (Willems et al. 1996). Die Hauptquelle für TNC sind interstitielle Fibroblasten (Imanaka-Yoshida et al. 2001). Zusätzlich wird TNC von EPDCs an der Herzoberfläche gebildet und Ausläufer von TNC sind bis ins Myokard in der Grenzzone zum Infarktgebiet zu finden (Ding et al. 2018). Über autokrine und parakrine Mechanismen unterstützt TNC die Migration der Fibroblasten ins geschädigte Gewebe und fördert ihre Differenzierung in Myofibroblasten (Imanaka-Yoshida et al. 2001; Tamaoki et al. 2005). Des Weiteren unterstützt TNC *in vitro* die Migration von EPDCs und daher liegt die Vermutung nahe, dass EPDCs *in vivo* entlang von TNC zur Infarktzone wandern können (Hesse et al. 2017).

Interessanterweise spielt TNC bei der kardialen Regeneration des Zebrafisches eine wichtige Rolle (Chablais und Jazwinska 2012). Anders als bei Säugetieren ist der Zebrafisch in der Lage,

das Myokard nach Schädigung nahezu vollständig zu regenerieren (Poss et al. 2002). In der regenerativen Phase der kardialen Wundheilung des Zebrafisches spielt die Ablagerung bestimmter ECM-Komponenten, wie TNC eine wichtige Rolle. Eine Unterdrückung der TNC-Bildung führt zu einer Abschwächung der Migration von Kardiomyozyten ins infarzierte Gewebe und vermindert die kardiale Regeneration des Zebrafisches (Chablais und Jazwinska 2012).

Im Gegensatz dazu führt eine Unterdrückung der TNC-Bildung bei Mäusen nicht zu einer Verschlechterung der Wundheilung oder der Überlebensrate nach Infarkt (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012). Vielmehr zeigt sich in TNC-defizienten Mäusen nach Infarkt eine geringere interstitielle Fibrose, eine geringe Wandsteifheit und ein niedrigerer enddiastolischer Druck (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012). Vergleichbar zu den Ergebnissen bei Mäusen zeigen Menschen mit erhöhtem TNC-Serumlevel nach Infarkt ein höheres Auftreten eines maladaptiven kardialen Umbaus und eine schlechtere Prognose (Sato et al. 2012). Es wird daher vermutet, dass TNC einen negativen Einfluss auf das ventrikuläre Remodelling bei Maus und Mensch hat und zu einer vermehrten Fibrose und zur HI führt (Nishioka et al. 2010). Neben negativen Auswirkungen von TNC auf das Remodelling des Ventrikels hat TNC jedoch zunächst unterstützende Effekte auf die frühzeitige Reparatur. Es stimuliert die Bildung und Einwanderung von Myofibroblasten sowie die Angiogenese und die Produktion von extrazellulärer Matrix (Nikolaos G. Frangiogiannis 2012; Tamaoki et al. 2005; Imanaka-Yoshida et al. 2001). Dennoch scheinen die positiven Effekte durch das geringere kardiale Remodelling bei einem Knockout von TNC bei Mäusen zu überwiegen (Imanaka-Yoshida 2012).

1.4 Purine und purinerge Signalwege

Nukleotide und Nukleoside sind wichtige Bestandteile der DNA und RNA einer Zelle. In Form von Adenosintriphosphat (ATP) oder Guanosintriphosphat (GTP) stellen Nukleotide wichtige Energielieferanten für Stoffwechselforgänge dar. Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) ist als Coenzym und UDP-Glukose als Nukleotidderivat an verschiedenen Biosynthesen innerhalb der Zelle beteiligt (Horn et al. 2009). Das Nukleotid cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ist als *second messenger* für die intrazelluläre Signaltransduktion unentbehrlich (Horn et al. 2009). Nukleoside und Nukleotide spielen jedoch nicht nur bei intrazellulären Stoffwechselforgängen eine wichtige Rolle, sondern wirken als wichtige extrazelluläre Signalmoleküle (Ralevic und Burnstock 1998). So ist ATP neben seiner bekannten Rolle als

Energielieferant ein wichtiger non-adrenerger und non-cholinerger Neurotransmitter (Burnstock 1972; Abbracchio und Burnstock 1998). Das Nukleosid Adenosin hat bekannte negativ chronotrope, negativ inotrope und negativ dromotrope Effekte auf das Herz und eine vasodilatative Wirkung auf die Gefäße (Drury und Szent-Györgyi 1929; Sparks und Bardenheuer 1986). Durch die nahezu ubiquitäre Freisetzung von Nukleotiden und Nukleosiden werden Reaktionen auf Nukleotide und Nukleoside im ZNS und allen peripheren Geweben beobachtet (Lazarowski 2012; Abbracchio und Burnstock 1998; Ralevic und Burnstock 1998). Nukleotide und Nukleoside steuern wichtige und vielfältige physiologische Prozesse, wie die Entwicklung, die Proliferation und Differenzierung von Zellen, die Neurotransmission, Hormon- und Zytokin-Sekretion, Plättchen-Aggregation, Schmerzmodulation, Kontraktion glatter Muskulatur, kardiale Funktionen und Immun- und Inflammationsreaktionen (Abbracchio und Burnstock 1998; Ralevic und Burnstock 1998). Diese vielfältigen Effekte werden über bestimmte Oberflächenrezeptoren, die sog. Purinozeptoren, vermittelt (Burnstock 1978). Bislang sind drei Subklassen von Nukleosid- und Nukleotid-Rezeptoren, die Adenosinrezeptoren (P1), die ionotropen P2X- und die metabotropen P2Y-Nukleotid-Rezeptoren, bekannt (Burnstock 2011). Neben der nahezu ubiquitären Expression von Purinozeptoren (Humphrey et al. 1995; Gessi et al. 2011; Kügelgen und Hoffmann 2016) zeigen nahezu alle Zell- und Gewebetypen eine regulierte Freisetzung von Nukleotiden und Nukleosiden (Lazarowski 2012). Durch ubiquitär vorkommende Ektoenzyme erfolgt eine schnelle Degradierung von Nukleotiden zu Adenosin, das durch Membrantransporter wieder in die Zelle aufgenommen werden kann (Fredholm et al. 1994; Zimmermann 2000). Die Expression von Ektoenzymen auf fast allen Zellen unterstreicht die Wichtigkeit der extrazellulären purinergen Signalwege (Lazarowski et al. 2003).

1.4.1 Freisetzung von Adenosin und ATP

Unter physiologischen Bedingungen liegt der Adenosin-Spiegel in Zellen und Gewebsflüssigkeiten bei geringen Konzentrationen zwischen 20 - 300 nM (Fredholm 2010). Durch äquilibrierende Transporter wird intrazelluläres Adenosin aus der Zelle transportiert (Fredholm 2007) oder extrazelluläres Adenosin schnell in die Zellen aufgenommen (Haskó et al. 2008). Extrazelluläres Adenosin entsteht überwiegend aus dem Abbau von Nukleotiden durch eine Kaskade von membranständigen Ektoenzymen (Kap. 1.4.2) (Zimmermann 2000; Haskó et al. 2008). Die Bildung von Adenosin steigt durch physiologische Stimuli, metabolische Veränderungen und Gewebeschädigungen (Headrick et al. 2013). Unter pathologischen Bedingungen und Zellstress, wie beispielsweise Ischämie bzw. Hypoxie, steigt

die intrazelluläre Adenosin-Konzentration durch ein Ungleichgewicht von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf an (Deussen und Schrader 1991; Fredholm 2010; Gessi et al. 2011). Dabei entsteht Adenosin zum einen durch den gesteigerten intrazellulären Metabolismus von ATP und S-Adenosyl-Homozystein, zum anderen kann Adenosin durch die hypoxiebedingte Hemmung der Adenosin-Kinase nicht zu AMP rephosphoryliert werden (Sparks und Bardenheuer 1986; Haskó 2004; McIntosh und Lasley 2012). Das vermehrt intrazellulär gebildete Adenosin wird durch äquilibrierende Transporter in den extrazellulären Raum transportiert (Haskó et al. 2008). Über seine verschiedenen Rezeptoren auf der Zelloberfläche entfaltet Adenosin eine zytoprotektive Wirkung (Mubagwa und Flameng 2001) und kann beispielsweise die Schäden durch Ischämie/Reperfusion (I/R) im Herzen begrenzen (Headrick und Lasley 2009).

Im Gegensatz zu physiologischen Adenosin-Konzentrationen ist die intrazelluläre ATP-Konzentration mit 1 – 10 mM sehr hoch, und es besteht ein Gradient zur ATP-Konzentration im extrazellulären Raum. Hier liegt die ATP-Konzentration bei nur 1 – 10 nM unter physiologischen Bedingungen (Lazarowski et al. 2003; Vitiello et al. 2012). Nahezu alle Zell- und Gewebetypen zeigen eine regulierte Freisetzung von ATP, welche meist von der Freisetzung von Uridinnukleotiden begleitet wird (Lazarowski 2012). Es werden verschiedene Mechanismen der ATP-Freisetzung diskutiert. In exo- und endokrinen Geweben wird ATP zusammen mit weiteren Neurotransmittern, Hormonen und extrazellulären Mediatoren in Vesikeln gespeichert (Yegutkin 2008; Lazarowski 2012). Die regulierte Exozytose der Nukleotid-beladenen Vesikel erfolgt Ca^{2+} -abhängig (Zimmermann 1996). Neben der Freisetzung über exozytotische Vesikel in spezialisierten Geweben erfolgt in vielen nicht exzitatorischen Zellen, wie Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten, etc. eine vesikelunabhängige Freisetzung von ATP direkt aus dem Zytoplasma (Zimmermann 1996; Lazarowski et al. 2003; Lazarowski 2012). Daran sind Connexin- und Pannexin-Hemikanäle und möglicherweise ATP-leitende Maxi-Anionen Kanäle beteiligt (Fredholm 2007; Lazarowski 2012). ATP wird sowohl von ruhenden Zellen (Lazarowski et al. 2003) als auch vorübergehend durch mechanische Stimulation, Scherstress, hypotonische Schwellung, Hypoxie, Dehnung, hydrostatischen Druck, aber auch als Reaktion auf Bradykinine, Serotonin oder Ca^{2+} -mobilisierende pharmakologische Stimulation freigesetzt (Yegutkin 2008; Lazarowski et al. 2003).

Des Weiteren kommt es durch apoptotische Zellen zu einer vermehrte ATP-Freisetzung (Elliott et al. 2009). Bei Membranläsionen und Zellnekrose kommt es durch den Unterschied von hohen intrazellulären Nukleotid-Konzentrationen im Vergleich zu niedrigeren extrazellulären

Konzentrationen zu einer massiven Freisetzung von Nukleotiden (Fredholm 2007; Eltzschig und Eckle 2011). Eine enorme Freisetzung von Nukleosiden und Nukleotiden tritt beispielsweise unter pathologischen Bedingungen wie Trauma, Ischämie und Sepsis auf (Bours et al. 2006).

1.4.2 Ektoenzyme – extrazellulärer Purinstoffwechsel

Die ubiquitär vorkommenden membranständigen Ektoenzyme sind von zentraler Bedeutung für den extrazellulären Purinstoffwechsels. Sie zeigen mit ihrer katalytischen Seite nach außen und limitieren durch schnelle Degradierung die Aktivität und Wirkung extrazellulärer Nukleotide und Nukleoside (Zimmermann 1996; Zimmermann 2000; Yegutkin 2008). Zu den Ekto-Nukleotidasen, die den Nukleotid-Abbau katalysieren, gehört die Familie der Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolasen, die Familie der Ekto-Nukleotid Pyrophosphatase/Phosphodiesterasen, sowie die ekto-5'-Nukleotidase und die Alkalische Phosphatase (Bours et al. 2006; Zimmermann 2000). Extrazellulär gebildetes Adenosin wird entweder über Transporter in die Zellen transportiert oder wird direkt auf der Zelloberfläche von der Ekto-Adenosin-Desaminase zu Inosin umgewandelt (Yegutkin 2008).

1.4.3 Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren)

Extrazelluläres Adenosin kann an sogenannte P1-Rezeptoren binden. Es werden vier Subtypen der Adenosin-Rezeptoren unterschieden: A1, A2a, A2b und A3 (Ralevic und Burnstock 1998). Die Subtypen bestehen jeweils aus 7 Transmembran-Domänen und sind an G-Proteine gekoppelt, welche die Aktivität der Adenylatcyclase modulieren (Ralevic und Burnstock 1998; Chen und Bache 2003).

Die A1- und A3-Rezeptoren sind an $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt, welche die Adenylatcyclase inhibieren. Dadurch kommt es zu einer verringerten Bildung des intrazellulären Signalmoleküls cAMP (van Calcar et al. 1979). Über die A1-Rezeptoren vermittelt Adenosin im kardiovaskulären System seine negativ chronotrope, negativ inotrope und negativ dromotrope Wirkung (Boros et al. 2015; Fredholm et al. 2001b; Gessi et al. 2011). Am Herzen scheint der A1-Rezeptor eine kardioprotektive Wirkung bei myokardialer Ischämie zu besitzen (Headrick und Lasley 2009).

Der A3-Rezeptor wird im Herzen nur gering exprimiert (Jacobson und Gao 2006), wobei eine Aktivierung bei Ischämie scheinbar gegensätzlich zu den protektiven Effekten des A1-Rezeptors wirkt (Lu et al. 2008). Eine besonders hohe Expression des A3-Rezeptors zeigt sich

auf aktivierten neutrophilen Granulozyten; hier fördert er die Chemotaxis (Fredholm et al. 2011). Adenosin spielt eine wichtige Rolle bei der Migration, wobei je nach Zelltyp und Rezeptor eine unterschiedliche Wirkung vermittelt wird (Corriden und Insel 2012).

1.4.3.1 A2A-Rezeptor Subtyp

Die A2-Rezeptoren werden in vielen Geweben exprimiert und sind vor allem im lymphatischen und kardialen Gewebe stark vertreten (Thiel et al. 2003; Fredholm et al. 2011). Der A2A-Rezeptor ist generell G_s-Protein- bzw. im Gehirn G_{o1f}-Protein-gekoppelt und bewirkt bei Aktivierung eine Zunahme von cAMP (Fredholm et al. 2001b). A2A-Rezeptoren spielen durch die hohe Expression im lymphatischen Gewebe eine wichtige Rolle bei der Inflammation, zudem werden sie bei Hypoxie aktiviert und vermehrt exprimiert, weshalb sie wichtig für die Gewebeerhaltung bei Ischämie sind (Daval et al. 1996; Ahmad et al. 2009; Boros et al. 2015). Weitere Effekte, die durch die A2A-Rezeptoren gesteuert werden, sind die Vasodilatation, die Renin-Sekretion, die Hemmung der Plättchen-Aggregation, die Angiogenese, die Wundheilung, die verminderte Adhäsion von Immunzellen an Endothelzellen, die Inhibierung von Immunzellen sowie die verminderte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine (Vinten-Johansen et al. 1999; Khoa et al. 2001; Gessi et al. 2011; Boros et al. 2015).

Vergleichbar mit dem A1-Rezeptor vermittelt der A2A-Rezeptor eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre System (Gessi et al. 2011). Die intrakoronare Gabe von A2-Agonisten bei kardialer Ischämie und Reperfusion führt zu einer reduzierten Infarktgröße und zu einem besseren Schlagvolumen (Lasley et al. 2001), da über die Aktivierung des A2A-Rezeptors eine Stabilisierung der Mitochondrien und eine Verringerung der Apoptose erfolgt (Ke et al. 2015). Zudem inhibiert Adenosin über den A2A-Rezeptor die Adhäsion und Funktion von neutrophilen Granulozyten (Cronstein et al. 1990), wodurch die inflammationsähnliche Komponente der Reperfusionsschädigung begrenzt wird (Vinten-Johansen et al. 1999). Die enorme Bedeutung des A2A-Rezeptors bei der Inflammationsreaktion und der Gewebeschädigung wird dadurch klar, dass bei A2A-Rezeptor Knockout-Mäusen bereits geringe inflammatorische Stimuli und Gewebeschäden zum Tod führen (Ohta und Sitkovsky 2001). Trotz seiner überwiegend anti-inflammatorischen Effekte ist die Wirkungsweise des Rezeptors komplexer (Gessi et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe des A2A-Rezeptor-Agonisten (CGS 21680) den Aktivierungs-induzierten Zelltod von CD4⁺ T-Zellen verhindert, wodurch es zu einer Verlängerung der Immunantwort kommen kann (Himer et al. 2010). Des Weiteren spielt der A2A-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen,

wobei die vermittelte Wirkung je nach Zelltyp unterschiedlich ist (Corriden und Insel 2012). So vermindert die Aktivierung des A2A-Rezeptors die Adhäsion von Immunzellen an Endothelzellen (Vinten-Johansen et al. 1999) und hemmt beispielsweise die transuroepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten (Säve et al. 2011). Ebenso bewirkt Adenosin über den A2A-Rezeptor bei Makrophagen eine Hemmung der Chemokin-Rezeptor-7-vermittelten Migration (Williams und Cronstein 2012) und in hepatischen Sternzellen hemmt Adenosin über den A2A-Rezeptor die Chemotaxis (Hashmi et al. 2007). Eine Aktivierung des A2A-Rezeptors auf Endothelzellen fördert hingegen über die cAMP-abhängige PKA-Aktivierung die Migration der Zellen (Allen-Gipson et al. 2007). Neben Effekten auf die Zellmigration beeinflusst Adenosin über den A2A-Rezeptor die Zellproliferation. Bei humanen Lungenendothelzellen führt die Aktivierung des A2A-Rezeptors zu einer Zunahme der Proliferation (Ahmad et al. 2009), während bei kardialen Fibroblasten eine Hemmung der Proliferation beobachtet wird (Chen et al. 2004). Die Wirkung von Adenosin über den A2A-Rezeptor auf die Proliferation scheint Zelltyp-abhängig zu sein (Fernandez-Gallardo et al. 2016).

1.4.3.2 A2B-Rezeptor Subtyp

Anders als der A2A-Rezeptor ist der A2B-Rezeptor nicht nur G_s-Protein-gekoppelt, sondern auch G_q-Protein-gekoppelt und aktiviert dadurch die Phospholipase C, wodurch es zu einem Anstieg von Inositoltriphosphat, Diacylglycerin und Ca²⁺ kommt (Fredholm et al. 2001b; Jacobson und Gao 2006; Feoktistov und Biaggioni 2011). Der A2B-Rezeptor weist eine Koexpression zum A2A-Rezeptor auf Immunzellen auf, wobei seine Expression auf Makrophagen deutlich geringer ausfällt als die des A2A-Rezeptors (Ohta und Sitkovsky 2001; Fredholm et al. 2001b; Boros et al. 2015). Der A2B-Rezeptor hat die niedrigste Affinität zu Adenosin und benötigt höhere Adenosin Konzentrationen, wie sie unter pathologischen Bedingungen vorliegen, um aktiviert zu werden (Fredholm et al. 2001a). Anders als der A2A-Rezeptor entfaltet der A2B-Rezeptor bei Aktivierung nicht nur anti-inflammatorische Wirkung, sondern ebenfalls pro-inflammatorische Reaktionen (Fredholm et al. 2011). Eine Aktivierung des A2B-Rezeptors auf Makrophagen führt cAMP-vermittelt zu anti-inflammatorischen Effekten, wie der Hemmung der TNF α -Sekretion und der Steigerung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Feoktistov und Biaggioni 2011). Im Gegenzug dazu stimuliert der A2B-Rezeptor in intestinalen Epithelzellen, ebenfalls cAMP-abhängig, die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6, welches an der Degranulation von neutrophilen Granulozyten und an der Differenzierung von Lymphozyten beteiligt ist (Sitaraman et al. 2001). Weitere Effekte werden durch die G_q-Protein-Kopplung vermittelt. Auf

Mastzellen stimuliert die Aktivierung des A2B-Rezeptors G_q -vermittelt die Generierung von IL-4 (Feoktistov und Biaggioni 2011). Darüber hinaus ist der A2B-Rezeptor neben unterschiedlichen G-Proteinen in einigen Zellen an weitere multiple Signalwege, wie das GTP-bindende Protein p21ras oder JNK- und p38 MAPK-Signalweg, gekoppelt (Feng et al. 2010; Feoktistov und Biaggioni 2011). Dies erklärt die komplexen Effekte des Rezeptors auf die Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (Feoktistov und Biaggioni 2011). Wie der A2A-Rezeptor ist der A2B-Rezeptor an der Regulation der Migration und Proliferation von Zellen beteiligt. Neben der Hemmung der transendothelialen Migration von neutrophilen Granulozyten (Wakai et al. 2001), hemmt Adenosin über den A2B-Rezeptor die Migration von Gliazellen (Bernascone et al. 2010). Im Gegensatz dazu steigert eine Aktivierung des A2B-Rezeptors die Migration von retinalen Endothelzellen und endothelialen Progenitorzellen (Grant et al. 2001; Fernandez et al. 2012). Auf kardialen Fibroblasten kommt es über den A2B-Rezeptors zu einer Hemmung der Endothelin-1 induzierten Proliferation (Dubey et al. 1997; Phosri et al. 2017).

Bei einem Myokardinfarkt spielt der A2B-Rezeptor, welcher durch Hypoxie hochreguliert wird (Ahmad et al. 2009), eine wichtige Rolle. Einerseits reduziert die Gabe des A2B-spezifischen Rezeptor-Agonisten (BAY 60-6583) vor Reperfusion im I/R Modell die Infarktgröße (Ke et al. 2015). Andererseits verbessert die Antagonisierung des A2B-Rezeptors nach MI die Herzfunktion (Toldo et al. 2012; Zhang et al. 2014). Die Rolle des A2B-Rezeptors am Herzen wird daher kontrovers diskutiert. Viele Studien zur Wirkung des A2B-Rezeptors liefern gegensätzlich Ergebnisse, je nachdem ob eine pharmakologische Antagonisierung oder ein genetischer Knockout erfolgte (Ohta und Sitkovsky 2009; Feoktistov und Biaggioni 2011). Zudem werden Unterschiede in der Wirkung von Adenosin zwischen verschiedenen Spezies beobachtet (Maas et al. 2008; Zhong et al. 2011; Ryzhov et al. 2014). Je nach Gewebe und Signaltransduktion sowie Art und Weise der Schädigung scheint Adenosin über den A2B-Rezeptor unterschiedliche Effekte zu vermitteln (Cronstein und Sitkovsky 2017; Vecchio et al. 2017).

1.4.4 ATP-Rezeptoren (P2-Rezeptoren)

Extrazelluläre Nukleotide, wie ATP, ADP, UTP und UDP, vermitteln ihre Wirkung über P2-Rezeptoren, welche in die Gruppen der ionotropen P2X-Rezeptoren und der metabotropen P2Y-Rezeptoren unterteilt werden (Lazarowski et al. 2003; Burnstock 2006). Die P2X-Rezeptoren sind membranständige Ionenkanäle, die durch Bindung von extrazellulärem ATP

öffnen und kleine monovalente Kationen hindurchlassen (North 2002). Die P2X-Rezeptoren sind weit verbreitet und werden in einer Vielzahl an Geweben inklusive des Gehirns exprimiert (Humphrey et al. 1995). Die metabotropen P2Y-Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und zeigen wie die P2X-Rezeptoren eine nahezu ubiquitäre Expression (Lazarowski et al. 2003; Kügelgen und Hoffmann 2016). Während die P2X-Rezeptoren reine ATP-Rezeptoren sind, können die P2Y-Rezeptoren durch verschiedene Nukleotide, wie beispielsweise ATP, ADP, UTP oder UDP, aktiviert werden. Die einzelnen P2Y-Rezeptor-Subtypen binden die Nukleotide dabei mit unterschiedlicher Affinität (Lazarowski et al. 2003). Die P2-Rezeptoren vermitteln wichtige Effekte extrazellulärer Nukleotide in physiologischen und pathologischen Prozessen (Burnstock 2006; Kügelgen und Hoffmann 2016).

1.4.4.1 P2Y-Rezeptoren

In Säugetieren sind von den G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren bislang acht Subtypen (P2Y_{1,2,4,6,11,12,13,14}) bekannt (Kügelgen und Hoffmann 2016). Die fehlenden Rezeptor-Nummern (P2Y_{3,5,7,8,9,10}) sind entweder Rezeptoren, die in niederen Wirbeltieren entdeckt wurden, oder deren Funktion als Nukleotid-Rezeptor nicht nachgewiesen werden konnte (Abbraccio et al. 2006). Die P2Y-Rezeptoren werden nach ihrer Koppelung an G-Proteine in zwei Untergruppen unterteilt. Zu der einen Gruppe gehören die Rezeptoren P2Y_{1,2,4,6,11}, die an G_q-Proteine gekoppelt sind. Der P2Y₁₁-Rezeptor ist zusätzlich an G_s-Proteine gekoppelt. Die zweite Gruppe ist an Proteine der G_{i/o} Familie gekoppelt, zu ihr gehören die Rezeptoren P2Y_{12,13,14} (Abbraccio et al. 2006). Durch die nahezu ubiquitäre Expression auf unterschiedlichsten Zellen und Geweben vermitteln die verschiedenen G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren vielfältige Effekte. Unter anderem sind sie bei der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation über P2Y₁ und P2Y₁₂ enorm wichtig. Im Nervensystem modulieren P2Y-Rezeptoren die neuronale Aktivität, das neuronale Faserwachstum und die Phagozytose (Kügelgen und Hoffmann 2016). Des Weiteren wird über die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren die Migration und Proliferation von Zellen beeinflusst. So steuert eine Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors die Migration von Mikrogliazellen (Koizumi et al. 2013). Bei kardialen Fibroblasten und glatten Muskelzellen wird bei Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors eine Zunahme der Migration beobachtet (Braun et al. 2010; Yu et al. 2008; Chen et al. 2012). Neben einer Steigerung der Chemotaxis von Immunzellen durch Aktivierung von P2Y-Rezeptoren (Müller et al. 2010; Kronlage et al. 2010; Müller et al. 2017), zeigt sich andererseits eine hemmende Wirkung von Nukleotiden über P2Y-Rezeptoren auf die basale Migration von Immunzellen (Corriden und Insel 2012). Je nach Zelltyp und ATP-Rezeptor werden verschiedene Effekte auf

die Migration beobachtet (z.B. Chen et al. 2006; Isfort et al. 2011; Müller et al. 2017). Auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten und Lungenendothelzellen hat die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors einen stimulierenden Effekt (Chen et al. 2012; Müller et al. 2017).

1.4.4.2 P2X-Rezeptoren

In Säugetieren werden sieben unterschiedliche P2X-Rezeptoren (P2X₁₋₇) exprimiert (Khakh et al. 2001; North 2002). Ein Rezeptor besteht aus mehreren Untereinheiten, die sich zu einem homomeren oder heteromeren Ionenkanal zusammenlagern (Khakh et al. 2001). Wie bereits oben erwähnt, öffnen durch die Bindung von extrazellulärem ATP die membranständigen Ionenkanäle und kleine monovalente Kationen können den Kanal passieren. Einige Kanäle sind ebenso für Calcium und Anionen permeabel. Eine Besonderheit des P2X₇-Rezeptors ist es, dass er nach Aktivierung durch ATP eine Pore formt, die für große Moleküle bis zu 1000 Da, wie organische Kationen und Fluoreszenz-Farbstoffe, durchlässig ist (North 2002; Lazarowski et al. 2003). Die direkte Öffnung der Ionenkanäle durch die Aktivierung mit ATP führt zu einer sofortigen Signalweiterleitung und bedingt unter anderem eine schnelle Neurotransmission auf exzitatorischem Gewebe (Lazarowski et al. 2003). Da P2X-Rezeptoren nahezu ubiquitär exprimiert werden, zeigen sich Reaktionen auf die Rezeptoraktivierung unter anderem in Epithel-, Endothel-, Knochen-, Muskel- und in hämatopoetischem, sowie neuronalem Gewebe (North 2002). Vor allem der P2X₇-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Immun- und Inflammationsantwort (Lazarowski et al. 2003). Auf lymphatischem Gewebe und Immunzellen führt die Aktivierung des Rezeptors zur Zytokinfreisetzung (North 2002; Idzko et al. 2014). Des Weiteren beeinflusst die Aktivierung von P2X-Rezeptoren die Migration und Proliferation von Zellen. So stimuliert ATP beispielsweise über den P2X₄- und P2X₇-Rezeptor die Migration und Proliferation von kardialen Fibroblasten (Chen et al. 2012).

1.5 Adulte EPDCs und purinerge Signalwege

Die Freisetzung von VEGF und verschiedenen Zytokinen durch EPDCs wird unter anderem durch extrazelluläre purinerge Signale reguliert. EPDCs weisen eine hohe Expression der Adenosin-Rezeptoren A_{2A} und A_{2B} gefolgt vom A₃-Rezeptor auf, während der A₁-Rezeptor nur gering exprimiert wird (Hesse et al. 2017). EPDCs exprimieren sowohl ionotrope als auch metabotrope Nukleotid-Rezeptoren. Die Expressionsanalyse der ionotropen P2X-Nukleotid-Rezeptoren zeigt eine starke Expression des P2X₄-Rezeptors und eine etwas schwächere Expression des P2X₇-Rezeptors. Die Rezeptoren P2X₅, P2X₃ und P2X₁ werden nur geringfügig

exprimiert. Von den metabotropen P2Y-Nukleotid-Rezeptoren weisen EPDCs eine starke Expression des P2Y₂-Rezeptors, des P2Y₄- und P2Y₁₂-Rezeptors auf (Hesse et al. 2017).

Neben den Adenosin- und Adenosintriphosphat-Rezeptoren exprimieren EPDCs eine Reihe von Ektoenzymen, die den extrazellulären Abbau von ATP und Adenosin regulieren. Unter anderem exprimieren EPDCs das Ektoenzym CD73 (Hesse et al. 2017), welches den Abbau von AMP zu Adenosin katalysiert (Zimmermann 2000). Das Ektoenzym CD73 stellt dadurch eine wichtige Schnittstelle für einen Wechsel von einer ATP-gesteuerten pro-inflammatorischen Umgebung zu einer Adenosin-gesteuerten anti-inflammatorischen Umgebung dar (Antonioli et al. 2013). Das matrizelluläre Protein TNC kann durch Interaktion mit CD73 die enzymatische Funktion des Ektoenzym hemmen, wodurch vermindert Adenosin gebildet wird (Sadej et al. 2008). Eine relevante Inhibition von CD73 durch TNC konnte auf EPDCs jedoch nicht festgestellt werden (Hesse et al. 2017). Neben der enzymatischen Funktion besitzt CD73 eine nicht-enzymatische Funktion als Adhäsionsprotein. Tenscin-C als Interaktionspartner für die nicht-enzymatische Funktion von CD73 kann hierüber die Zelladhäsion und Zellmigration beeinflussen (Sadej et al. 2008). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Migration von EPDC durch TNC stimuliert wird (Hesse et al. 2017).

1.6 Ziele der Arbeit

Der MI zählt zu den kardiovaskulären Erkrankungen, welche weltweit die häufigste Todesursache darstellen. Nach MI führt die geringe Regenerationsfähigkeit des Herzens zur Fibrose und Narbenbildung mit schweren Folgeerkrankungen, wie die Herzinsuffizienz. Einen vielversprechenden Ansatz für die Verbesserung der Regeneration des Herzmuskelgewebes nach Infarkt stellen Zellen des Epikards, die sog. EPDCs, dar. Als multipotente Progenitorzellen können EPDCs in verschiedene Zelltypen differenzieren und modulieren durch die Sekretion parakriner Faktoren die Wundheilung. EPDCs stellen daher einen interessanten Ansatzpunkt dar, um die myokardiale Heilung zu verbessern. Wie die Aktivität und Sekretion parakriner Faktoren von EPDCs reguliert wird, ist bislang nur wenig erforscht. Die extrazellulären purinergen Signalmoleküle ATP und Adenosin, die beim MI durch die Gewebeschädigung vermehrt freigesetzt werden, könnten bei der Regulation von EPDCs eine wichtige Rolle spielen. ATP und Adenosin modulieren die Inflammationsreaktion, sowie die Bildung von Granulationsgewebe und Fibrose, indem sie spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche aktivieren. EPDCs exprimieren eine Reihe von ATP- und Adenosin-Rezeptoren

und sind über Ectoenzyme, die den Abbau von ATP und Adenosin katalysieren, am extrazellulären Purinstoffwechsel beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss von purinergen Signalen (ATP und Adenosin) auf folgende Aspekte der biologischen Aktivität von EPDCs analysiert:

1. Zellproliferation. Es wurde untersucht, ob purinerge Signale bei der Zellproliferation von EPDCs nach MI eine Rolle spielen könnten.
2. Ungerichtete und chemotaktische Migration. Dieser Punkt soll Aufschluss geben, ob purinerge Signalmoleküle bei der Regulation der Migration von EPDCs in das verletzte Myokardgewebe eine Rolle spielen.
3. Expression der Zytokine IL-6, IL-11 und IL-12A. In diesen Versuchen soll analysiert werden, ob purinerge Signale bei der Regulation der Zytokinexpression von EPDCs beteiligt sind und ob sie die Inflammationsreaktion und Fibrosebildung nach MI modulieren können.

Für die Untersuchungen werden in der vorliegenden Arbeit kultivierte EPDCs der Ratte verwendet, die 5 Tage nach experimentellem Herzinfarkt (60 Minuten Ischämie/Reperfusion (I/R)) mittels enzymatischen Verdau gewonnen werden. Da ATP und Adenosin durch Ectoenzyme, welche von EPDCs exprimiert werden, rasch abgebaut werden, werden in den Versuchen metabolisch stabile ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten eingesetzt.

2 Material

2.1 Geräte und Apparaturen

48-Well Migrationskammer, NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US)

Analysewaage Pioneer PA214, Ohaus (Greifensee, Schweiz)

Brutschrank, Heracell 150 I, Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, US)

BX61-Mikroskop, CKX31-Mikroskop Olympus (Hamburg, Deutschland)

Heizblock Thermomixer compact Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Heraeus Megafuge 16R Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, USA)

Hettich Zentrifugen Universal 320R Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)

Membranklemme, NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US)

Nanodrop 2000 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

PCR-Cycler, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Pipetten, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Plattenreader Fluorstar OPTIMA, BMG Labtech (Offenburg, Deutschland)

qRT-PCR Applied Biosystem Cycler StepOnePlus, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

SS-Klemme, NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US)

Sterilbank, Mars Pro Cytosafe Class 2, LaboGene Aps (Lyngø, Dänemark)

Vortexer, VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Wärmeschrank, Memmert (Schwabach, Deutschland)

Wischblatt, NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US)

Zentrifugen, Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.2 Verbrauchsmaterialien

96-Well Platten Cellstar Freiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Deckgläschen 24 x 50 mm, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Objektträger, Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH (Hamburg, Deutschland)

Pipettenspitzen Greiner (Frickenhausen, Deutschland)

Polycarbonat Membrane (80 x 25 mm, 8µM Poren, Dichte 1×10^3 ($\pm 15\%$), NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US)

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5ml, 2 ml, 15ml, 50 ml) EppendorfAG (Hamburg, Deutschland)

RNeasy MinElute spin columns, Qiagen (Venlo, Niederlande)
Sammeltube, Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zellkulturflasche, T75, T175, Sarstedt (Nürnberg, Deutschland)
Zellsieb 70 µm, Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

2.3 Lösungen, Medium und Puffer

Bovine Serum Albumin (BSA) Sigma-Aldrich (St.Louis, US)
Collagenase II, Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
DAPI, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glukose, Sigma Aldrich (St.Louis, US)
Eosin-G Lösung, Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol 100%, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Fetal calf serum (FCS), Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Fibronectin, EMD Millipore Corporation (Temecula, CA, US)
Gelatine-Lösung, Sigma-Aldrich (St.Louis, US)
Hämatoxylin-Lösung nach Mayer, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Heparin, Thermo Fischer Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)
L-Glutamin Gibco 200mM, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)
Methanol, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Panserin 401 (Serum-freies Medium), PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
PBS, Sigma-Aldrich (St.Louis, US)
Penicillin-Streptomycin, Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
RNase freies Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser), Qiagen (Venlo, Niederlande)
Salzsäure, Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Tenascin-C, EMD Millipore Corporation (Temecula, CA, US)
Trypsin/EDTA 10X Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

2.4 Rezeptor-Agonisten

2-Thio-UTP, Tocris Bioscience (Bristol, UK)

ATP Sigma-Aldrich (St.Louis, US)

BAY60-6583, Tocris Bioscience (Bristol, UK)

BzATP, Tocris Bioscience (Bristol, UK)

CGS-21680, Tocris Bioscience (Bristol, UK)

2.5 Kits für Isolierung und Nachweis von RNA und DNA

Kit für Zellproliferation

BrdU Cell Prolifertion Assay Kit, New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, US):

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat, 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) Solution, Detektionsantikörper, Fixier- und Denaturierungslösung, *Horseradish peroxidase* (HRP) konjugierter IgG-Antikörper, Stopplösung (Schwefelsäure), Wash Buffer

Kit für RNA Isolation

Qiagen RNeasy Micro Kit, Qiagen (Venlo, Niederlande):

70%iges Ethanol, DNase digest solution, RDD-Puffer, RNase-freies Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser), RPE-Puffer, RTL-Puffer (Lyse-Puffer), RW1 Puffer

Kit für Reverse Transkription

QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen (Venlo, Niederlande):

gDNA Wipeout-Puffer, RNase-freies Wasser, Reverse Transkriptase, RT-Puffer, RT Primer Mix

Kits für quantitative Echtzeit-PCR

PCR-Mastermixes Eurogentec Takyon ROX Probe 2X Mastermix dTTP blue, Eurogentec GmbH (Köln, Deutschland)

fw-Primer: CCCTGGCTCCTAGCACCAT, *rv*-Primer: GAGCCACCAATCCACACAGA

TaqMan Gene Expression Assay Thermo Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US):

Zielgen

IL-11: Rn00591723_m1, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

IL-12p35: Rn00584538_m1, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

IL-6: Rn01410330_m1, Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, Massachusetts, US)

5'FAM/3'MGB-modifizierte Sonde (ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC)

2.6 Software

IBM SPSS Statistics 24 (IBM Software, Armonk, New York, USA)

ImageJ Fiji Version 1.48

Microsoft Excel

Microsoft PowerPoint

Microsoft Word

Olympus Software F-View Soft Imaging System

StepOnePlus Software 2.0

3 Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in dieser Arbeit untersuchten EPDC wurden aus Rattenherzen nach künstlicher I/R gewonnen. Männliche Wistar-Ratten mit mindestens 250 g Körpergewicht wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit standardisiertem Pelletfutter und Wasser *ad libitum* versorgt. Alle Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz genehmigt (AZ:84-02.04.2014.A174).

3.2 Kardiale I/R (Induktion eines künstlichen Herzinfarktes)

Die Induktion der Herzinfarkte wurde von Dr. med. Zhaoping Ding nach einem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt (Ding et al. 2016). Die Ratten wurden mit Isofluran sediert, intubiert und zur Überwachung während der Operation an ein EKG angeschlossen. Nach Eröffnen des Brustkorbes mit einem Längsschnitt links des Sternums erfolgte die Ligatur der linken Koronararterie (*left anterior descending coronary artery*). Der Erfolg der Okklusion wurde mittels EKG kontrolliert. Die Okklusion der Arterie wurde für 60 min aufrechterhalten, dann wurde die Ligatur gelöst, und somit eine Reperfusion des Gewebes ermöglicht. Der Thorax wurde mit Nähten wieder verschlossen.

3.3 Präparation von EPDCs zur Kultivierung

Die Isolierung von EPDCs erfolgte 5 Tage nach I/R und wurde von Dr. rer. nat. Julia Hesse nach einem bereits beschriebenen Protokoll durchgeführt (Hesse et al. 2017). Nach Tötung der Tiere wurde das Herzpaket entnommen und in Waschpuffer, versetzt mit Heparin (1 U/ml), gewaschen. Lunge, Fettgewebe, Gefäße und Herzohren wurden abgetrennt. Um die EPDCs von der Herzoberfläche zu lösen, wurde ein enzymatischer Verdau mit Collagenase II genutzt. Das Herz wurde in die auf 37 °C vorgewärmte Collagenase-Lösung gegeben und 20 min bei 37 °C mit 12 rpm rotiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 70 µm-Zellsieb gefiltert und anschließend bei 500 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer Lösung aus 20 ml DMEM mit 30% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (EPDC-Kulturmedium) resuspendiert und in einer T75 Kulturflasche ausgesät. Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.4 Kultivierung von isolierten EPDCs

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden kultivierte EPDCs nach 1-5 Passagen genutzt. Die EPDCs wurden alle 3-4 Tage gesplittet. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann für 3-5 min bei 37 °C mit Trypsin/EDTA (3-5 ml) inkubiert, um die adhärenen Zellen zu lösen. Durch leichtes Abklopfen wurden die Zellen in Suspension gebracht. Anschließend wurde die Trypsin-Reaktion durch Zugabe von EPDC-Kulturmedium gestoppt. Nach Abzentrifugieren bei 350 g für 5 min wurden die Zellen resuspendiert und in 10 ml (T75 Kulturflaschen) oder 25 ml (T175 Kulturflaschen) EPDC-Kulturmedium ausgesät.

3.5 BrdU Cell Proliferation Assay

Um die Proliferationsrate von EPDCs unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurde das BrdU Cell Proliferation Assay Kit der Firma New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, US) genutzt. Hierbei wird in der S-Phase des Zellzyklus das Pyrimidin-Analog 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU) an Stelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA der Zellen eingebaut. Das eingebaute BrdU wird nach Denaturierung der DNA mit Hilfe eines spezifischen murinen Antikörpers detektiert (Detektionsantikörper). Daran bindet wiederum ein an Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase (HRP)) gebundener Anti-Maus IgG-Antikörper. Die Hinzugabe des HRP-Substrats 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin führt zu einer blauen Farbentwicklung. Diese Reaktion wird durch Schwefelsäure gestoppt, und es kommt zu einem Gelb-Umschlag der Lösung. Die Farbentwicklung ist proportional zur Menge des eingebauten BrdU. Durch Messung der Absorption bei 450 nm kann daher das Ausmaß der Zellproliferation ermittelt werden.

Der Proliferations-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. EPDCs wurden in eine 96 Well-Platte ausgesät und in EPDC-Kulturmedium, das mit BrdU Solution (10 µM) versetzt war, für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit 100 µl/Well der Fixier- und Denaturierungslösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektionsantikörper-Lösung wurde nach Entfernen der Fixierlösung hinzugegeben (100 µl/Well) und für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Wash Buffer (100 µl/Well) wurden jeweils 100 µl/Well des 1:100 verdünnten HRP-konjugierten IgG-Antikörpers hinzugegeben. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit entfernt und die Wells wurden erneut dreimal mit jeweils 100 µl/Well Wash Buffer gewaschen. Durch die Hinzugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Substrat (100 µl/Well) kam es nach ca. 20 min zu einer Blaufärbung. Die Reaktion wurde mit

100 µl/Well Stopplösung unterbrochen. Innerhalb der nächsten 30 min erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm im Plattenreader FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech (Offenburg, DE).

Um zu untersuchen, ob die Proliferation von EPDCs durch die purinergen extrazellulären Signalmoleküle ATP und Adenosin moduliert wird, wurden die EPDCs mit Agonisten für ATP- oder Adenosin-Rezeptoren stimuliert. Hierfür wurden dem EPDC-Kulturmedium während der Inkubation mit BrdU Solution für 24 h 1 µM CGS-21680, 1 µM BAY60-6583, 10 µM ATP, 1 µM BzATP oder 1 µM 2-ThioUTP zugefügt. Die Detektion der Proliferation erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll.

3.6 Migrationsassay

Das Migrationsverhalten von EPDCs wurde mit einer 48-Well Migrationskammer von NeuroProbe (Gaithersburg, MD, US) untersucht. Die Migrationskammer besteht aus zwei Kammern. Die obere Kammer (Kammer 1) wird von der unteren Kammer (Kammer 2) durch eine Polycarbonat-Membran getrennt (Abb. 1). Die Membran (Größe 80 mm x 25 mm) hat 8 µm große Poren, die in einer Dichte von $1 \times 10^3 (\pm 15\%)$ vorhanden sind. Die Kammer hat 48 Wells (Durchmesser 3,2 mm), die jeweils eine Fläche von 8,04 mm² besitzen. Ein *coating* (Beschichten) der Membran mit Proteinen der extrazellulären Matrix, wie Kollagenen oder Fibronectin, kann die Migration von Zellen erleichtern. Die zu untersuchenden Zellen werden in die obere Kammer ausgesät und wandern durch die Poren der Membran in die untere Kammer. Die durch die Membran migrierten und jetzt an der Unterseite der Membran anhaftenden Zellen werden durch eine Färbung sichtbar gemacht und mikroskopisch quantifiziert.

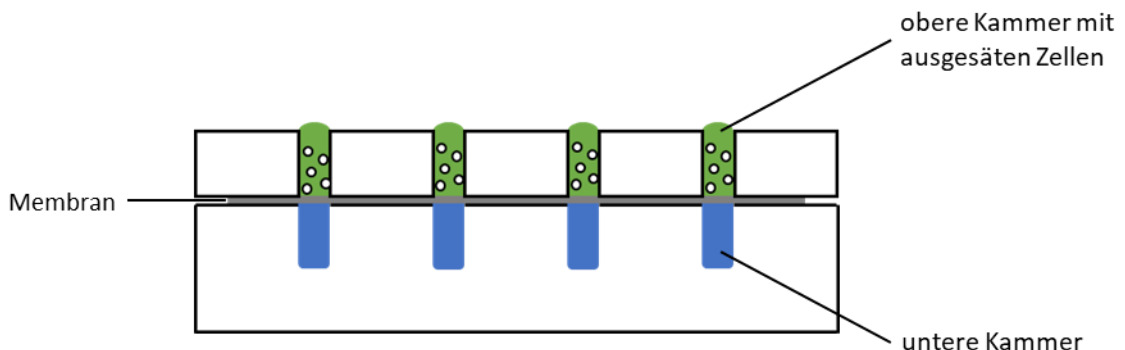


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Migrationskammer von NeuroProbe.

3.6.1 Coating der Membran

Um die Migration von EPDCs durch die Polycarbonat-Membran zu ermöglichen, wurde die Membran mit extrazellulärer Matrix (Gelatine) bzw. einzelnen Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronectin und Tenascin-C) beschichtet. Hierfür wurde die Membran (80 mm x 25 mm) mit der Unterseite auf einen Tropfen (1000 µl) einer Lösung des entsprechenden Proteins in PBS gelegt, sodass nur die Unterseite in Kontakt mit der Proteinlösung kam. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Membran zweimal auf Tropfen von 1000 µl PBS gewaschen und anschließend auf einem Tropfen von 1000 µl BSA (1%, denaturiert bei 85°C für 10 min) für 1 h bei 37°C geblockt. Anschließend wurde die Membran erneut mit PBS gewaschen und an der Luft getrocknet. Zur späteren Orientierung wurde die obere linke Ecke schräg abgeschnitten.

3.6.2 Durchführung des Migrationsassay

Der Migrations-Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die unteren Wells in Kammer 2 (Abb. 1) wurden mit jeweils 25 µl steril-filtrierte DMEM mit 5% BSA, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin (Quenching-Medium) oder Serum-freien Medium (Panserin 401) gefüllt, sodass sich ein leicht konvexer Meniskus zeigte. Um die chemotaktische Wirkung von 5% FCS, ATP- und Adenosin-Agonisten (1 µM oder 10 µM ATP, BzATP, ATPyS, 2-ThioUTP, CGS-21680, BAY60-6583) auf EPDCs zu untersuchen, wurde die jeweilige Substanz dem Medium der unteren Wells hinzugefügt. Die vorbereitete Membran wurde mit der „beschichteten“ Unterseite auf die Kammer 2 luftblasenfrei aufgelegt. Dabei wurde die Membran so ausgerichtet, dass sich die abgeschnittene Ecke oben links befand. Nachdem die Silikondichtung auf der Membran positioniert war, wurde der obere Teil der Kammer (Kammer 1) auf die untere Kammer (Kammer 2) aufgesetzt. Die Kammer 1 wurde mit einer Hand so lange fixiert, bis sie mit Schrauben auf der Kammer 2 befestigt war. In die oberen Wells (Kammer 1) wurden nun jeweils 55 µl einer EPDC-Suspension pipettiert, wobei Zellkonzentrationen von 3.000 Zellen/55 µl, 6.000 Zellen/55 µl, 12.000 Zellen/55 µl oder 40.000 Zellen/55 µl ausgesät wurden. Um herauszufinden, ob eine Stimulation der EPDCs mit Agonisten für ATP- oder Adenosin-Rezeptoren einen Einfluss auf die Migration von EPDCs hat, wurde 1 µM oder 10 µM ATP, BzATP, ATPyS, 2-ThioUTP, CGS-21680 oder BAY60-6583 der EPDC-Suspension beigefügt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C für 3 h, 5 h, 6 h oder 16 h.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus der Kammer 1 durch Schütteln entfernt, die Schrauben gelöst und die gesamte Migrationskammer gedreht. Die sich jetzt oben befindliche Kammer 2 wurde entfernt, sodass die Membran auf der Kammer 1 verblieb und die Unterseite der Membran mit den migrierten Zellen nach oben zeigte. Die zuvor abgeschnittene Ecke der Membran war nun unten links lokalisiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen, die nicht migriert waren, entfernt, um bei einer späteren Detektion lediglich die migrierten Zellen an der Membranunterseite zu erfassen. Hierfür wurde die Membran mit der Membranunterseite nach oben, an einer Seite in eine große Membranklemme und an der gegenüberliegenden Seite in eine kleine „SS-Klemme“, eingespannt. Die untenliegende Membranoberseite mit den „nicht migrierten“ Zellen wurde erst in PBS gewaschen und dann an einem Wischblatt abgestreift, um die anhaftenden Zellen mechanisch zu entfernen. Dieser Vorgang wurde nach Säubern des Wischblattes zweimal wiederholt.

3.6.3 Fixierung der migrierten Zellen auf der Membran

Nachdem die „nicht migrierten Zellen“ mechanisch entfernt waren und die Membran an der Luft getrocknet war, wurde die Fixierung der migrierten Zellen auf der Membran durchgeführt. Dafür wurde die Membran für 2 min in Methanol eingetaucht.

3.6.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung können Zellkern und Zellplasma gefärbt werden. Hämatoxylin ist ein natürlich vorkommender farbloser Farbstoff des Blauholzbaumes. Durch Oxidation und Zugabe von Alaunen entsteht ein Hämalaun-Lack. Das basophile Hämalaun bindet an saure Zellbestandteile, insbesondere an die DNA des Zellkerns und die RNA. Eosin ist ein saurer, gelbroter Xanthinfarbstoff, der basische Plasmaproteine und azdiophile Zellstrukturen darstellt. Dadurch entsteht ein Kontrast zwischen den blauviolett gefärbten Zellkernen und dem rosafarbenen Zytoplasma.

Für die Färbung wurde die Membran 5 min in Mayers Hämalaun-Lösung gefärbt, anschließend für etwa 2 s in 0,1% HCl-Lösung gespült. Der Farbumschlag zu Blau-Violett wurde durch Spülen in Leitungswasser für 5 min herbeigeführt. Für die Eosin-Färbung wurde die Membran 3 min in Eosin-G-Lösung getaucht und danach mit Leitungswasser gespült. Die Membran wurde in eine aufsteigende Alkoholreihe, beginnend bei 70% Ethanol und bis 100% Ethanol, für 30 s getaucht und nach 2 min in 100% Ethanol an der Luft getrocknet. Mit der Zellseite (der

ursprünglichen Membranunterseite) nach oben wurde die Membran auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Tropfen Immersionslösung glatt auf dem Objektträger fixiert.

3.6.5 DAPI Färbung

Um eine automatische Quantifizierung der migrierten Zellen mittels Image J zu erleichtern, wurde eine fluoreszente Markierung der Zellkerne etabliert. Der verwendete DAPI-Farbstoff bindet an AT-reiche Regionen der DNA und fluoresziert bei Anregung durch ultraviolettes Licht in blauer Farbe. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs liegt bei 358 nm und das Emissionsmaximum bei 461 nm nach Bindung an doppelsträngige DNA.

Die Färbung erfolgte nach Fixierung (siehe Kap. 3.6.3) der migrierten Zellen auf der Membran. Die Membran wurde mit der Zellseite (der ursprünglichen Membranunterseite) nach oben auf einen Objektträger gelegt und die Zellkerne mit einer Mischung aus 90% Glycerol/ 10% PBS und DAPI (1:100.000) gefärbt. Anschließend wurde ein Deckgläschen luftblasenfrei aufgebracht und mit Nagellack fixiert.

3.6.6 Detektion und Quantifizierung der migrierten Zellen

Nach Färbung der Zellen war es möglich, die migrierten Zellen im Lichtmikroskop (HE-Färbung) bzw. im Fluoreszenzmikroskop (DAPI-Färbung) zu erkennen. Hierfür wurde ein BX61-Mikroskop (Olympus, Hamburg) verwendet. Für die Quantifizierung der migrierten Zellen wurden von jedem Well 3 Bildausschnitte dokumentiert. Anschließend wurden die Zellkerne in den Bildausschnitten (ein Bildausschnitt entspricht ca. 1,52 mm²) manuell oder automatisiert mittels des „*analyze particle*“ Werkzeuges von ImageJ quantifiziert (Schindelin et al. 2012).

3.7 Untersuchung der Genexpression von Zytokinen

Die Genexpression von Zytokinen wurde mit Hilfe der mRNA in kultivierten EPDCs untersucht. Die mRNA ist eine Kopie eines DNA-Abschnitts, der für ein bestimmtes Protein kodiert und die Information vom Zellkern ins Zytoplasma zu den Ribosomen transportiert. Hier wird die in der mRNA enthaltene Information über den Bauplan des Proteins umgesetzt und das Protein gebildet. Durch die Analyse und Quantifizierung von mRNA, die beispielsweise für ein bestimmtes Zytokin kodiert, kann daher die Genexpression bestimmt werden. Um die mRNA für spezifische Gene zu detektieren und zu quantifizieren, sind drei Schritte notwendig.

Zunächst wird die mRNA aus den Zellen isoliert, als zweites wird die mRNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Im letzten Schritt erfolgt die quantitative Echtzeit-PCR, die es ermöglicht, selektive DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und zu quantifizieren (vgl. Löffler und Petrides (2003)).

3.7.1 Präparation von RNA

Die Isolation von RNA aus EPDCs erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Micro Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Verfahren beruht auf der Zellyse, wodurch es zum Freisetzen der zellulären Bestandteile kommt, und der Inaktivierung von zellulären Nukleasen, um den Abbau der RNA zu verhindern. Im weiteren Schritt kommt es zur Trennung der mRNA und den übrigen zellulären Bestandteilen, indem die RNA an eine Silica-Membran bindet. Die übrigen Bestandteile werden durch wiederholtes Waschen und Zentrifugieren entfernt.

Die EPDCs wurden für die RNA-Präparation nach einmaligem Waschen mit PBS als Pellet bei -80°C eingefroren, wobei sichergestellt wurde, dass nicht mehr als vier Millionen EPDCs pro Ansatz enthalten waren. Die Zellpellets wurden in 600 μl RLT-Puffer (Lyse-Puffer) des Kits, welcher Guanidinthiocyanat zur Inaktivierung der RNasen enthält und β -Mercaptoethanol (Verhältnis 1:100), resuspendiert, und die Zellsuspension durch Pipettieren homogenisiert. Anschließend wurde ein equivalentes Volumen von 70%igem Ethanol hinzugegeben (600 μl). Die Mischung wurde auf die RNeasy MinElute spin columns gegeben, wobei max. 700 μl pro Säule verwendet wurde. Es erfolgte die Zentrifugation über 15 s bei maximaler Geschwindigkeit in ein Sammeltube. Der Durchfluss wurde anschließend verworfen. Es wurden 350 μl RW1-Puffer pro Säule geladen und erneut für 15 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Hierdurch wurden die übrigen zellulären Bestandteile rausgewaschen, während die RNA an die Silica-Membran der Säule gebunden blieb. Um verbliebene DNA aus der Säule zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde die Säule mit 80 μl DNase digest solution, bestehend aus DNase (10 μl) und RDD-Puffer (70 μl), beladen und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 350 μl des RW1-Puffers beladen, erneut für 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Für die weiteren Schritte wurde ein neues Sammeltube verwendet. Die Säule wurde mit 500 μl RPE-Puffer beladen, 15 s zentrifugiert und das Eluat verworfen. Dieser Schritt wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Danach wurde die Säule mindestens 2 min zum Trocknen leer zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppi gesetzt und für die Elution

der RNA wurden 35 µl RNase-freies Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) auf die Silica-Membran der Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 min erfolgte die Zentrifugation von 60 s und der Durchfluss, welcher die RNA enthielt, wurde direkt auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der RNA im Nanodrop.

3.7.2 Messung der RNA im Spektralphotometer (Nanodrop)

Um die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA-Proben zu quantifizieren, erfolgte eine Spektralphotometrie mit dem Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, US). Durch die photometrische Messung kann der RNA-Gehalt und der Reinheitsgrad des zuvor gewonnenen Eluats bestimmt werden. Zu Beginn wurden der obere und untere Probenhalter mit einem Tuch gereinigt, um mögliche Verunreinigungen zu beseitigen. Die Blindprobe wurde mit 1 µl RNase-freiem Wasser, das auch zur Elution der RNA diente, durchgeführt. Anschließend wurde das Wasser mit einem Tuch entfernt und 1 µl der isolierten RNA aufgetragen und gemessen. Neben dem RNA-Gehalt der Probe gibt das Verhältnis der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm zu 280 nm Auskunft über den Reinheitsgrad. Proben mit einem Verhältnis von $\sim 2,0$ werden für RNA als rein angesehen. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.3 Reverse Transkription

Damit die RNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR vervielfältigt und selektive DNA-Abschnitte quantitativ nachgewiesen werden können, ist ein Umschreiben der RNA in cDNA notwendig. Hierfür wird das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, welches anhand der RNA Matrize die cDNA bildet.

Für die Reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet und pro Ansatz wurden 500 ng RNA umgeschrieben. Zuerst wurde die bei -80°C gelagerten RNA-Proben auf Eis aufgetaut und erneut eine DNA-Eliminationsreaktion durchgeführt, um mögliche Kontaminationen der Ausgang-RNA mit DNA zu bereinigen. Dazu wurde das jeweilige Volumen der RNA-Proben, das 500 ng RNA enthielt mit RNase-freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und mit 2 µl gDNA Wipeout-Puffer versetzt. Es wurde eine Non-Template-Kontrolle (ohne RNA als Template für die spätere Reverse Transkription) mit 24 µl RNase-freiem Wasser und 4 µl Wipeout-Puffer und eine Negativkontrolle der reversen Transkription ohne Enzym mit 500 ng RNA in 12 µl RNase-freiem Wasser und 2 µl gDNA

Wipeout-Puffer angesetzt. Die Proben wurden für 2 min bei 42°C im Eppendorf-Cycler inkubiert, anschließend pausiert der Cycler auf 4°C. In der Zwischenzeit wurde ein Mastermix für die Reverse Transkription für die Proben mit RNA-Template und die Non-Template-Kontrolle angefertigt. Der Mastermix bestand jeweils aus 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl RT-Puffer (enthält die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate zur Synthese der cDNA) und 1 µl RT Primer Mix pro Ansatz. Für die Negativkontrolle ohne Enzym wurde ein Ansatz aus 1 µl RNase-freiem Wasser, 4 µl RT-Puffer und 1 µl RT Primer Mix angesetzt. Nach Beendigung der DNA-Eliminationsreaktion wurde der vorbereitete Mastermix sowie der Ansatz ohne Enzym zu den entsprechenden Proben hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben im Cycler für 15 min bei der Arbeitstemperatur der Reversen Transkriptase von 42°C inkubiert. Zuletzt erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch Erhitzung auf 95°C für 3 min und die Proben mit cDNA wurden bei -20°C eingefroren.

3.7.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Die PCR besteht pro Zyklus aus jeweils 3 Schritten.

Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der cDNA in Einzelstrang-DNA durch Erhitzung auf 95°C. Im zweiten Schritt kommt es in der Annealing Phase zur Anlagerung der spezifischen Primer am 5'-Ende der DNA-Abschnitte. Im letzten Schritt, der Elongation, synthetisiert die hitzebeständige Taq-Polymerase ausgehend von den Primern durch Zugabe von Desoxyribonukleotiden den komplementären DNA-Strang, sodass ein Doppelstrang entsteht. Insgesamt werden 40 Zyklen durchgeführt, wobei sich das PCR-Produkt pro Zyklus verdoppelt und somit ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge erfolgt. Die Echtzeit-PCR ermöglicht durch Fluoreszenz-Markierung eine Messung der DNA-Menge nach jedem Zyklus, da das Fluoreszenzsignal mit jedem synthetisiertem DNA-Strang zunimmt. Für die Fluoreszenz-Markierung kann beispielsweise eine TaqMan-Sonde verwendet werden. Diese besitzt an ihrem 5'-Ende einen FAM-Reporter (Fluoreszenzfarbstoff) und am 3'-Ende einen Lichtabsorbierenden TAMRA-Quencher. In der Annealing-Phase bindet die TaqMan-Sonde zwischen *forward* (fw)- und *reverse* (rv)-Primern an das Template. Solange die Sonde intakt ist, reduziert die räumliche Nähe des Quencher-Farbstoffs zum Reporter-Farbstoff die vom Reporter-Farbstoff abgegebene Fluoreszenz. In der Elongationsphase wird die Sonde durch die Taq-Polymerase gespalten, wodurch eine räumliche Trennung von Reporter und Quencher entsteht, was eine Erhöhung der Fluoreszenz zur Folge hat.

Die Echtzeit-PCR wurde mit dem Applied Biosystem Cycler StepOnePlus durchgeführt. Um die mittels reverser Transkription hergestellte cDNA als Template für die Echtzeit-PCR einzusetzen, wurde sie mit H₂O im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Echtzeit-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in einer 96-Well-PCR-Platte durchgeführt. Dafür wurden zur Detektion von β-Actin-mRNA, deren Expressionsstärke als Referenz genutzt wurde, zu 1 µl des Templates und 5 µl des PCR-Mastermixes Eurogentec Takyon ROX Probe 2X Mastermix dTTP blue, 1,8 µl einer Mischung aus fw- und rv-Primer (CCCTGGCTCCTAGCACCAT bzw. GAGCCACCAATCCACACAGA, je 10 µM), 0,4 µl der 5'FAM/3'MGB-modifizierte Sonde (ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC, 5 µM) und 1,8 µl H₂O zugegeben. Für die Detektion von mRNA-Transkripten von IL-6, IL-11 und IL-12p35 wurden ThermoFisher TaqMan Gene Expression Assays genutzt (IL-6: Rn01410330_m1, IL-11: Rn00591723_m1, IL-12p35: Rn00584538_m1, 5'FAM/3'MGB). Von ihnen wurden 0,5 µl mit 3,5 µl H₂O zu 1 µl Template und 5 µl PCR-Mastermix gegeben. Für die Non-Template Kontrolle wurde anstelle des cDNA-Templates 1 µl H₂O verwendet. Die Platte wurde mit Klebefolie versiegelt und anschließend für eine Minute bei 1000 g zentrifugiert. Das Protokoll für die PCR umfasste einen anfänglichen Aktivierungsschritt bei 95°C für 10 min und 40 Zyklen von Denaturierung bei 95°C für 15 s und Primer-Hybridisierung und Amplifikation bei 60°C für 1 min.

Um die Expression der mRNA-Transkripte von IL-6, IL-11 und IL-12p35 zwischen den Proben zu vergleichen, wurde ihre relative Expression im Verhältnis zu β-Actin als Referenz ermittelt. Für diesen Normierungsschritt wurde die ΔCT-Methode, eine Variante der Livak-Methode (Livak und Schmittgen 2001), verwendet. Hierbei wurde von dem CT-Wert von β-Actin die CT-Werte von IL-6, IL-11 und IL-12p35 subtrahiert ($\Delta CT = CT_{\text{Referenzgen}} - CT_{\text{Zielgen}}$). Aufgrund der exponentiellen Amplifikation während der PCR ist dann die relative Genexpression der Zielgene $= 2^{\Delta CT}$.

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 24 (IBM Software, Armonk, New York, USA). Zur Überprüfung auf Signifikanz wurden die erhobenen Werte zunächst mit dem Levene Test auf Normalverteilung überprüft. Bei vorliegender Normalverteilung erfolgte die statistische Auswertung mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test oder einer ANOVA. Lag keine Normalverteilung der Daten vor, wurde zur Ermittlung signifikanter Unterschiede der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test

verwendet. Es wurden p-Werte ≤ 0.05 als statistisch signifikant gewertet. Die erhobenen Werte werden als Mittelwert (MW) mit Standardabweichung (SD) angegeben.

4 Ergebnisse

Epicardium-derived cells (EPDCs) haben durch die Sekretion pro-angiogener und pro-inflammatorischer Faktoren sowie durch die Sekretion von matrizellulären Proteine und die Differenzierung in kardiale Bindegewebszellen einen wichtigen Einfluss auf die kardiale Regeneration nach MI (Zhou et al. 2008, Hesse et al. 2017, Bax et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die extrazellulären purinergen Signalmoleküle ATP und Adenosin einen Einfluss auf die biologische Aktivität von kultivierten EPDCs haben. Die nach Herzinfarkt gebildeten EPDCs wurden 5 Tage nach künstlichem Herzinfarkt (Ischämie und Reperfusion) aus Rattenherzen mittels enzymatischem Verdau von der Oberfläche des ischämischen Herzens gewonnenen und kultiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von ATP und Adenosin auf die Proliferation, Migration und Zytokinexpression von EPDCs *in vitro* untersucht. In dem durchgeführten BrdU-Proliferationsassay, Transwell-Migrationsassay und den Versuchen zur Zytokinexpression mittels Echtzeit-PCR wurden selektive und nicht-selektive ATP-Rezeptor- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten verwendet.

4.1 Proliferation von EPDCs

Um die Proliferation der kultivierten EPDCs zu untersuchen, wurde ein BrdU-Proliferationsassay durchgeführt (siehe Kap. 3.5). Ziel war es herauszufinden, ob purinerge Signalwege eine entscheidende Rolle in der Proliferation von EPDCs spielen.

In diesen Versuchen wurden die EPDCs von infarzierten Rattenherzen mit Agonisten für ATP-Rezeptoren (10 μ M ATP, P2XR: 1 μ M BzATP, P2Y2R: 1 μ M 2-ThioUTP) oder spezifischen Agonisten für Adenosin-Rezeptoren (A2AR: 1 μ M CGS-21680, A2BR: 1 μ M BAY60-6583) stimuliert. Als Kontrollgruppe dienten EPDCs, die nicht stimuliert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde bei allen Gruppen die Proliferation nach Protokoll (Kap.3.5) ermittelt. Zwischen der Kontrollgruppe ($0,8 \pm 0,2$) und der Stimulation mit ATP-Agonisten (ATP: $0,8 \pm 0,2$; BzATP: $0,7 \pm 0,3$; 2-ThioUTP: $0,8 \pm 0,2$) konnte kein signifikanter Unterschied in der Proliferation beobachtet werden ($n = 3$) (Abb. 2A). Weiterhin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu der Stimulation mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten (CGS-21680: $0,8 \pm 0,2$; BAY60-65833: $0,7 \pm 0,2$) ($n = 3$) (Abb. 2B). Ein Einfluss purinergere Signale über ATP- oder Adenosin-Rezeptoren auf das Proliferationsverhalten von EPDCs konnte somit nicht beobachtet werden.

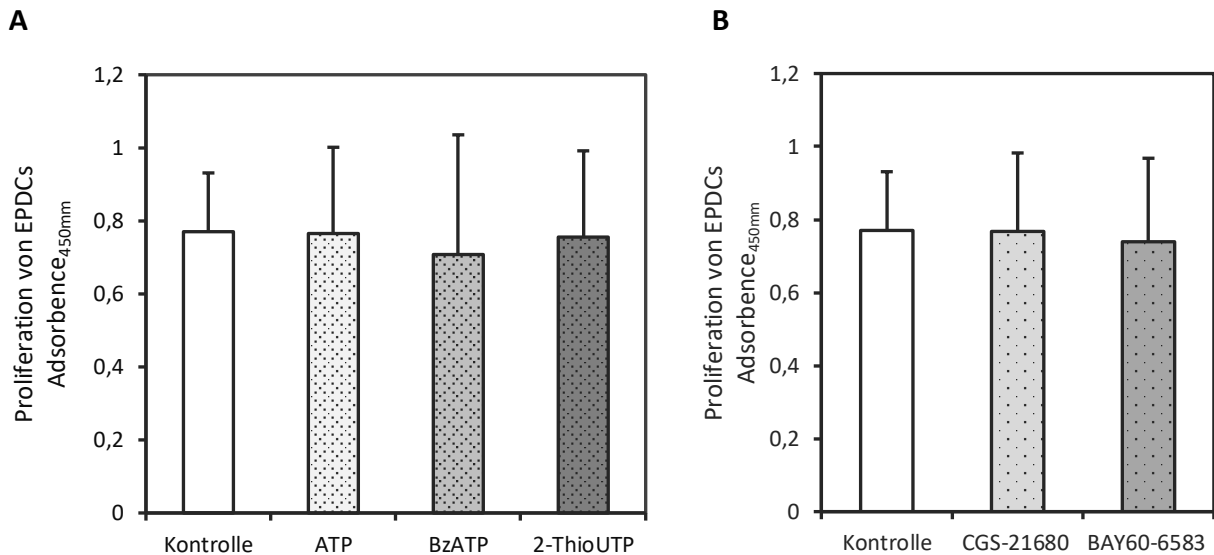


Abbildung 2: Proliferation von EPDCs mittels BrdU-Proliferationsassay. A+B: Stimulation der EPDCs mit ATP-Rezeptor- oder Adenosin-Rezeptor-Agonisten im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe und Detektion der Proliferation nach 24 h Inkubationszeit. **A:** Stimulation der EPDCs mit 10 μ M ATP, 1 μ M des P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP und mit 1 μ M des spezifischen P2Y2-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP ($n = 3$). **B:** Stimulation der EPDCs mit 1 μ M des spezifischen A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 und Stimulation mit 1 μ M des spezifischen A2B-Rezeptor-Agonisten BAY60-6583 ($n = 3$). Dargestellt ist die Proliferation als Mittelwert \pm SD.

4.2 Migration von EPDCs

Die Migration der frisch isolierten EPDCs wurde mit der Migrationskammer der Firma NeuroProbe untersucht. Diese ist nach dem Prinzip der Boyden-Kammer aufgebaut und besteht aus oberen Wells, die von den unteren Wells durch eine porenbesetzte Membran getrennt wird. Die Zellen wurden in die oberen Wells ausgesät und wanderten durch die Poren der Membran zu den unteren Wells. Zunächst wurden die Versuchsbedingungen etabliert, unter denen eine Migration von EPDCs beobachtet werden konnte. In einem zweiten Schritt wurde der Einfluss purinerges Signalwege mittels Agonisten für ATP- oder Adenosin-Rezeptoren auf die Migration der EPDCs untersucht.

4.2.1 Einfluss unterschiedlicher coatings auf die Migration von EPDCs

Um eine Migration von EPDCs durch die Polycarbonat-Membran zu beobachten, ist ein Beschichten, das sog. „coating“, der Membranunterseite notwendig. Zum coating kann extrazelluläre Matrix (Gelatine) oder einzelne Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie bspw. Kollagene, Fibronectin, Laminin oder TNC verwendet werden (Grant et al. 2001; Chen 2005; Falasca et al. 2011). Um ein geeignetes coating für die Migration von EPDCs zu

etablieren, wurden in der vorliegenden Arbeit *coatings* mit Gelatine (0,01% und 0,001%), Fibronectin (10 µg/ml) und TNC (siehe Kap. 3.6.1) getestet.

Zunächst wurde die Migration von EPDCs bei *coatings* mit verschiedenen Gelatine-Konzentrationen (0,01% und 0,001%) und Fibronectin verglichen. Hierfür wurden die EPDCs in einem Medium (DMEM/5%BSA) gelöst und eine EPDC-Suspension mit 12.000 Zellen/55µl pro Well hergestellt. Dem Medium der unteren Wells wurde 5% FCS beigelegt und die Migration wurde nach 5-6 h Inkubationszeit detektiert (n = 1). In Abbildung 3 ist zu sehen, dass die Migration bei einem *coating* mit 10 µg/ml Fibronectin ($1341,3 \pm 92,9$) deutlich höher war als bei einem *coating* mit Gelatine. Bei einem *coating* mit 0,01% Gelatine ($257,5 \pm 40,7$) war die Migration stärker als bei einem *coating* mit 0,001% Gelatine ($26,3 \pm 12,1$).

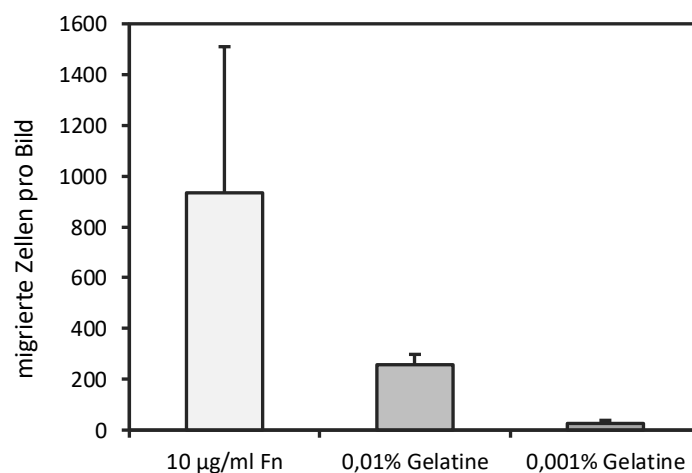


Abbildung 3: Migration von EPDCs in der Migrationskammer bei verschiedenen *coatings* der Membran. Anzahl der migrierten Zellen bei einem *coating* mit Fibronectin (Fn) und Gelatine (0,01%, 0,001%) nach 5 - 6h Inkubationszeit. Es wurden jeweils 12.000 Zellen pro Well ausgesät (12.000 Zellen in 55 µl) und dem Medium der unteren Kammer wurde 5% fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben. Für das *Coating* mit Fn wurden insgesamt 12 Bilder (n = 2) und für das *Coating* mit 0,01% und 0,001% Gelatine jeweils 6 Bilder (n = 1) ausgewertet. Die Zahl der migrierten Zellen ist als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

Nach Myokardinfarkt wird die Expression des matrizellulären Proteins TNC hochreguliert, das unter anderem durch EPDCs sezerniert wird (Hesse et al. 2017). TNC bildet nach MI ein Netzwerk und lagert sich vermehrt an der Infarkt-Grenzzone an. Im Herzen nach MI wurden migrationsfördernde Effekte von TNC auf EPDCs (Hesse et al. 2017) und Fibroblasten beschrieben (Tamaoki et al. 2005). Um zu untersuchen, ob ein *coating* der Membran mit TNC geeignet ist, um die Migration von EPDCs zu beurteilen, wurde ein *coating* mit 10 µg/ml TNC durchgeführt und mit einem *coating* mit 10 µg/ml Fibronectin verglichen. Bei einem *coating* mit TNC ($580,8 \pm 454,6$) migrierten im Vergleich zu einem *coating* mit Fibronectin

($1190,6 \pm 406,9$) weniger EPDCs ($n = 2$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4A für eine ausgesäte Zellzahl von 12.000 Zellen bei Zugabe von 5% FCS in die untere Kammer dargestellt.

Um zu untersuchen, ob die Effekte eines *coatings* mit Fibronectin und TNC additiv sind, wurde ein *coating* mit 5 $\mu\text{g/ml}$ TNC und 5 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin durchgeführt und die Migration von EPDCs untersucht. Hier zeigte sich bei einem *coating* mit einer Mischung aus TNC und Fibronectin ($162,8 \pm 9,7$) eine höhere Migrationsrate im Vergleich zu einem *coating* mit Fibronectin ($77,5 \pm 22,4$) allein. In Abbildung 4B sind die migrierten EPDCs pro Bild für eine ausgesäte Zellzahl von 12.000 Zellen bei Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer nach einer Inkubationszeit von 3 h dargestellt. Das Ergebnis weist daraufhin, dass ein Zusammenspiel der beiden Matrixkomponenten TNC und Fibronectin die Migration der EPDCs fördert.

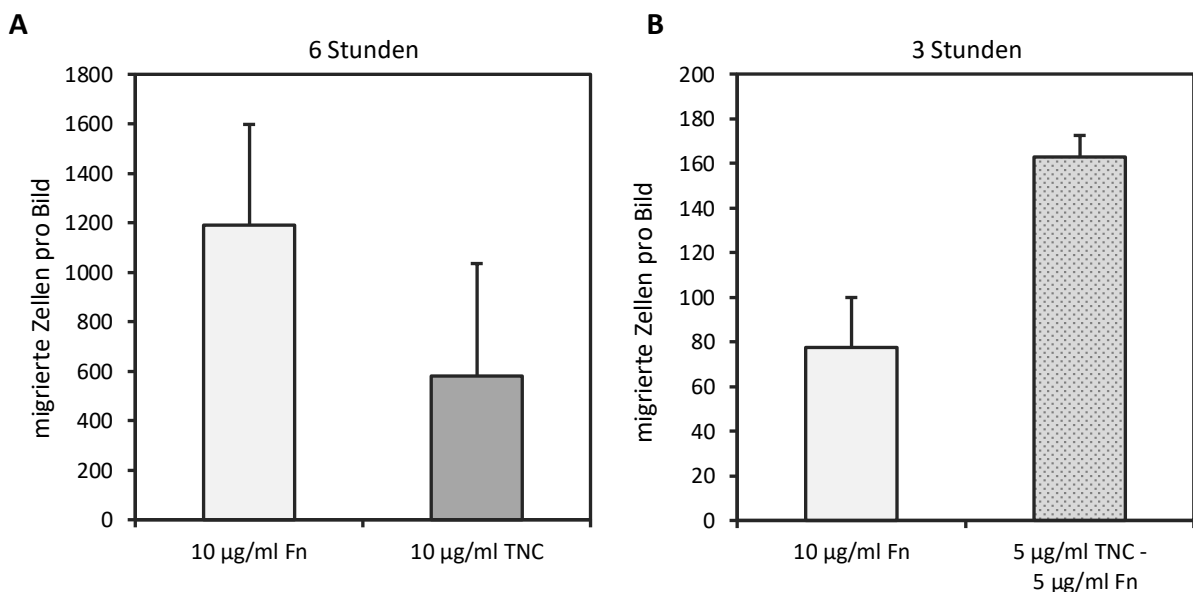


Abbildung 4: Die Migration von EPDCs in der Migrationskammer bei Coatings der Membran mit Fibronectin und Tenascin-C. **A:** Zahl der migrierten EPDCs bei einem Coating der Membran mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin (Fn) im Vergleich zu einem Coating mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Tenascin-C (TNC) ($n = 2$). Dargestellt für eine ausgesäte Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well und Zugabe von 5% fetalem Kälberserum (FCS) in das Medium der unteren Kammer. Die Detektion der Migration erfolgte nach 6 h Inkubationszeit. Für jedes Coating wurden 12 Bilder ausgewertet. **B:** Anzahl der migrierten EPDCs bei einem Coating der Membran mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fn im Vergleich zu einem Coating der Membran mit einer Mischung aus 5 $\mu\text{g/ml}$ TNC und 5 $\mu\text{g/ml}$ Fn ($n = 1$). Es wurden 12.000 Zellen pro Well ausgesät und es erfolgte die Zugabe von 5% FCS in die untere Kammer. Die Detektion der Migration erfolgte nach einer Inkubationszeit von 3 h. Es wurden je Coating 6 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Des Weiteren wurden verschiedene Fibronectin-Konzentrationen (1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml Fibronectin) für das *coating* verwendet (n = 1), um herauszufinden, ob die Fibronectin-Konzentration einen Einfluss auf die Migration von EPDCs hat. Die Migration der EPDCs ist für eine ausgesäte Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well in Abbildung 5 dargestellt. Die Zellen wurden in Serum-freien Medium (Panserin 401) gelöst und dem Serum-freien Medium der unteren Kammer wurde 5% FCS hinzugefügt. Bei einem *coating* mit 1 µg/ml Fibronectin migrierten weniger EPDCs ($13,3 \pm 6,6$) als bei 3 µg/ml Fibronectin ($55,0 \pm 23,3$). Die höchste Migrationsrate zeigte sich bei einem *coating* mit 10 µg/ml Fibronectin ($477,8 \pm 92,6$). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Konzentration des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin einen Einfluss auf die Migration der EPDCs hat.

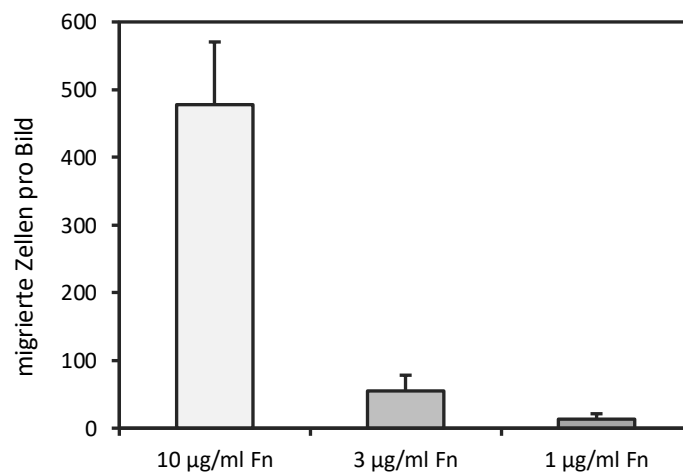


Abbildung 5: Die Migration von EPDCs in der Migrationskammer bei einem coating der Membran mit verschiedenen Fibronectin-Konzentrationen. Anzahl der migrierten EPDCs bei coatings der Membran mit verschiedenen Fibronectin (Fn)-Konzentrationen (10 µg/ml, 3 µg/ml, und 1 µg/ml) (n = 1) nach 5–6h Inkubationszeit. Es wurden jeweils 12.000 Zellen in Serum-freien Medium ausgesät und dem Serum-freien Medium der unteren Kammer wurde 5%iges fetales Kälberserum hinzugefügt. Pro coating wurden 2 Wells à 3 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.2.2 Migration von EPDCs bei verschiedenen Inkubationszeiten und unterschiedlich konzentrierten EPDC-Suspensionen

Neben verschiedenen *coatings* wurde getestet, ob die Konzentration der EPDC-Suspension und die Dauer der Inkubationszeit die Migration von EPDCs beeinflussen. Um eine geeignete Konzentration der Zellsuspension herauszufinden, wurden 3.000, 6.000, 12.000 und 40.000 Zellen pro 55 µl Medium in die Wells der oberen Kammer ausgesät und die Migration nach 3 h und 6 h analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob FCS die Migration steigert. Hierfür wurde ein Konzentrationsgradient von FCS über die Membran aufgebaut, indem 5% FCS dem

Medium der unteren Kammer hinzugegeben wurde. Das *coating* der Membran erfolgte mit 10 µg/ml Fibronectin. Wie in Abbildung 6A dargestellt, konnte nach einer Inkubationszeit von 3 h ohne Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer eine geringe Migration der EPDCs beobachtet werden (n = 2). Hierbei migrierten bei einer ausgesäten Zellzahl von 3.000 ($42,2 \pm 9,6$), 6.000 ($35,2 \pm 4,6$), 12.000 ($41,7 \pm 9,2$) und 40.000 ($34,5 \pm 7,1$) Zellen vergleichbar viele Zellen. Die Zahl der migrierten EPDCs zeigte sich bei einer Inkubationszeit von 3 h unabhängig von der Konzentration der Zellsuspension. Vielmehr stellte sich eine Art *Base-Line* der Migration da.

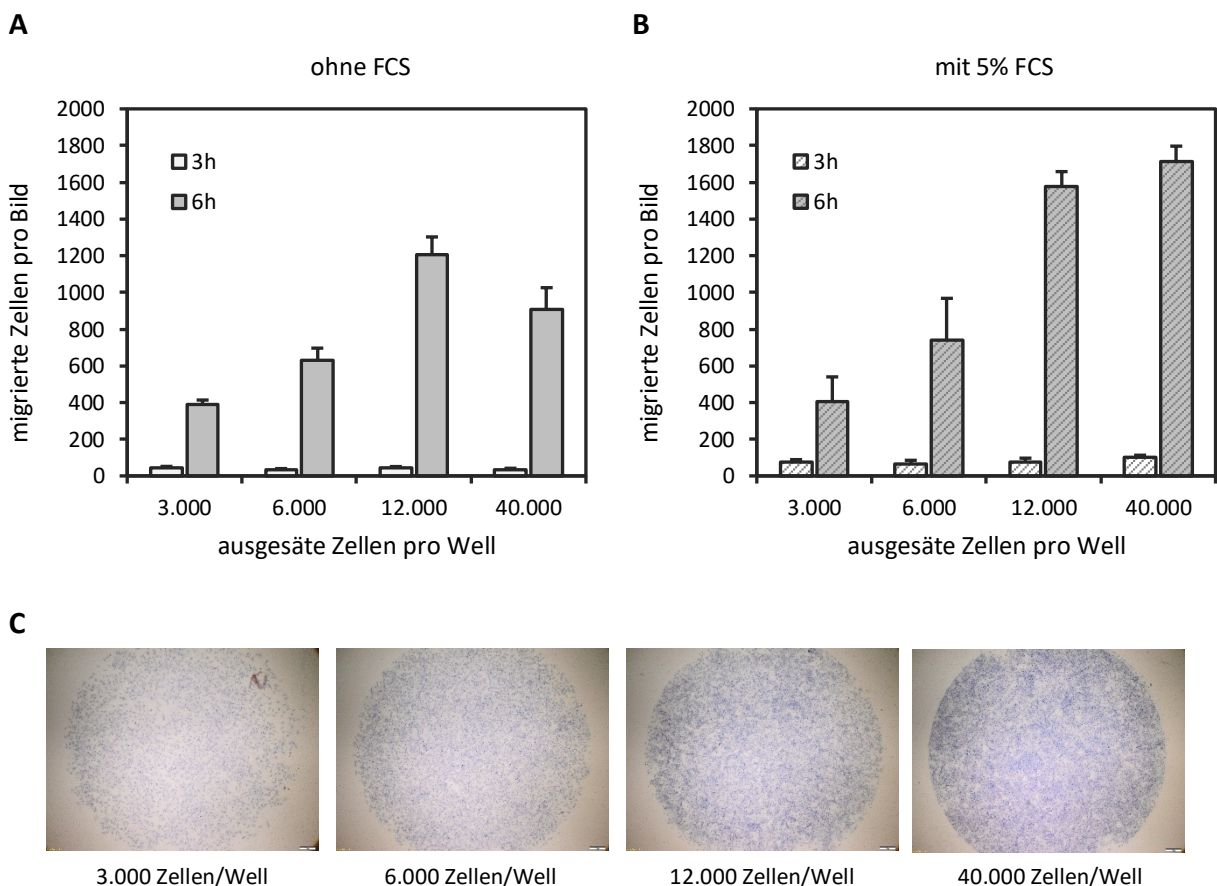


Abbildung 6: Migration von EPDCs in der Migrationskammer bei unterschiedlicher Konzentration der EPDC-Suspension. A+B: Vergleich zwischen der Migration von EPDCs nach 3 h und 6 h Inkubationszeit und Coating der Membran mit 10 µg/ml Fibronectin (n = 2). **A:** Migration von EPDCs ohne Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) in das Medium der unteren Wells. Für jede Konzentration der Zellsuspension wurden bei 3 h und bei 6 h Inkubationszeit jeweils 12 Bilder ausgewertet. **B:** Migration von EPDCs bei Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Wells. Für jede Konzentration der Zellsuspension wurden bei 3 h und bei 6 h Inkubationszeit jeweils 12 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung. **C:** Exemplarische Darstellung der migrierten EPDCs in 4-facher Vergrößerung. Dargestellt ist die Migration von EPDCs bei unterschiedlichen Zellzahlen nach 6 h Inkubationszeit und Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer. Färbung der EPDCs mit Hämatoxylin-Eosin.

Bei Verdopplung der Inkubationszeit auf 6 h ohne Zugabe von 5% FCS zeigte sich eine deutliche Steigerung der Migration bei allen Zellkonzentrationen (Abb. 6A) ($n = 2$). Die größte Zunahme der Migration zeigte sich bei einer ausgesäten Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well ($1203,3 \pm 98,9$). Hier migrierten nach einer Inkubationszeit von 6 h ca. 28-mal mehr Zellen pro Bild als bei einer Inkubationszeit von 3 h. Zudem fiel bei einer Inkubationszeit von 6 h eine unterschiedliche Migrationsrate bei den verschiedenen Konzentrationen der Zellsuspensionen auf. Bei einer ausgesäten Zellzahl von 6.000 Zellen pro Well ($628,3 \pm 67,9$) zeigte sich eine 1,6-fach stärkere Migration als bei einer ausgesäten Zellzahl von 3.000 Zellen pro Well ($387,3 \pm 26,0$). Bei einer ausgesäten Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well ($1203,3 \pm 98,9$) migrierten wiederum 1,9-mal so viele EPDCs wie bei einer ausgesäten Zellzahl von 6.000 Zellen. Bei der maximal getesteten Zell-Konzentration von 40.000 Zellen pro Well zeigte sich hingegen eine etwas verminderte Migration ($904,2 \pm 118,5$) im Vergleich zu einer Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well.

Die Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer als Chemoattraktant steigerte die Zahl der migrierten Zellen (Abb. 6B) im Vergleich zu keiner Zugabe von FCS ($n = 2$) (Abb. 6A) sowohl bei 3 h Inkubationszeit als auch bei 6 h Inkubationszeit. Durch die Zugabe von 5% FCS migrierten bei einer Inkubationszeit von 3 h bei der ausgesäten Zellzahl von 3.000 Zellen pro Well ($75,0 \pm 13,7$), 6.000 Zellen pro Well ($62,7 \pm 22,4$), 12.000 Zellen pro Well ($77,5 \pm 19,2$) und 40.000 Zellen pro Well ($101,5 \pm 11,2$) im Schnitt doppelt so viele EPDCs, wie nach 3 h Inkubationszeit ohne Zugabe von 5% FCS. Es zeigte sich hier ebenfalls kein Einfluss der ausgesäten Zellzahl auf die Zahl der migrierten Zellen. Bei einer Inkubationszeit von 6 h lag die Steigerung der Migration durch die Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer im Schnitt bei 1,3 und damit unter der Steigerung der Migration bei einer Inkubationszeit von 3 h. Bei Zugabe von 5% FCS in das Medium der unteren Kammer konnte bei 6 h Inkubationszeit eine Zunahme der Migration bei steigender Zellkonzentration beobachtet werden.

4.2.3 Einfluss von purinergen Signalwegen auf die Migration von EPDCs

Extrazelluläre purinerge Signalwege modulieren eine Vielzahl an Stoffwechselfvorgängen und Zellfunktionen. ATP und Adenosin dienen als Lockstoffe für Immunzellen und stimulieren die Inflamationsreaktion (Bours et al. 2006; Fredholm 2007). EPDCs exprimieren neben ATP und Adenosin Rezeptoren wichtige Ectoenzyme, die den extrazellulären purinergen Stoffwechsel katalysieren. Um herauszufinden, ob Adenosin und ATP einen Effekt auf die Migration von EPDCs haben, wurden die selektiven Adenosin-Agonisten CGS-21680 (A_{2A}-Rezeptor) und BAY60-65833 (A_{2B}-Rezeptor), die unselektiven Agonisten ATP und BzATP (P_{2X}-Rezeptor-Agonist) und der selektive P_{2Y₂}-Rezeptor-Agonist 2-ThioUTP verwendet.

4.2.3.1 Effekt von ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs

Um den Einfluss von ATP auf die ungerichtete Migration von EPDC zu untersuchen, wurden ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten der EPDC-Suspension zugefügt und nach 6 h die Zahl der migrierten Zellen gezählt. Wie in Abbildung 7 A dargestellt, migrierten bei der Stimulation mit ATP ($145,5 \pm 73,3$) zwar weniger Zellen als in der nicht stimulierten Kontrollgruppe, die Werte erreichen jedoch nicht das Signifikanzniveau. Die Stimulation mit einem ATP-Analogon (BzATP: $182,9 \pm 120,1$) bzw. einem P_{2Y₂}-Rezeptor-Agonisten (2-ThioUTP: $167,5 \pm 117,8$) zeigte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Migration von EPDC.

Um einen möglichen Verdünnungseffekt der ATP-Agonisten durch Diffusion über die Membran zu verhindern, wurden die Agonisten in einem parallelen Versuchsansatz sowohl der EPDC-Suspension (obere Wells) als auch dem Medium der unteren Wells in einer Konzentration von 1 μ M hinzugegeben. Die in Abbildung 7 B dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ATP ($142,2 \pm 107,0$), BzATP ($178,4 \pm 141,1$) und 2-ThioUTP ($165,4 \pm 99,1$) die ungerichtete Migration von EPDCs nicht steigern oder hemmen.

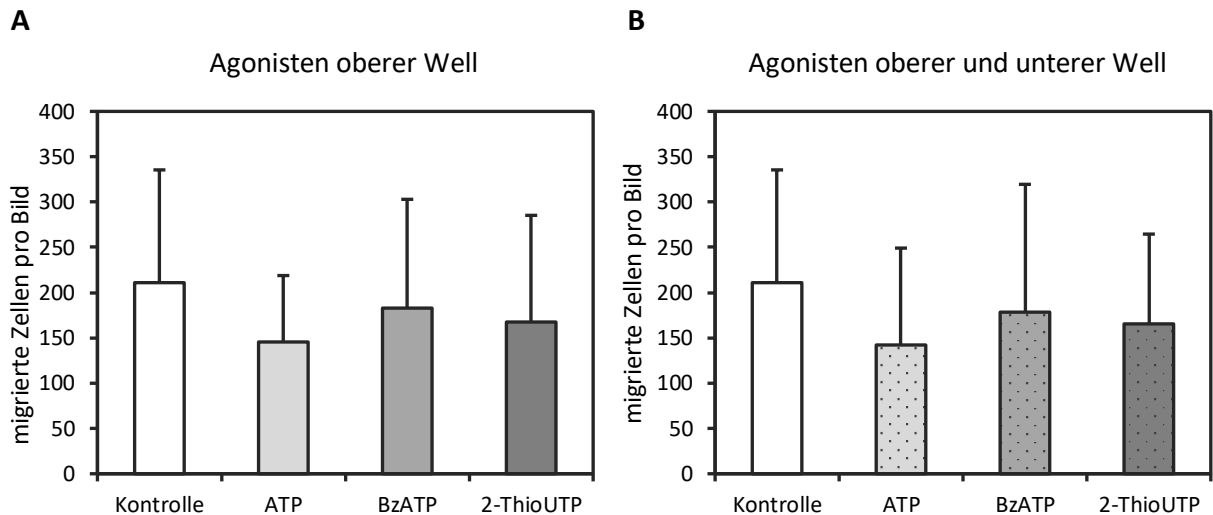


Abbildung 7: Migration von EPDCs in der Migrationskammer bei Stimulation mit ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten. A+B: Migration von EPDCs bei Stimulation mit ATP-Rezeptor Agonisten im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe nach 6 h Inkubationszeit. Das Coating der Membran erfolgte mit 3 µg/ml Fibronectin und pro Well wurden 12.000 Zellen ausgesät, es wurde ein Serum-freies Medium verwendet. **A:** Stimulation der EPDCs durch Zugabe von ATP (1 µM) und den ATP-Agonisten BzATP (1 µM) und 2-ThioUTP (1 µM) zur EPDC-Suspension der oberen Wells (n = 5) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe (n = 8). Für die Zugabe von ATP und 2-ThioUTP erfolgte die Auswertung von 45 Bildern, für die Zugabe von BzATP wurden 42 Bilder ausgewertet. **B:** Zugabe von ATP (1 µM) und ATP-Agonisten BzATP (1 µM) und 2-ThioUTP (1 µM) zur EPDC-Suspension in das Medium der oberen und unteren Kammer (n = 3) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe (n = 8). Für die Zugabe von ATP wurden insgesamt 27 Bilder, für die Zugabe von BzATP 21 Bilder und für die Zugabe von 2-ThioUTP 24 Bilder ausgewertet. Für die Kontrollgruppe wurden insgesamt 108 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ±Standardabweichung.

Die chemotaktische Wirkung von ATP-Agonisten auf EPDCs wurde durch Zugabe der Agonisten in das Medium der unteren Wells in zwei verschiedenen Konzentrationen getestet. Hierfür wurden dem Medium der unteren Kammer jeweils 1 µM und 10 µM der ATP-Agonisten hinzugefügt. Die Agonisten ATP ($176,8 \pm 77,0$), BzATP ($207,2 \pm 105,3$) und 2-ThioUTP ($226,1 \pm 108,5$) bewirkten in 1 µmolarer Konzentration keine signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 8). Bei einer höheren Konzentration (10 µM) der ATP-Rezeptor-Agonisten kam es zu einer leichten Zunahme der Migration von EPDCs (ATP: $271,3 \pm 74,2$; BzATP: $285,5 \pm 103,6$; 2-ThioUTP: $253,3 \pm 84,3$), das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten in den hier verwendeten Konzentrationen keine chemotaktische Wirkung auf EPDCs haben.

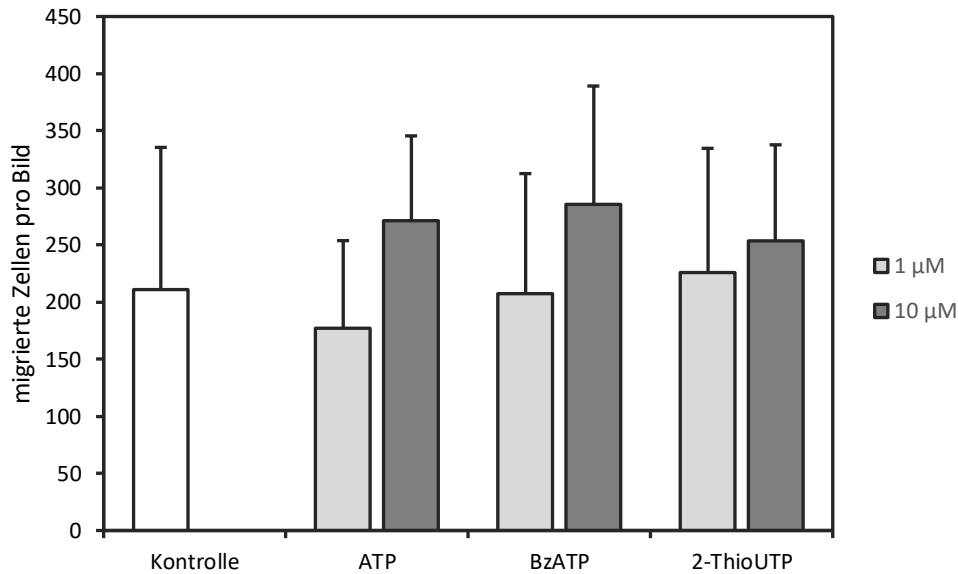


Abbildung 8: Chemotaktische Wirkung von ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten auf EPDCs in der Migrationskammer. Gerichtete Migration von EPDCs zu ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten verschiedener Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zugabe von Agonisten. Es wurde eine Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well ausgesät und das Coating erfolgte mit 3 µg/ml Fibronectin. Es wurde ein Serum-freies Medium verwendet und die Migration der EPDCs wurde nach 6 h Inkubationszeit ausgewertet. Zugabe von 1 µM ATP, 1 µM BzATP und 1 µM 2-ThioUTP in das Medium der unteren Kammer (n = 8) im Vergleich zur Zugabe von 10 µM ATP, 10 µM BzATP und 10 µM 2-ThioUTP in das Medium der unteren Kammer (n = 3) und der Kontrollgruppe (n = 8). Es wurden für ATP (1 µM) 72 Bilder, für ATP (10 µM) 27 Bilder, für BzATP (1 µM) 66 Bilder, für BzATP (10 µM) 27 Bilder, für 2-ThioUTP (1 µM) 69 Bilder und für 2-ThioUTP (10 µM) 27 Bilder ausgewertet. Für die Kontrollgruppe wurden insgesamt 108 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.2.3.2 Wirkung von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs

Um herauszufinden, ob Adenosin einen Einfluss auf die ungerichtete Migration von EPDCs hat, wurden die EPDCs mit den spezifischen Adenosin-Rezeptor Agonisten CGS-21680 (A2A-Rezeptor) und BAY 60-6583 (A2B-Rezeptor) stimuliert. Die Agonisten wurden in verschiedenen Konzentrationen (1 µM und 10 µM) der EPDCs-Suspension hinzugefügt und nach 6 h wurde die Migration detektiert (Protokollbeschreibung Kap.3.6.2). Wie in Abbildung 9 dargestellt, führte die Stimulation des A2A-Rezeptors mit 1 µM CGS-21680 ($259,2 \pm 63,3$) lediglich zu einer leichten Steigerung der Migration im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe ($210,9 \pm 124,5$), das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Die Stimulation des A2B-Rezeptors mit 1 µM BAY 60-6583 ($194,0 \pm 127,6$) bewirkte keine Veränderung der Migration. Die Stimulation der EPDCs mit höherer Konzentration der Agonisten (10 µM) zeigte weder bei der Stimulation mit dem A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 (10 µM: $203,4 \pm 35,5$) noch bei der Stimulation mit dem A2B-Rezeptor-Agonisten BAY 60-6583 (10 µM A2B: $196,2 \pm 74,3$) eine signifikante Veränderung der Migration.

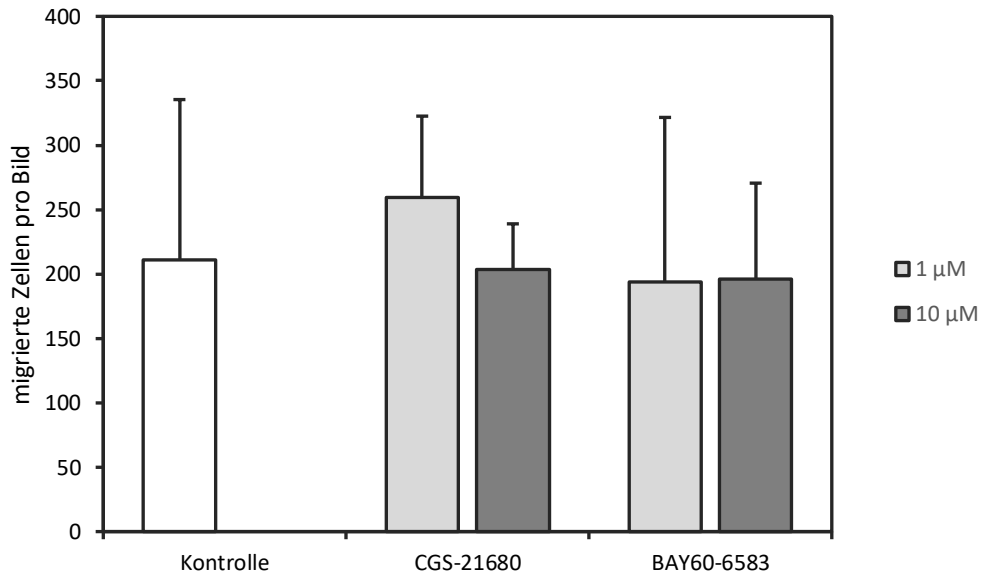


Abbildung 9: Migration von EPDCs bei Stimulation mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten in der Migrationskammer. Stimulation von EPDCs mit Adenosin-Agonisten in verschiedenen Konzentrationen im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe nach 6 h Inkubationszeit. Das Coating der Membran erfolgte mit 3 µg/ml Fibronektin und pro Well wurden 12.000 Zellen ausgesät. Es wurde ein Serum-freies Medium verwendet. Stimulation der EPDCs mit 1 µM (n = 8) und 10 µM (n = 3) CGS-21680, sowie 1 µM (n = 8) und 10 µM (n = 3) BAY60-6583 im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe (n = 8). Es wurden für die Stimulation mit 1 µM Adenosin-Agonisten jeweils 66 Bilder und für die Stimulation mit 10 µM Adenosin-Agonisten jeweils 27 Bilder ausgewertet. Für die Kontrollgruppe wurden 108 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Um herauszufinden, ob Agonisten der Adenosin-Rezeptoren eine chemotaktische Wirkung auf EPDCs haben, wurden die Adenosin-Agonisten in einer Konzentration von 1 µM und 10 µM dem Medium der unteren Wells zugefügt und die Migration nach 6 h detektiert. Wie in Abbildung 10 dargestellt, ließ sich keine signifikante Veränderung der Migration von EPDCs zu den 1 µM A2A- und A2B-Rezeptor-Agonisten beobachten (1 µM CGS-21680: $238,4 \pm 134,9$; 1 µM BAY 60-6583: $214,0 \pm 149,6$). Eine höhere Konzentration der Adenosin-Agonisten (10 µM) führte im Vergleich zu der 1 µM Agonisten-Konzentration und der Kontrollgruppe ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der Migration von EPDCs (10 µM CGS-21680: $207,6 \pm 32,5$; 10 µM BAY 60-6583: $242,7 \pm 88,3$). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Adenosin-Rezeptor-Agonisten keine chemotaktische Wirkung auf EPDCs haben.

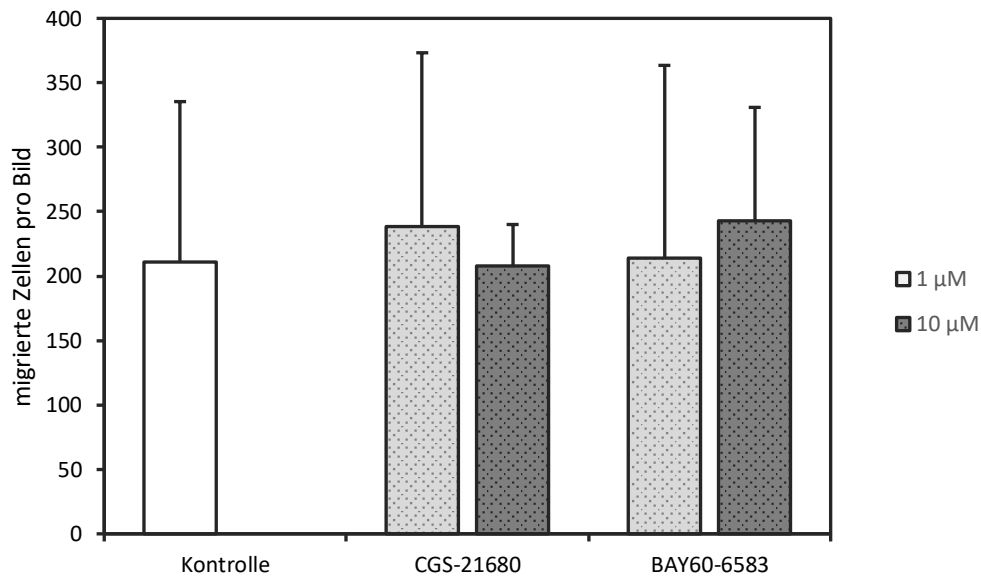


Abbildung 10: Chemotaktische Wirkung von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf EPDCs in der Migrationskammer. Gerichtete Migration von EPDCs bei Zugabe von Adenosin-Rezeptor-Agonisten verschiedener Konzentrationen in das Medium der unteren Kammer im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Zugabe von Agonisten. Es wurde eine Zellzahl von 12.000 Zellen pro Well ausgesät, das Coating erfolgte mit 3 µg/ml Fibronektin. Es wurde ein Serum-freies Medium verwendet und die Migration der EPDCs wurde nach 6 h Inkubationszeit ausgewertet. Zugabe von 1 µM (n = 8) und 10 µM (n = 3) CGS-21680, sowie 1 µM (n = 8) und 10 µM (n = 3) BAY60-6583 in das Medium der unteren Kammer (n = 8) im Vergleich zur Kontrollgruppe (n = 8) ohne Zugabe von Agonisten. Es wurden für die Zugabe von 1 µM CGS-21680 60 Bilder, für die Zugabe von 1 µM BAY60-6583 66 Bilder und für die Zugabe von 10 µM Adenosin-Agonisten jeweils 27 Bilder ausgewertet. Für die Kontrollgruppe wurden 108 Bilder ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.3 Einfluss von purinergen Signalwegen auf die Expression von Zytokinen in EPDCs

Extrazelluläre purinerge Signale beeinflussen über Aktivierung der verschiedenen ATP- und Adenosin-Rezeptoren nach MI die Inflamationsreaktion und das kardiale Remodelling. Unter anderem modulieren ATP und Adenosin die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, sowie die Bildung von Wachstumsfaktoren (Abbraccio und Burnstock 1998). Nach MI gebildete EPDCs sezernieren eine Reihe von parakrinen Faktoren, welche die Angiogenese und kardiale Regeneration beeinflussen (Zhou et al. 2008). Um herauszufinden, ob ATP- und Adenosin-Rezeptoren einen Einfluss auf die Genexpression von IL-6, IL-11 und IL-12a in EPDCs haben, wurde nach einer Stimulation der Zellen mit dem P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP, dem P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-Thio-UTP, dem A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 und dem A2B-Rezeptor-Agonisten BAY 60-6583 RNA isoliert, in cDNA transkribiert und eine quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) durchgeführt.

4.3.1 Effekte von ATP-Rezeptor-Agonisten auf die Expression von Zytokinen

Um herauszufinden, ob ATP-Rezeptoren bei der Expression von Zytokinen in kultivierten EPDCs eine Rolle spielen, wurde die mRNA-Expression von IL-6, IL-11 und die Expression der IL-12-Untereinheit p35 6 h nach Aktivierung von ATP-Rezeptoren mit BzATP (100 μ M) und 2-ThioUTP (2 μ M) analysiert (n = 4). Die mRNA-Expression wird als Faktor der Steigerung zwischen der stimulierten Gruppe und der unstimulierten Kontrollgruppe angegeben. Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen, dass eine Stimulation mit BzATP im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrollgruppe die Expression des Zytokins IL-6 in EPDCs signifikant steigerte ($4,7 \pm 2,1$; $p < 0,05$) (Abb. 11). Ein signifikanter Einfluss auf die Expression von IL-11 konnte nach Stimulation der EPDCs mit BzATP nicht beobachtet werden ($1,7 \pm 0,6$; $p > 0,05$). Wie in Abbildung 11 dargestellt, zeigte BzATP einen hemmenden Effekt auf die Expression der Untereinheit p35 des IL-12 ($0,4 \pm 0,1$; $p < 0,001$). Die Stimulation der EPDCs mit dem spezi-fischen P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP beeinflusste weder die Expression von IL-6 ($0,9 \pm 0,1$; $p > 0,05$), noch die Expression von IL-11 ($1,2 \pm 0,2$; $p > 0,05$) (Abb. 11). Die Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors führte jedoch zu einer Hemmung der Expression der IL-12-Untereinheit p35 ($0,8 \pm 0,04$; $p < 0,01$) (Abb. 11).

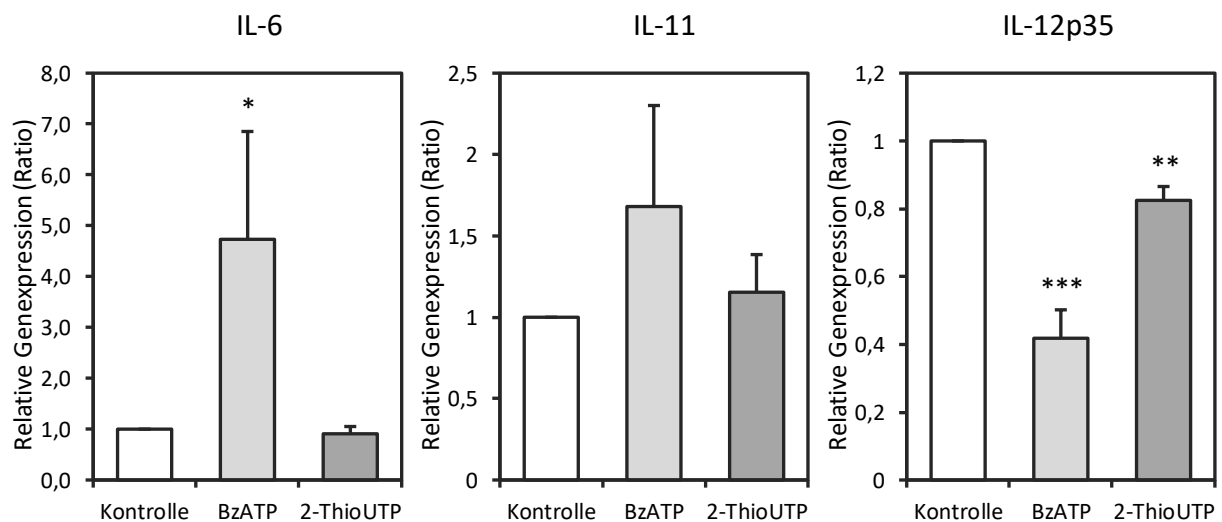


Abbildung 11: Zytokin-Expression von EPDCs nach Stimulation mit ATP-Rezeptor-Agonisten. Stimulation von EPDCs mit 100 μ M BzATP und Stimulation mit 2 μ M 2-ThioUTP für 6 h und Analyse der mRNA-Expression von IL-6, IL-11 und IL-12p35 mittels quantitativer-Real-Time-PCR. Relation der mRNA-Expression von stimulierten EPDCs zur mRNA-Expression der unstimulierten Kontrollgruppe (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. T-Test: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

4.3.2. Effekte von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Expression von Zytokinen

Um den Einfluss von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Expression von IL-6, IL-11 und der IL-12-Untereinheit p35 zu untersuchen, wurden die kultivierten EPDCs für 6 h mit dem spezifischen A2A-Rezeptor-Agonist CGS-21680 (1 μ M) und dem spezifischen A2B-Rezeptor-Agonisten BAY 60-6583 (25 μ M) stimuliert (n = 4). Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigen eine deutliche Steigerung der relativen Genexpression von IL-6 ($23,3 \pm 2,5$; $p < 0,001$) und IL-11 ($3,6 \pm 1,3$; $p < 0,05$) bei Aktivierung des A2B-Rezeptors im Verhältnis zur unstimulierten Kontrollgruppe (Abb. 12). Darüber hinaus wurde, wie in Abbildung 11 dargestellt, die relative Expression der IL-12 Untereinheit p35 durch den A2B-Rezeptor-Agonisten im Vergleich zur Kontrollgruppe gehemmt ($0,3 \pm 0,02$; $p < 0,001$). Die Aktivierung des A2A-Rezeptors zeigte hingegen weder einen signifikanten Einfluss auf die Expression von IL-6 ($1,1 \pm 0,1$; $p > 0,05$) und IL-11 ($1,1 \pm 0,3$; $p > 0,05$) noch auf die Expression der IL-12-Untereinheit p35 ($0,9 \pm 0,1$; $p > 0,05$) (Abb. 12).

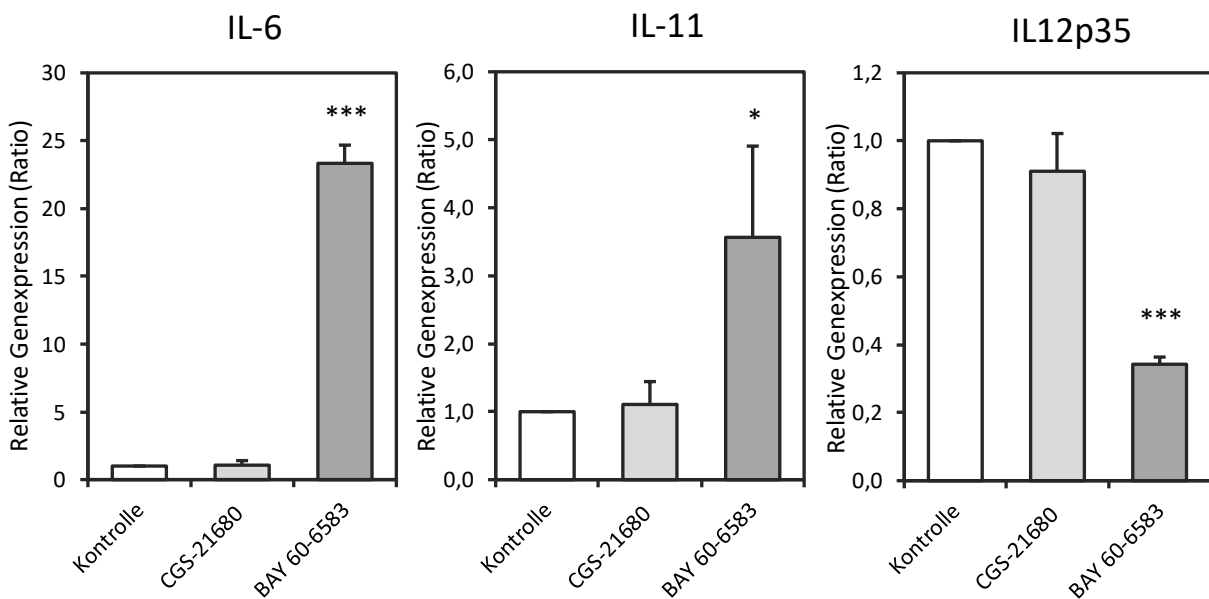


Abbildung 12: Zytokin-Expression von EPDCs nach Stimulation mit Adenosin-Rezeptor-Agonisten. Stimulation von EPDCs mit dem A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 (1 μ M) und dem A2B-Rezeptor-Agonisten BAY 60-6583 (25 μ M) für 6 h und Analyse der mRNA-Expression von IL-6, IL-11 und IL-12p35 mittels quantitativer Real-Time-PCR. Relation der mRNA-Expression von stimulierten EPDCs zur mRNA-Expression der unstimulierten Kontrollgruppe (n = 4). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. T-Test: * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

5 Diskussion

Der MI und seine Folgeerkrankungen sind eine der häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (World Health Organization 2017, 2019). Aufgrund der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit des Herzens kommt es zu ungünstigen Umbauprozessen mit Fibrose und Narbenbildung (Bergmann et al. 2009; Kennedy-Lydon und Rosenthal 2015), woraus schwere Folgeerkrankungen resultieren (Pfeffer und Braunwald 1990; Kennedy-Lydon und Rosenthal 2015). Ziel aktueller Forschung ist es, die Regenerationsfähigkeit des Myokards nach Infarkt zu optimieren. Einen wichtigen Ansatzpunkt stellen hierbei EPDCs dar (van Wijk et al. 2012), die nach Infarkt durch Reaktivierung des Epikards durch epitheliale-mesenchymale Transition gebildet werden (van Wijk et al. 2012; Duan et al. 2012). Als multipotente Progenitorzellen haben EPDCs das Potenzial, in verschiedene Zellen, wie Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und zu einem geringen Teil in Kardiomyozyten zu differenzieren (Zhou et al. 2011; van Wijk et al. 2012). Einen wichtigen Einfluss auf die biologische Aktivität von EPDCs könnten die extrazellulären purinergen Signalmoleküle ATP und Adenosin haben, welche durch die Gewebeschädigung beim MI vermehrt freigesetzt werden (Kunugi et al. 2011; Boros et al. 2015). Neben einer Reihe von ATP- und Adenosin-Rezeptoren exprimieren EPDCs Ectoenzyme, die den Abbau der extrazellulären Nukleotide und Nukleoside katalysieren (Hesse et al. 2017) (vgl. Kap 1.5). Insgesamt zeigen frühere Forschungen, dass EPDCs und purinerge Signale nach MI eine wichtige Rolle bei der sterilen Inflammationsreaktion und der kardialen Wundheilung spielen (Bax et al. 2011; Zhou et al. 2011; Bollini et al. 2014; Burnstock und Pelleg 2015; Hesse et al. 2017).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von extrazellulären purinergen Signalwegen über ATP- und Adenosin-Rezeptoren auf die Proliferation, die Migration und Zytokinexpression von EPDCs *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der EPDCs mit ATP-Rezeptor-Agonisten oder selektiven Adenosin-Rezeptor-Agonisten keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation und die Migration von EPDCs hat. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein Einfluss von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Expression der Zytokine IL-6, IL-11 und IL-12a. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass purinerge Signale über Adenosin- oder ATP-Rezeptoren zwar keinen Einfluss auf die Proliferation und Migration von EPDCs haben, jedoch an der Regulation der Zytokinexpression beteiligt sind. Nachfolgend werden die Ergebnisse und die in dieser Arbeit verwendeten Methoden kritisch diskutiert.

5.1 Einfluss von purinergen Signalen auf die Proliferation von EPDCs nach MI

Die purinen Signalmoleküle ATP und Adenosin, die Ischämie-bedingt vermehrt freigesetzt werden, sind wichtige Regulatoren der kardialen Wundheilung (Bours et al. 2006; Bax et al. 2011; Ferrari et al. 2016b). Wie in der Einleitung beschrieben, unterstützen Nukleotide und Nucleoside die sterile Inflammationsreaktion, die Angiogenese, die Proliferation und die Gewebereparatur (Willems et al. 2005; Bours et al. 2006; Fredholm 2007; Burnstock und Pelleg 2015; Burnstock 2017; Ferrari et al. 2016b). In der proliferativen Phase der Wundheilung ist die Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten sowie die Sekretion von ECM für die Bildung eines Granulationsgewebes essenziell (Prabhu und Frangogiannis 2016). Die Purine ATP und Adenosin vermitteln wichtige zum Teil gegensätzliche Effekte auf die Proliferation (Ferrari et al. 2016b).

5.1.1 Wirkung von ATP auf die Proliferation von EPDCs

Nach MI ist ATP ein wichtiger Modulator der proliferativen Phase der Wundheilung und unterstützt über pro-fibrotische Effekte die Gewebereparatur durch Stimulation der Zellproliferation und Sekretion von ECM (Lu und Insel 2014; Ferrari et al. 2016a). Bei kardialen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der Proliferation durch ATP über die Aktivierung von P2X-Rezeptoren (P2X₄- und P2X₇-Rezeptor), sowie über den P2Y₂-Rezeptor vermittelt wird (Lu und Insel 2014; Chen et al. 2012). Interessanterweise werden in der Literatur neben proliferationsfördernden Effekten auch hemmende Effekt von ATP auf die Proliferation beschrieben (Lertsuwan und Ruchirawat 2017). Beispielsweise hemmt ATP die Proliferation von Cholangiozyten und Cholangiokarzinomzellen der Leber (Lertsuwan und Ruchirawat 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, ob ATP einen Effekt auf die Proliferation von EPDCs *in vitro* besitzt und somit *in vivo* bei der Proliferation von EPDCs eine wichtige Rolle spielen könnte. Um die Proliferation von EPDCs zu untersuchen, wurde ein BrdU-Proliferations-Assay verwendet und die EPDCs mit ATP, dem P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP und dem selektiven P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP behandelt. Ein Effekt von ATP-Agonisten auf die Proliferation von EPDCs konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 2A), was darauf hindeutet, dass extrazelluläres ATP bei der Regulation der Proliferation von EPDC *in vivo* keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

5.1.2 Wirkung von Adenosin auf die Proliferation von EPDCs

Im Gegensatz zu den pro-fibrotischen Effekten von ATP am Herzen (Bönner et al. 2013; Ferrari et al. 2016a), wird die Wirkung von Adenosin kontrovers diskutiert. Neben anti-fibrotischen Effekten durch Hemmung der kardialen Fibroblastenproliferation und Verminderung der Kollagensynthese (Chen et al. 2004; Sassi et al. 2014) können auch pro-fibrotische Effekte von Adenosin beobachtet werden (Zhong et al. 2011; Maas et al. 2008). Bei kardialen Fibroblasten hemmt Adenosin zum einen durch Aktivierung des A2A-Rezeptors cAMP-vermittelt die Proliferation (Chen et al. 2004; Sassi et al. 2014). Zum anderen führt die Aktivierung des A2B-Rezeptors auf kardialen Fibroblasten zu einer Hemmung der Endothelin-1 induzierten Proliferation (Dubey et al. 1997; Phosri et al. 2017). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals untersucht, welchen Einfluss Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Proliferation von EPDCs haben. Die Proliferation wurde mit dem BrdU-Proliferationsassay quantifiziert, und der Einfluss von Adenosin auf die Proliferation von EPDCs wurde durch Behandlung der Zellen mit dem selektiven A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 und dem selektiven A2B-Rezeptor-Agonisten BAY60-6583 getestet. Es konnte weder durch Aktivierung des A2A-Rezeptors noch durch Aktivierung des A2B-Rezeptors eine signifikante Veränderung der Proliferation beobachtet werden (Abb. 2B). Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass extrazelluläres Adenosin *in vivo* keine bedeutsame Rolle bei der Proliferation von EPDCs spielen könnte.

5.2 Einfluss extrazellulärer Matrix auf die Migration von EPDCs

In der Literatur wird die Migration adulter EPDCs nach MI in das geschädigte Myokard kontrovers diskutiert (Gittenberger-De Groot et al. 2010; Zhou et al. 2011). Zhou et al. (2012) können keine Migration von EPDCs nach MI beobachten, während in anderen Studien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Migration von EPDCs gezeigt werden konnte (Limana et al. 2007; Gittenberger-De Groot et al. 2010; Ding et al. 2016; Hesse et al. 2017). Um das Migrationsverhalten der EPDCs *in vitro* zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Migrationskammer von Neuro Probe verwendet. Die Migrationskammer ist nach dem Prinzip der Boyden-Kammer aufgebaut: Sie besteht aus zwei mit Medium gefüllten Kammern, die durch eine porenbesetzte Membran voneinander getrennt werden, welche die Zellen, die in der oberen Kammer ausgesät werden, durch aktive Migration überwinden können (Chen 2005; Falasca et al. 2011).

Damit in der vorliegenden Arbeit eine Migration der EPDCs durch die 8 μm großen Poren der Membran beobachtet werden konnte, war ein *coating* (Beschichtung) der Membran mit ECM-Komponenten notwendig, welches den Zellen ein Anheften an der Membran ermöglicht und die Migration erleichtert (siehe Kap. 3.6.1; Grant et al. 2001; Chen 2005; Falasca et al. 2011). Um ein geeignetes *coating* für die Migration von EPDCs zu etablieren, wurden für diese Arbeit verschiedene *coating's* mit Fibronectin, Gelatine und TNC getestet. Letzteres wird unter pathologischen Bedingungen, wie dem MI hochreguliert, und überwiegend von interstitiellen Fibroblasten und EPDCs sezerniert (Imanaka-Yoshida et al. 2001; Prabhu und Frangogiannis 2016; Hesse et al. 2017; Ding et al. 2018). Die stärkste Migration der EPDCs zeigte sich bei einem *coating* mit Fibronectin (Abb 3), wobei die Migration mit zunehmender Fibronektinkonzentration anstieg (Abb. 5). Während bei einem *coating* mit TNC eine geringere Migration der EPDCs zu beobachten war als bei einem Fibronectin-*coating*, zeigten vorläufige Daten bei Zugabe von TNC zu Fibronectin eine Steigerung der Migration. Dies könnte durch Interaktionseffekte von TNC und Fibronectin, die zu einer verminderten Zelladhäsion und somit vermehrten Zellmigration führen können (Huang et al. 2001), bedingt sein. Des Weiteren zeigte TNC eine steigernde Wirkung auf die Migration von EPDCs in einem Migrationsassay mit Zellkultureinsätzen im 24-Well-Format (Millipore QCM Chemotaxis Cell Migration Assay) (Hesse et al. 2017). TNC, das sich in der Grenzzone zum Infarkt anlagert (Imanaka-Yoshida 2012), scheint die Migration von Fibroblasten und anderen reparierenden Zellen in das betroffene Myokardgewebe zu erleichtern (Kong et al. 2014). Weitere Versuche sind notwendig, um den Einfluss von TNC und Fibronectin als ECM-Proteine auf die Migration von EPDCs *in vivo* zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurde für die Migrationsversuche mit ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten ein *coating* mit Fibronectin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gewählt, bei dem eine mittlere Migration zu beobachten war (Abb. 5). Es ist zu beachten, dass die Verwendung eines *coatings* durch die Interaktion der ECM-Komponenten mit Membranproteinen, wie z.B. Integrinen, neben dem Einfluss auf die Migration, Einfluss auf die Zellaktivität, Zelladhäsion und Proliferation haben kann (Falasca et al. 2011). Zudem beschrieben Zantl und Horn (2011), dass neben dem *coating* die verwendete Konzentration der Zellsuspension und die Inkubationszeit die Migration beeinflussen kann (Zantl und Horn 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte nach einer Inkubationszeit von 6 h eine deutlich stärkere Migration von EPDCs beobachtet werden als nach einer Inkubationszeit von 3 h (Abb. 6). Um mögliche Effekte von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs zu untersuchen, wurde für die Migrationsversuche mit ATP- und

Adenosin-Rezeptor-Agonisten daher eine Inkubationszeit von 6 h und eine Konzentration der Zellsuspension mit 12.000 Zellen pro 55 μ l gewählt.

5.3 Einfluss von purinergen Signalen auf die Migration von EPDCs nach MI

Besonders in der inflammatorischen Phase der Wundheilung nach MI kommt es zum Einwandern von Immun- und Nicht-Immunzellen in das geschädigte Myokard, die das geschädigte Areal von Überresten untergegangener Zellen reinigen (Cronstein 2011; Prabhu und Frangogiannis 2016; Ferrari et al. 2016a). Die Purine ATP und Adenosin spielen bei der Regulation der Migration sowohl von Immunzellen als auch Nicht-Immunzellen eine wichtige Rolle (Ferrari et al. 2016a). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Effekte ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Migration von EPDCs besitzen. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

5.3.1 Chemotaktische Wirkung von ATP auf EPDCs

Das Nukleotid ATP, das bei Gewebeschädigung, Zellstress und mechanischem Stress in den extrazellulären Raum freigesetzt wird (Lazarowski et al. 2003; Ferrari et al. 2016a), steigert als *damage associated pattern* die inflammatorische Antwort (Martínez-Ramírez et al. 2017). Der ATP-Anstieg scheint zusammen mit anderen Mediatoren eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen in das geschädigte Gewebe zu spielen (Myrtek und Idzko 2007). An verschiedenen Zelltypen, wie Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, Monozyten; Elliott et al. 2009; Müller et al. 2017) und Nicht-Immunzellen (Fibroblasten) (Müller et al. 2017), wurde ATP als chemotaktisch aktiv beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob ATP eine chemotaktische Wirkung auf EPDCs *in vitro* besitzt und somit möglicherweise *in vivo* als Signal zur Migration ins Gewebe dienen kann. Die Chemotaxis wurde mit der Migrationskammer von Neuro Probe untersucht, die nach dem Prinzip der Boydenkammer aufgebaut ist. Über eine semipermeable Membran wurde ein Konzentrationsgradient von ATP und ATP-Rezeptor-Agonisten aufgebaut und die Migration der EPDCs zu den jeweiligen Agonisten gemessen (siehe Kap. 3.6.2). Für die Versuche wurde der selektive P2Y₂-Rezeptor-Agonist 2-ThioUTP verwendet, da der P2Y₂-Rezeptor stark von EPDCs exprimiert wird (Hesse et al. 2017) und der P2Y₂-Rezeptor mit der Chemotaxis von pulmonalen Fibroblasten und Monozyten assoziiert ist (Elliott et al. 2009; Müller et al. 2017).

Des Weiteren wurden ATP und der P2X-Rezeptor-Agonist BzATP als Chemoattractants für EPDCs getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass weder ATP, BzATP, noch der P2Y₂-Rezeptor-Agonist 2-ThioUTP eine chemotaktische Wirkung auf EPDCs haben. Lediglich bei einer Erhöhung der Konzentration von 1 µM auf 10 µM der selektiven und nicht-selektiven ATP-Rezeptor-Agonisten konnte eine leichte Steigerung der Migration beobachtet werden, die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte (Abb. 8).

5.3.2 Stimulation der Migration durch ATP

Neben einer chemotaktischen Wirkung von ATP konnte für einige Immunzellen eine Zunahme der ungerichteten Migration durch ATP beobachtet werden (Ravichandran 2010; Kronlage et al. 2010; Isfort et al. 2011; Corriden und Insel 2012). Zudem steigert ATP die Migration diverser Zellen, wie glatter endothelialer Muskelzellen (Yu et al. 2008), Gliazellen (Bernascone et al. 2010) und kardialer Fibroblasten (Braun et al. 2010; Chen et al. 2012). Chen et al. (2012) identifizieren bei kardialen Fibroblasten die P2X₄- P2X₇- und P2Y₂-Rezeptoren als relevante Rezeptoren. EPDCs exprimieren ebenfalls den ionotropen P2X₄-Rezeptor und P2X₇-Rezeptor sowie den metabotropen P2Y₂-Rezeptor (Hesse et al. 2017). Daher wurde in dieser Arbeit erstmals untersucht, ob ATP ein Stimulus für die Migration von EPDCs *in vitro* darstellt und somit möglicherweise die Migration von EPDCs *in vivo* orchestriert. Hierfür wurde, wie bei den Versuchen zur chemotaktischen Wirkung von ATP, der Transwellmigrationsassay von NeuroProbe verwendet. Dabei wurde die Migration von EPDCs nach Zugabe von ATP, dem unselektiven P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP und dem selektiven P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP zur Zellsuspension untersucht. Die Ergebnisse zeigen bei den unselektiven und selektiven ATP-Rezeptor-Agonisten weder eine Zunahme noch eine Hemmung der Migration im Vergleich zu den unstimulierten EPDCs (Abb. 7A). Es ist denkbar, dass eine Diffusion der Agonisten über die Membran nach einiger Zeit erfolgt, sodass es zu einem ungewollten Verdünnungseffekt kommen kann. Daher wurde zusätzlich die Migration bei Zugabe der Agonisten zur Zellsuspension und zum Medium in der unteren Kammer untersucht. Hierbei konnte ebenfalls kein stimulierender oder inhibitorischer Effekt auf die Migration der EPDCs beobachtet werden (Abb. 7B).

Insgesamt deuten die Ergebnisse nicht darauf hin, dass nach MI freigesetztes ATP *in vivo* als Chemoattractant für EPDCs fungieren könnte, auch ist ATP *in vivo* wahrscheinlich kein wichtiger Faktor, der die Migration der EPDCs beeinflusst.

5.3.3 Chemotaktische Wirkung von Adenosin auf EPDCs

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kap. 1.4.3) ist der Abbau des pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen ATPs durch Ectoenzyme, wie CD73, essenziell, um die Immunantwort zu regulieren (Bönner et al. 2013). Die CD73-abhängige Bereitstellung von Adenosin bewirkt beim Infarkt des Herzens unter anderem einen Schutz des Myokards (Eckle et al. 2007). Die Aktivierung der Adenosin-Rezeptoren A2A und A2B beeinflusst die Funktion von Immunzellen, indem beispielsweise die Migration und Chemotaxis der Zellen gehemmt wird (Wakai et al. 2001; van der Hoeven et al. 2008; Säve et al. 2011; Gessi et al. 2011; Wang und Chen 2018). Bei Nicht-Immunzellen, wie endothelialen Zellen, wird hingegen eine chemotaktische Wirkung von Adenosin beobachtet (Grant et al. 2001; Fernandez et al. 2012). Im Gegensatz dazu detektierten Mohamadnejad et al. (2010) bei mesenchymalen Stammzellen keine chemotaktische Wirkung von Adenosin. Untersuchung zur chemotaktischen Wirkung von Adenosin bei kardialen Zellen, z.B. kardialen Fibroblasten, sind aktuell nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde die chemotaktische Wirkung von Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf EPDCs untersucht. Hierfür wurde der Transwellmigrationsassay von Neuro Probe genutzt und über eine semipermeable Membran ein Konzentrationsgradient des selektiven A2A-Rezeptor-Agonisten CGS-21680 und des selektiven A2B-Rezeptor-Agonisten BAY60-65833 aufgebaut. Die Agonisten wurde in den Konzentrationen 1 μ M und 10 μ M verwendet. Die Ergebnisse zeigten weder eine chemotaktische Wirkung des A2A-Rezeptor-Agonist, noch des A2B-Rezeptor-Agonist auf EPDCs. Darüber hinaus bewirkten die selektiven Adenosin-Agonisten auch keine Hemmung der Migration von EPDCs (Abb. 10).

5.3.4 Stimulation der Migration durch Adenosin

Adenosin hemmt nicht nur die Chemotaxis von Immunzellen, sondern moduliert vor allem durch Stimulation des A2A- und A2B-Rezeptors die Migration verschiedener Zellen (Ahmad et al. 2009; Gessi et al. 2011; Fernandez-Gallardo et al. 2016). Bei bronchialen Epithelzellen und Lungenendothelzellen kann eine zum Teil konzentrationsabhängige Steigerung der Migration durch Stimulation des A2A-Rezeptors beobachtet werden (Allen-Gipson et al. 2007; Ahmad et al. 2009). Im Gegensatz dazu hemmt Adenosin durch Aktivierung des A2B-Rezeptors die Migration von Gliazellen (Bernascone et al. 2010) und zeigt ebenso eine hemmende Wirkung auf die Migration von Zevixkarzinom-Zellen (Gao et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher neben den chemotaktischen Effekten von Adenosin die Effekte einer Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf die Migration von EPDCs untersucht.

Die Migration wurde mit Hilfe eines Transwellmigrationsassays nach Gabe eines selektiven A2A- oder selektiven A2B-Rezeptor-Agonisten nach 6 h analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass weder durch die Stimulation des A2A-Rezeptors noch durch Stimulation des A2B-Rezeptors ein Effekt auf die Migration von EPDCs beobachtet werden konnte (Abb. 9). Ein Einfluss der Konzentration der Adenosin-Rezeptor-Agonisten konnte nicht gefunden werden (Abb. 9). Die Literatur zeigt, dass Adenosin je nach Zelltyp und aktiviertem Rezeptor unterschiedliche Effekte auf die Migration von Zellen besitzt (Allen-Gipson et al. 2007; Bernascone et al. 2010; Fernandez-Gallardo et al. 2016).

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass extrazelluläres Adenosin *in vivo* kein entscheidendes Chemoattractant für EPDCs darstellt und dass Adenosin bei der Regulation der Migration von EPDCs in das infarzierte Myokard wahrscheinlich nicht relevant ist.

5.4 Einfluss purinerger Signale auf die Zytokinexpression von EPDCs nach MI

Nach MI gebildete EPDCs sezernieren verschiedene parakrine Faktoren, welche die Angiogenese und Wundheilung positiv beeinflussen und zu einer reduzierten Infarktgröße, sowie verbesserten Herzfunktion führen (Zhou et al. 2011). Gleichzeitig kann die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zu einer verlängerten und exzessiven inflammatorischen Phase führen, die in einer nachhaltigen Gewebeschädigung und ungünstiger Heilung resultieren kann (Prabhu und Frangogiannis 2016). ATP und Adenosin können neben der Migration und Proliferation von Zellen die sterile Inflamationsreaktion beeinflussen: Sie sind an der Aktivierung von Immun- und Nicht-Immunzellen beteiligt und steuern die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine sowie die Sekretion von Wachstumsfaktoren (Ferrari et al. 2016b).

5.4.1 Einfluss von ATP auf die Zytokinexpression von EPDCs

Das Nukleotid ATP ist für die sterile Inflamationsreaktion nach MI relevant, da es neben seiner chemotaktischen Wirkung auf Immunzellen (Elliott et al. 2009; Müller et al. 2017) die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine stimulieren kann (Ravichandran 2010; Kronlage et al. 2010; Ferrari et al. 2016b). In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* untersucht, ob eine Stimulation der ATP-Rezeptoren die Zytokinexpression von EPDCs beeinflusst. Hierfür wurde nach Behandlung der EPDCs über 6 h mit dem P2X-Rezeptor-

Agonisten BzATP und dem P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP die RNA aus EPDCs isoliert, in cDNA transkribiert und mittels quantitativer Real-Time-PCR die Expression der Zytokine IL-6, IL-11 und IL-12a quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit dem P2X-Rezeptor-Agonisten BzATP die Expression des Zytokins IL-6 signifikant steigerte (Abb. 11). Eine Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors durch den selektiven Agonisten 2-Thio-UTP zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Expression von IL-6. Es scheint, dass die gesteigerte IL-6 Expression in EPDCs unabhängig von einer Aktivierung des P2Y₂-Rezeptors stattfindet. Das Zytokin IL-6 hat pleiotrope Effekte (Frangogiannis 2014): Einerseits hat IL-6 durch Initiierung der Inflammation und Wundheilung, sowie der Wirkung auf die Gewebeintegrität einen protektiven Effekt nach MI (Fontes et al. 2015). Andererseits führt die chronische IL-6-Erhöhung zu einer anhaltenden Inflammation (Fontes et al. 2015) und spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung der myokardialen Fibrose (Feng et al. 2022). Insgesamt scheint die pro-inflammatorische Wirkung von IL-6 zu überwiegen (Libby 2021), denn erhöhte IL-6 Level nach MI sind mit einer verminderten kardialen Funktion assoziiert (Groot et al. 2019) und die Gabe eines IL-6-Antagonisten führt bei Patienten mit Nicht-ST-Hebungsinfarkt zu einer verminderten Inflammation (Kleveland et al. 2016). Die gesteigerte IL-6 Expression in EPDCs durch ATP könnte somit zu einer ungünstigen Verlängerung der Inflammation und Entstehung einer Fibrose beitragen. Weder die Stimulation mit BzATP noch mit 2-ThioUTP hatte einen signifikanten Effekt auf die Expression von IL-11 in EPDCs (Abb. 11). Es zeigte sich jedoch eine reduzierte Expression der IL-12-Untereinheit p35 nach Stimulation mit BzATP und dem P2Y₂-Rezeptor-Agonisten 2-ThioUTP (Abb. 11). Die Untereinheit p35 kommt sowohl im pro-inflammatorischen Zytokin IL-12 sowie in dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-35 vor. Während eine reduzierte Expression von IL-12p35 mit einer verbesserten kardialen Funktion bei Mäusen nach MI einhergeht (Kan et al. 2016), kann ein positiver Effekt von IL-35 auf kardiovaskuläre Erkrankungen festgestellt werden (Ye et al. 2020). Die Funktion und Wirkung einer ATP-vermittelten Reduktion der p35-Expression in EPDCs bleibt daher unklar. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die autokrine und parakrine Rolle von IL-12 und IL-35 auf EPDCs und das kardiale Remodelling nach MI zu untersuchen.

5.4.2 Einfluss von Adenosin auf die Zytokinexpression von EPDCs

Anders als das pro-inflammatorisch wirkende ATP hat Adenosin über seine jeweiligen Rezeptoren unterschiedliche Wirkung auf die Inflammation und Bildung von Zytokinen

(Feoktistov und Biaggioni 2011). Adenosin kann zum einen anti-inflammatorisch wirken und protektive Effekte nach MI vermitteln (Khoa et al. 2001; Gessi et al. 2011; Cronstein und Sitkovsky 2017). Über Aktivierung des A2A-Rezeptors induziert Adenosin die Expression des anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 (Boros et al. 2015) und hemmt die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 (Khoa et al. 2001). Hierüber bewirkt Adenosin eine Verringerung der inflammatorischen Antwort (Haskó et al. 2008). Zum anderen kann Adenosin pro-inflammatorisch wirken, indem es die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise IL-6 steigert (Sitaraman et al. 2001; Feng et al. 2010; Fredholm et al. 2011).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass nach Aktivierung des A2A-Rezeptors keine Veränderung in der Expression der untersuchten Zytokine (IL-6, IL-11 und IL-12a) beobachtet werden konnte. Die Aktivierung des A2B-Rezeptors führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von IL-6 und IL-11. IL-11 trägt zur Inflammation, zur Aktivierung von Myofibroblasten und Ablagerung von ECM und damit zur Organdysfunktion des Herzens bei (Schafer et al. 2017; Corden et al. 2020). In kardialen Fibroblasten ist IL-11 für die pro-fibrotische Wirkung von TGF-beta1 essenziell und beeinflusst die Proteinsynthese und Proteinsekretion (Schafer et al. 2017). Über die Hochregulation des pro-inflammatorischen und pro-fibrotischen Zytokins IL-11 durch Aktivierung des A2B-Rezeptors sind EPDCs möglicherweise an der Inflammationsreaktion und Entstehung einer Fibrose nach MI beteiligt.

Die Aktivierung des A2B-Rezeptors führt zu einer Hemmung der Expression der IL-12-Untereinheit p35. Wie bereits in Kapitel 5.4.1 beschrieben, kommt die Untereinheit p35 sowohl im pro-inflammatorischen IL-12 als auch im anti-inflammatorischen IL-35 vor (Jones und Vignali 2011; Vignali und Kuchroo 2012), wobei die Wirkung von IL-35 nicht abschließend geklärt ist (Hasegawa et al. 2016; Tait Wojno et al. 2019). Weitere Versuche sind notwendig, um die Bedeutung der Expression von IL-12 und IL-35 durch EPDCs zu klären.

Im Ergebnis zeigen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass ATP und Adenosin die Zytokinexpression von EPDCs im infarzierten Herzen beeinflussen können. Sowohl ATP als auch Adenosin könnten auch *in vivo* durch Hochregulation der IL-6 Expression in EPDCs die Inflammationsreaktion nach MI modulieren. Interessanterweise könnte hier besonders Adenosin über den A2B-Rezeptor eine zentrale Rolle spielen, da die Aktivierung des A2B-Rezeptors *in vitro* einen deutlich stärkeren Effekt auf die Expression von IL-6 zeigte als eine Aktivierung der ATP-Rezeptoren. Ebenso legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass Adenosin über den A2B-Rezeptor *in vivo* bei der Regulation der IL-11 Expression von EPDCs eine wichtige Rolle spielen könnte. Die Rolle von ATP hingegen scheint im Vergleich zu

Adenosin bei der Hochregulation des pro-fibrotischen Zytokins IL-11 vernachlässigbar zu sein. Somit könnte Adenosin über den A2B-Rezeptor von EPDCs sowohl die Inflammationsreaktion als auch die Fibrosebildung nach MI modulieren und somit wesentlich die Heilung des Herzens nach MI beeinflussen.

5.5 Ausblick

Im Rahmen eines MI kommt es zur Zellschädigung mit massiver Freisetzung von Nukleotiden und Nukleosiden (Lazarowski et al. 2003; Boros et al. 2015), allerdings werden diese durch ubiquitär vorkommende Ectoenzyme rasch abgebaut (Zimmermann 2000; Yegutkin 2008; Ravichandran 2010). In dieser Arbeit konnte kein Einfluss von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf die Proliferation von EPDCs unter *in vitro* Bedingungen beobachtet werden. Es ist zu beachten, dass die in der Arbeit verwendeten EPDCs von Rattenherzen fünf Tage nach I/R gewonnen und kultiviert wurden. Möglicherweise spielen purinerge Signale nur innerhalb der ersten Tage nach MI bei der Bildung von EPDCs eine Rolle. Daher sollten in weiteren Versuchen EPDCs zu früheren Zeitpunkten nach MI isoliert werden und der Einfluss von ATP und Adenosin auf deren Proliferation untersucht werden. In der Literatur wird ein Einfluss von ATP und Adenosin auf die EMT einiger Zellen beschrieben (Gao et al. 2016, Martínez-Ramírez et al. 2017; Zuccarini et al. 2017). Ob purinerge Signale einen Einfluss auf die EMT von Epikardzellen und somit auf die Bildung von EPDCs haben, sollte in weiteren Versuchen erforscht werden, um die Rolle von ATP und Adenosin bei der Bildung von EPDCs besser zu verstehen.

Des Weiteren konnte in der Arbeit keine chemotaktische Wirkung von ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten auf EPDCs festgestellt werden, und es konnte kein Einfluss auf die Migration von EPDCs gezeigt werden. Interessanterweise wird in der Literatur bei einigen Zellen ein Einfluss von ATP und Adenosin auf die Migration von Zellen zu bekannten Chemoattractants beobachtet (Chen et al. 2006; Hashmi et al. 2007; Kukulski et al. 2009). In weiterführenden Versuchen sollte untersucht werden, ob ATP und Adenosin die Chemotaxis von EPDCs zu bestimmten Chemoattractants, wie z.B. VEGF, TNF- α , TGF- β oder IL-1 β , modulieren (Mitchell et al. 2007; Shinde und Frangogiannis 2014 Shi et al. 2017; Braile et al. 2020). Zudem vermuten einige Autoren einen synergistischen Effekt von ATP und Adenosin auf die Migration (Chen et al. 2006; Kronlage et al. 2010). Hier sind weitere Versuche notwendig, um herauszufinden, ob für die Migration von EPDCs ein Zusammenspiel von ATP und Adenosin relevant ist.

Zuletzt zeigt diese Arbeit, dass ATP- und Adenosin-Rezeptor-Agonisten die Zytokinexpression von EPDCs signifikant beeinflussen können. Durch die gesteigerte Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-11 nach Aktivierung von ATP- und Adenosin-Rezeptoren *in vitro* könnten EPDCs eine wichtige Funktion in der Modulation der Inflammationsreaktion und Fibrosebildung besitzen. Besonders das pro-fibrotische Zytokin IL-

11 (Schafer et al. 2017) könnte auch einen autokrinen Effekt auf EPDCs haben und beispielsweise eine Steigerung der ECM-Produktion bewirken. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, um die funktionelle Bedeutung der ATP und Adenosin-abhängigen Regulation der Zytokinexpression von EPDCs zu klären. Neuere Studien sehen durch Antagonisierung von bestimmten Zytokinen positive Effekte auf die Herzfunktion nach MI (Kleveland et al. 2016; Ridker et al. 2017). Gleichzeitig birgt eine allgemeine Antagonisierung multifunktionaler Zytokine die Gefahr gravierender Nebenwirkungen, wie z.B. Infektionen (Fontes et al. 2015; Metcalfe et al. 2020). Ein besseres Verständnis der regulatorischen Rolle von EPDCs im infarzierten Herzen kann helfen, zielgenau kritische Punkte in der Signaltransduktion pharmakologisch anzusteuern, um die kardiale Heilung nach MI zu unterstützen.

6 Literatur

- Abbracchio, Maria P./Burnstock, Geoffrey (1998). Purinergic Signalling: Pathophysiological Roles. *The Japanese Journal of Pharmacology* 78 (2), 113–145. <https://doi.org/10.1254/jjp.78.113>.
- Abbracchio, Maria P./Burnstock, Geoffrey/Boeynaems, Jean-Marie/Barnard, Eric A./Boyer, José L./Kennedy, Charles/Knight, Gillian E./Fumagalli, Marta/Gachet, Christian/Jacobson, Kenneth A./Weisman, Gary A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacological reviews* 58 (3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>.
- Acharya, Asha/Baek, Seung Tae/Huang, Guo/Eskiocak, Banu/Goetsch, Sean/Sung, Caroline Y./Banfi, Serena/Sauer, Marion F./Olsen, Gregory S./Duffield, Jeremy S./Olson, Eric N./Tallquist, Michelle D. (2012). The bHLH transcription factor Tcf21 is required for lineage-specific EMT of cardiac fibroblast progenitors. *Development (Cambridge, England)* 139 (12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1242/dev.079970>.
- Ahmad, Aftab/Ahmad, Shama/Glover, Louise/Miller, Stacy M./Shannon, John M./Guo, Xiaoling/Franklin, Wilbur A./Bridges, James P./Schaack, Jerome B./Colgan, Sean P./White, Carl W. (2009). Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 α in pulmonary endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (26), 10684–10689. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901326106>.
- Allen-Gipson, Diane S./Spurzem, Karl/Kolm, Nicole/Spurzem, John R./Wyatt, Todd A. (2007). Adenosine promotion of cellular migration in bronchial epithelial cells is mediated by the activation of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase A. *Journal of investigative medicine: the official publication of the American Federation for Clinical Research* 55 (7), 378–385. <https://doi.org/10.2310/6650.2007.00019>.
- Antonioli, Luca/Pacher, Pál/Vizi, E. Sylvester/Haskó, György (2013). CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in molecular medicine* 19 (6), 355–367. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.03.005>.
- Aumüller, Gerhard/Wurzinger, Laurenz J. (2010). *Anatomie. 208 Tabellen. 2. Aufl.* Stuttgart, Thieme.
- Balmer, Gemma M./Bollini, Sveva/Dubé, Karina N./Martinez-Barbera, Juan Pedro/Williams, Owen/Riley, Paul R. (2014). Dynamic haematopoietic cell contribution to the developing and adult epicardium. *Nature communications* 5, 4054. <https://doi.org/10.1038/ncomms5054>.
- Bax, Noortje A. M./van Oorschot, Angelique A. M./Maas, Saskia/Braun, Jerry/van Tuyn, John/Vries, Antoine A. F. de/Groot, Adriana C. Gittenberger-de/Goumans, Marie-José (2011). In vitro epithelial-to-mesenchymal transformation in human adult epicardial cells is regulated by TGF β -signaling and WT1. *Basic research in cardiology* 106 (5), 829–847. <https://doi.org/10.1007/s00395-011-0181-0>.
- Beltrami, Antonio P./Barlucchi, Laura/Torella, Daniele/Baker, Mathue/Limana, Federica/Chimenti, Stefano/Kasahara, Hideko/Rota, Marcello/Musso, Ezio/Urbanek, Konrad/Leri, Annarosa/Kajstura, Jan/Nadal-Ginard, Bernardo/Anversa, Piero (2003). Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 114 (6), 763–776. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00687-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00687-1).
- Benjamin, Emelia J./Virani, Salim S./Callaway, Clifton W./Chamberlain, Alanna M./Chang, Alexander R./Cheng, Susan/Chiuve, Stephanie E./Cushman, Mary/Delling, Francesca N./Deo, Rajat/Ferranti, Sarah D. de/Ferguson, Jane F./Fornage, Myriam/Gillespie, Cathleen/Isasi, Carmen R./Jiménez, Monik C./Jordan, Lori Chaffin/Judd, Suzanne E./Lackland, Daniel/Lichtman, Judith H./Lisabeth, Lynda/Liu, Simin/Longenecker, Chris T./Lutsey, Pamela L./Mackey, Jason S./Matchar, David B./Matsushita, Kunihiro/Mussolino, Michael E./Nasir, Khurram/O'Flaherty, Martin/Palaniappan, Latha P./Pandey, Ambarish/Pandey, Dilip K./Reeves,

- Mathew J./Ritchey, Matthew D./Rodriguez, Carlos J./Roth, Gregory A./Rosamond, Wayne D./Sampson, Uchechukwu K. A./Satou, Gary M./Shah, Svati H./Spartano, Nicole L./Tirschwell, David L./Tsao, Connie W./Voeks, Jenifer H./Willey, Joshua Z./Wilkins, John T./Wu, Jason Hy/Alger, Heather M./Wong, Sally S./Muntner, Paul (2018). Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 137 (12), e67-e492. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000558>.
- Bergmann, O./Bhardwaj, R. D./Bernard, S./Zdunek, S./Barnabe-Heider, F./Walsh, S./Zupicich, J./Alkass, K./Buchholz, B. A./Druid, H./Jovinge, S./Frisen, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324 (5923), 98–102. <https://doi.org/10.1126/science.1164680>.
- Bernascone, Silvia/Erriquez, Jessica/Ferraro, Mario/Genazzani, Armando A./Distasi, Carla (2010). Novel adenosine and cAMP signalling pathways in migrating glial cells. *Cell calcium* 48 (1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.07.004>.
- Blom, Jessica N./Feng, Qingping (2018). Cardiac repair by epicardial EMT: Current targets and a potential role for the primary cilium. *Pharmacology & therapeutics* 186, 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.002>.
- Bollini, Sveva/Vieira, Joaquim Miguel Nunes/Howard, Sara/Dubè, Karina Natasha/Balmer, Gemma Mary/Smart, Nicola/Riley, Paul Richard (2014). Re-activated adult epicardial progenitor cells are a heterogeneous population molecularly distinct from their embryonic counterparts. *Stem cells and development* 23 (15), 1719–1730. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0019>.
- Bönnner, Florian/Borg, Nadine/Jacoby, Christoph/Temme, Sebastian/Ding, Zhaoping/Flögel, Ulrich/Schrader, Jürgen (2013). Ecto-5'-nucleotidase on immune cells protects from adverse cardiac remodeling. *Circulation Research* 113 (3), 301–312. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300180>.
- Bornstein, P. (1995). Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *The Journal of cell biology* 130 (3), 503–506.
- Bornstein, Paul/Sage, E. Helene (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current opinion in cell biology* 14 (5), 608–616.
- Boros, D./Thompson, J./Larson, D. F. (2015). Adenosine regulation of the immune response initiated by ischemia reperfusion injury. *Perfusion* 31 (2), 103–110. <https://doi.org/10.1177/0267659115586579>.
- Bours, M.J.L./Swennen, E.L.R./Di Virgilio, F./Cronstein, B. N./Dagnelie, P. C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacology & therapeutics* 112 (2), 358–404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.
- Braile, Mariantonia/Marcella, Simone/Cristinziano, Leonardo/Galdiero, Maria Rosaria/Modestino, Luca/Ferrara, Anne Lise/Varricchi, Gilda/Marone, Giancarlo/Loffredo, Stefania (2020). VEGF-A in Cardiomyocytes and Heart Diseases. *International journal of molecular sciences* 21 (15), 5294. <https://doi.org/10.3390/ijms21155294>.
- Braitsch, Caitlin M./Combs, Michelle D./Quaggin, Susan E./Yutzey, Katherine E. (2012). Pod1/Tcf21 is regulated by retinoic acid signaling and inhibits differentiation of epicardium-derived cells into smooth muscle in the developing heart. *Developmental biology* 368 (2), 345–357. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.06.002>.
- Braitsch, Caitlin M./Kanisicak, Onur/van Berlo, Jop H./Molkentin, Jeffery D./Yutzey, Katherine E. (2013). Differential expression of embryonic epicardial progenitor markers and localization of cardiac fibrosis in adult ischemic injury and hypertensive heart disease. *Journal of molecular and cellular cardiology* 65, 108–119. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.10.005>.

- Braitsch, Caitlin M./Yutzey, Katherine E. (2013). Transcriptional Control of Cell Lineage Development in Epicardium-Derived Cells. *Journal of developmental biology* 1 (2), 92–111. <https://doi.org/10.3390/jdb1020092>.
- Braun, Oscar Ö./Lu, David/Aroonsakool, Nakon/Insel, Paul A. (2010). Uridine triphosphate (UTP) induces profibrotic responses in cardiac fibroblasts by activation of P2Y2 receptors. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49 (3), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.001>.
- Braunwald, Eugene (2013). Heart failure. *JACC. Heart failure* 1 (1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2012.10.002>.
- Buchta, Mark/Höper, Dirk W./Sönnichsen, Andreas (Hg.) (2008). *Das Hammerexamen. Repetitorium für den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. 2. Aufl.* München/Jena, Elsevier Urban & Fischer.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews* 24 (3), 509–581.
- Burnstock, Geoffrey (1978). A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*. New York. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, 107–118 1978.
- Burnstock, Geoffrey (2006). Purinergic signalling--an overview. *Novartis Foundation symposium* 276, 26-48; discussion 48-57, 275-81.
- Burnstock, Geoffrey (2011). Introductory overview of purinergic signalling. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 3, 896–900.
- Burnstock, Geoffrey (2017). Purinergic Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research* 120 (1), 207–228. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309726>.
- Burnstock, Geoffrey/Pelleg, Amir (2015). Cardiac purinergic signalling in health and disease. *Purinergic signalling* 11 (1), 1–46. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9436-1>.
- Cahill, Thomas J./Choudhury, Robin P./Riley, Paul R. (2017). Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery* 16, 699 EP -. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.106>.
- Cai, Chen-Leng/Martin, Jody C./Sun, Yunfu/Cui, Li/Wang, Lianchun/Ouyang, Kunfu/Yang, Lei/Bu, Lei/Liang, Xingqun/Zhang, Xiaoxue/Stallcup, William B./Denton, Christopher P./McCulloch, Andrew/Chen, Ju/Evans, Sylvia M. (2008). A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454 (7200), 104–108. <https://doi.org/10.1038/nature06969>.
- Chablais, Fabian/Jazwinska, Anna (2012). The regenerative capacity of the zebrafish heart is dependent on TGFβ signaling. *Development (Cambridge, England)* 139 (11), 1921–1930. <https://doi.org/10.1242/dev.078543>.
- Chen, Hong-Chen (2005). Boyden Chamber Assay. In: Jun-Lin Guan (Hg.). *Cell Migration. Developmental Methods and Protocols*. Totowa, NJ, Humana Press Inc, 15–22.
- Chen, Jing-Bo/Liu, Wen-Juan/Che, Hui/Liu, Jie/Sun, Hai-Ying/Li, Gui-Rong (2012). Adenosine-5'-triphosphate up-regulates proliferation of human cardiac fibroblasts. *British journal of pharmacology* 166 (3), 1140–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01831.x>.
- Chen, Yinghong/Epperson, Sara/Makhsudova, Lala/Ito, Bruce/Suarez, Jorge/Dillmann, Wolfgang/Villarreal, Francisco (2004). Functional effects of enhancing or silencing adenosine A2b receptors in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 287 (6), H2478-86. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2004>.
- Chen, YingJie/Bache, Robert J. (2003). Adenosine: a modulator of the cardiac response to stress. *Circulation Research* 93 (8), 691–693. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000097920.18551.36>.
- Chen, Yu/Corriden, Ross/Inoue, Yoshiaki/Yip, Linda/Hashiguchi, Naoyuki/Zinkernagel, Annelies/Nizet, Victor/Insel, Paul A./Junger, Wolfgang G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science (New York, N.Y.)* 314 (5806), 1792–1795. <https://doi.org/10.1126/science.1132559>.

- Christoffels, Vincent M./Grieskamp, Thomas/Norden, Julia/Mommersteeg, Mathilda T. M./Rudat, Carsten/Kispert, Andreas (2009). Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* 458 (7240), E8-9; discussion E9-10. <https://doi.org/10.1038/nature07916>.
- Cleutjens, J. (1999). The infarcted myocardium Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovascular research* 44 (2), 232–241. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00212-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00212-6).
- Corden, Benjamin/Adami, Eleonora/Sweeney, Mark/Schafer, Sebastian/Cook, Stuart A. (2020). IL-11 in cardiac and renal fibrosis: Late to the party but a central player. *British journal of pharmacology* 177 (8), 1695–1708. <https://doi.org/10.1111/bph.15013>.
- Corriden, Ross/Insel, Paul A. (2012). New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine, and their receptors. *Purinergic signalling* 8 (3), 587–598. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9311-x>.
- Cronstein, B. N./Daguma, L./Nichols, D./Hutchison, A. J./Williams, M. (1990). The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O₂ generation, respectively. *J Clin Invest* 85 (4), 1150–1157. <https://doi.org/10.1172/JCI114547>.
- Cronstein, Bruce N. (2011). Adenosine receptors and fibrosis: a translational review. *F1000 biology reports* 3, 21. <https://doi.org/10.3410/B3-21>.
- Cronstein, Bruce N./Sitkovsky, Michail (2017). Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nature reviews. Rheumatology* 13 (1), 41–51. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.178>.
- Curley, Daniel/Lavin Plaza, Begoña/Shah, Ajay M./Botnar, René M. (2018). Molecular imaging of cardiac remodelling after myocardial infarction. *Basic research in cardiology* 113 (2), 10. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0668-z>.
- Daval, J. L./Nicolas, F./Doriat, J. F. (1996). Adenosine physiology and pharmacology: how about A2 receptors? *Pharmacology & therapeutics* 71 (3), 325–335.
- Dettman, R. W./Denetclaw, W., JR/Ordahl, C. P./Bristow, J. (1998). Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol* 193 (2), 169–181. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8801>.
- Deussen, A./Schrader, J. (1991). Cardiac adenosine production is linked to myocardial pO₂. *Journal of molecular and cellular cardiology* 23 (4), 495–504.
- Ding, Huaiyu/Jin, Mingyu/Liu, Dai/Wang, Shujing/Zhang, Jianing/Song, Xiantao/Huang, Rongchong (2018). Tenascin-C promotes the migration of bone marrow stem cells via toll-like receptor 4-mediated signaling pathways: MAPK, AKT and Wnt. *Molecular medicine reports* 17 (6), 7603–7610. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8855>.
- Ding, Z./Temme, S./Quast, C./Friebe, D./Jacoby, C./Zanger, K./Bidmon, H. J./Grapentin, C./Schubert, R./Flogel, U./Schrader, J. (2016). Epicardium-Derived Cells Formed After Myocardial Injury Display Phagocytic Activity Permitting In Vivo Labeling and Tracking. *Stem Cells Transl Med* 5 (5), 639–650. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0159>.
- Drury, A. N./Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart¹. *The Journal of Physiology* 68 (3), 213–237.
- Duan, Jinzhu/Gherghe, Costin/Liu, Dianxin/Hamlett, Eric/Srikantha, Luxman/Rodgers, Laurel/Regan, Jenna N./Rojas, Mauricio/Willis, Monte/Leask, Andrew/Majesky, Mark/Deb, Arjun (2012). Wnt1/ β catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *The EMBO Journal* 31 (2), 429–442. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.418>.

- Dubey, R. K./Gillespie, D. G./Mi, Z./Jackson, E. K. (1997). Exogenous and endogenous adenosine inhibits fetal calf serum-induced growth of rat cardiac fibroblasts: role of A2B receptors. *Circulation* 96 (8), 2656–2666.
- Duim, Sjoerd N./Kurakula, Kondababu/Goumans, Marie-José/Kruihof, Boudewijn P. T. (2015). Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 81, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.02.007>.
- Eckle, Tobias/Krahn, Thomas/Grenz, Almut/Köhler, David/Mittelbronn, Michel/Ledent, Catherine/Jacobson, Marlene A./Osswald, Hartmut/Thompson, Linda F./Unertl, Klaus/Eltzschig, Holger K. (2007). Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 115 (12), 1581–1590. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.669697>.
- Ekblom, PETER/Aufderheide, ENNO (1989). Stimulation of tenascin expression in mesenchyme by epithelial-mesenchymal interactions. *The International journal of developmental biology* 33 (1), 71–79.
- Elliott, Michael R./Chekeni, Faraaz B./Tramont, Paul C./Lazarowski, Eduardo R./Kadl, Alexandra/Walk, Scott F./Park, Daeho/Woodson, Robin I./Ostankovich, Marina/Sharma, Poonam/Lysiak, Jeffrey J./Harden, T. Kendall/Leitinger, Norbert/Ravichandran, Kodi S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461 (7261), 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>.
- Ellison, Georgina M./Vicinanza, Carla/Smith, Andrew J./Aquila, Iolanda/Leone, Angelo/Waring, Cheryl D./Henning, Beverley J./Stirparo, Giuliano Giuseppe/Papait, Roberto/Scarfò, Marzia/Agosti, Valter/Viglietto, Giuseppe/Condorelli, Gianluigi/Indolfi, Ciro/Ottolenghi, Sergio/Torella, Daniele/Nadal-Ginard, Bernardo (2013). Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 154 (4), 827–842. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.039>.
- Eltzschig, Holger K./Eckle, Tobias (2011). Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nature medicine* 17 (11), 1391–1401. <https://doi.org/10.1038/nm.2507>.
- Eschenhagen, Thomas/Bolli, Roberto/Braun, Thomas/Field, Loren J./Fleischmann, Bernd K./Frisén, Jonas/Giacca, Mauro/Hare, Joshua M./Houser, Steven/Lee, Richard T./Marbán, Eduardo/Martin, James F./Molkentin, Jeffery D./Murry, Charles E./Riley, Paul R./Ruiz-Lozano, Pilar/Sadek, Hesham A./Sussman, Mark A./Hill, Joseph A. (2017). Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation* 136 (7), 680–686. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.029343>.
- Falasca, Marco/Raimondi, Claudio/Maffucci, Tania (2011). Boyden chamber. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 769, 87–95. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_7.
- Feng, Wei/Song, Yao/Chen, Chao/Lu, Zhi Zhen/Zhang, Youyi (2010). Stimulation of adenosine A(2B) receptors induces interleukin-6 secretion in cardiac fibroblasts via the PKC-delta-P38 signalling pathway. *British journal of pharmacology* 159 (8), 1598–1607. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00558.x>.
- Feng, Yongqi/Di Ye/Wang, Zhen/Pan, Heng/Lu, Xiyi/Wang, Menglong/Xu, Yao/Yu, Junping/Zhang, Jishou/Zhao, Mengmeng/Xu, Shuwan/Pan, Wei/Yin, Zheng/Ye, Jing/Wan, Jun (2022). The Role of Interleukin-6 Family Members in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9, 818890. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.818890>.
- Feoktistov, Igor/Biaggioni, Italo (2011). Role of adenosine A(2B) receptors in inflammation. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* 61, 115–144. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385526-8.00005-9>.
- Fernandez, Paulina/Jara, Casandra/Aguilera, Valeria/Caviedes, Liska/Diaz, Francisca/Radojkovic, Claudia/Veas, Carlos/Lamperti, Liliana/Escudero, Carlos/Aguayo, Claudio (2012). Adenosine

- A_{2A} and A₃ receptors are involved in the human endothelial progenitor cells migration. *Journal of cardiovascular pharmacology* 59 (5), 397–404.
<https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e3182471d14>.
- Fernandez-Gallardo, Miriam/González-Ramírez, Ricardo/Sandoval, Alejandro/Felix, Ricardo/Monjaraz, Eduardo (2016). Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PloS one* 11 (12), e0167445.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167445>.
- Ferrari, Davide/Gambari, Roberto/Idzko, Marco/Müller, Tobias/Albanesi, Cristina/Pastore, Saveria/La Manna, Gaetano/Robson, Simon C./Cronstein, Bruce (2016a). Purinergic signaling in scarring. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (1), 3–12. <https://doi.org/10.1096/fj.15-274563>.
- Ferrari, Davide/McNamee, Eóin N./Idzko, Marco/Gambari, Roberto/Eltzschig, Holger K. (2016b). Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends in Immunology* 37 (6), 399–411.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.04.004>.
- Fishbein, M. C./Maclean, D./Maroko, P. R. (1978a). Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *The American journal of pathology* 90 (1), 57–70.
- Fishbein, Michael C./Maclean, Derek/Maroko, Peter R. (1978b). The Histopathologic Evolution of Myocardial Infarction. *Chest* 73 (6), 843–849. <https://doi.org/10.1378/chest.73.6.843>.
- Fontes, Jillian A./Rose, Noel R./Čiháková, Daniela (2015). The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* 74 (1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.024>.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research* 58 (2), 88–111. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.007>.
- Frangogiannis, Nikolaos G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* 11 (5), 255–265.
<https://doi.org/10.1038/nrcardio.2014.28>.
- Fredholm, B. B. (2007). Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell death and differentiation* 14 (7), 1315–1323. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402132>.
- Fredholm, B. B./Irenius, E./Kull, B./Schulte, G. (2001a). Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochemical pharmacology* 61 (4), 443–448.
- Fredholm, Bertil B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research* 316 (8), 1284–1288. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.004>.
- Fredholm, Bertil B./Abbracchio, Maria P./Burnstock, Geoffrey/Daly, John W./Harden, Kendall T./Jacobson, Kenneth A./Leff, Paul/Williams, Michael (1994). VI. Nomenclature and Classification of Purinoceptors*. *Pharmacological reviews* 46 (2), 143–156.
- Fredholm, Bertil B./Ijzerman, Adriaan P./Jacobson, Kenneth A./Klotz, Karl-Norbert/Linden, Joel (2001b). International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological reviews* 53 (4), 527.
- Fredholm, Bertil B./Ijzerman, Adriaan P./Jacobson, Kenneth A./Linden, Joel/Müller, Christa E. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacological reviews* 63 (1), 1–34.
<https://doi.org/10.1124/pr.110.003285>.
- Gao, Z. W./Wang, H. P./Dong, K./Lin, F./Wang, X./Zhang, H. Z. (2016). Adenosine inhibits migration, invasion and induces apoptosis of human cervical cancer cells. *Neoplasma* 63 (2), 201–207. https://doi.org/10.4149/204_150723N407.

- Gaudron, P./Eilles, C./Kugler, I./Ertl, G. (1993). Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation* 87 (3), 755–763.
- Gessi, Stefania/Merighi, Stefania/Fazzi, Debora/Stefanelli, Angela/Varani, Katia/Borea, Pier Andrea (2011). Adenosine receptor targeting in health and disease. *Expert opinion on investigational drugs* 20 (12), 1591–1609. <https://doi.org/10.1517/13543784.2011.627853>.
- Gise, Alexander von/Pu, William T. (2012). Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circulation Research* 110 (12), 1628–1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.259960>.
- Gise, Alexander von/Zhou, Bin/Honor, Leah B./Ma, Qing/Petryk, Anna/Pu, William T. (2011). WT1 regulates epicardial epithelial to mesenchymal transition through β -catenin and retinoic acid signaling pathways. *Developmental biology* 356 (2), 421–431. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.668>.
- Gittenberger-de Groot, A. C./Vrancken Peeters, M.-P. F.M./Mentink, M. M.T./Gourdie, R. G./Poelmann, R. E. (1998). Epicardium-Derived Cells Contribute a Novel Population to the Myocardial Wall and the Atrioventricular Cushions. *Circulation Research* 82 (10), 1043–1052. <https://doi.org/10.1161/01.RES.82.10.1043>.
- Gittenberger-de Groot, A. C./Winter, E. M./Bartelings, M. M./Goumans, M. J./DeRuiter, M. C./Poelmann, R. E. (2012). The arterial and cardiac epicardium in development, disease and repair. *Differentiation* 84 (1), 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.05.002>.
- Gittenberger-De Groot, Adriana C./Winter, Elisabeth M./Poelmann, Robert E. (2010). Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. *Journal of cellular and molecular medicine* 14 (5), 1056–1060. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01077.x>.
- Go, A. S./Mozaffarian, D./Roger, V. L./Benjamin, E. J./Berry, J. D./Borden, W. B./Bravata, D. M./Dai, S./Ford, E. S./Fox, C. S./Franco, S./Fullerton, H. J./Gillespie, C./Hailpern, S. M./Heit, J. A./Howard, V. J./Huffman, M. D./Kissela, B. M./Kittner, S. J./Lackland, D. T./Lichtman, J. H./Lisabeth, L. D./Magid, D./Marcus, G. M./Marelli, A./Matchar, D. B./McGuire, D. K./Mohler, E. R./Moy, C. S./Mussolino, M. E./Nichol, G./Paynter, N. P./Schreiner, P. J./Sorlie, P. D./Stein, J./Turan, T. N./Virani, S. S./Wong, N. D./Woo, D./Turner, M. B. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update. a report from the American Heart Association. *Circulation* 127 (1), e6-e245. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31828124ad>.
- Grant, M. B./Davis, M. I./Caballero, S./Feoktistov, I./Biaggioni, I./Belardinelli, L. (2001). Proliferation, migration, and ERK activation in human retinal endothelial cells through A(2B) adenosine receptor stimulation. *Investigative ophthalmology & visual science* 42 (9), 2068–2073.
- Grieskamp, Thomas/Rudat, Carsten/Lüdtke, Timo H-W/Norden, Julia/Kispert, Andreas (2011). Notch signaling regulates smooth muscle differentiation of epicardium-derived cells. *Circulation Research* 108 (7), 813–823. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.228809>.
- Groot, Hilde E./Al Ali, Lawien/van der Horst, Iwan C. C./Schurer, Remco A. J./van der Werf, Hindrik W./Lipsic, Erik/van Veldhuisen, Dirk J./Karper, Jacco C./van der Harst, Pim (2019). Plasma interleukin 6 levels are associated with cardiac function after ST-elevation myocardial infarction. *Clinical research in cardiology: official journal of the German Cardiac Society* 108 (6), 612–621. <https://doi.org/10.1007/s00392-018-1387-z>.
- Guadix, Juan Antonio/Ruiz-Villalba, Adrián/Lettice, Laura/Veleceta, Victor/Muñoz-Chápuli, Ramón/Hastie, Nicholas D./Pérez-Pomares, José María/Martínez-Estrada, Ofelia M. (2011). Wt1 controls retinoic acid signalling in embryonic epicardium through transcriptional activation of Raldh2. *Development (Cambridge, England)* 138 (6), 1093–1097. <https://doi.org/10.1242/dev.044594>.

- Hasegawa, Hideaki/Mizoguchi, Izuru/Chiba, Yukino/Ohashi, Mio/Xu, Mingli/Yoshimoto, Takayuki (2016). Expanding Diversity in Molecular Structures and Functions of the IL-6/IL-12 Heterodimeric Cytokine Family. *Frontiers in immunology* 7, 479. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00479>.
- Hashmi, Ardeshir Z./Hakim, Wyel/Kruglov, Emma A./Watanabe, Azuma/Watkins, William/Dranoff, Jonathan A./Mehal, Wajahat Z. (2007). Adenosine inhibits cytosolic calcium signals and chemotaxis in hepatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 292 (1), G395-401. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00208.2006>.
- Haskó, G. (2004). Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends in Immunology* 25 (1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.11.003>.
- Haskó, György/Linden, Joel/Cronstein, Bruce/Pacher, Pál (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 7 (9), 759–770. <https://doi.org/10.1038/nrd2638>.
- Haubner, Bernhard J./Schneider, Johanna/Schweigmann, Ulrich/Schuetz, Thomas/Dichtl, Wolfgang/Velik-Salchner, Corinna/Stein, Joerg-I/Penninger, Josef M. (2016). Functional Recovery of a Human Neonatal Heart After Severe Myocardial Infarction. *Circulation Research* 118 (2), 216–221. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307017>.
- Headrick, John P./Ashton, Kevin J./Rose'meyer, Roselyn B./Peart, Jason N. (2013). Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacology & therapeutics* 140 (1), 92–111. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.06.002>.
- Headrick, John P./Lasley, Robert D. (2009). Adenosine Receptors and Reperfusion Injury of the Heart. *Handbook of experimental pharmacology* (193), 189–214. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89615-9_7.
- Hesse, Julia/Leberling, Stella/Boden, Elisabeth/Friebe, Daniela/Schmidt, Timo/Ding, Zhaoping/Dieterich, Peter/Deussen, Andreas/Roderigo, Claudia/Rose, Christine R./Floss, Doreen M./Scheller, Jürgen/Schrader, Jürgen (2017). CD73-derived adenosine and tenascin-C control cytokine production by epicardium-derived cells formed after myocardial infarction. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31 (7), 3040–3053. <https://doi.org/10.1096/fj.201601307R>.
- Himer, Leonóra/Csóka, Balázs/Selmečzy, Zsolt/Kocsó, Balázs/Pócza, Tímea/Pacher, Pál/Németh, Zoltán H./Deitch, Edwin A./Vizi, E. Sylvester/Cronstein, Bruce N./Haskó, György (2010). Adenosine A2A receptor activation protects CD4+ T lymphocytes against activation-induced cell death. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (8), 2631–2640. <https://doi.org/10.1096/fj.10-155192>.
- His, Wilhelm (1885). *Anatomie menschlicher Embryonen. III. Zur Geschichte der Organe*. Leipzig, Vogel.
- Ho, E./Shimada, Y. (1978). Formation of the epicardium studied with the scanning electron microscope. *Dev Biol* 66 (2), 579–585.
- Horn, Florian/Armbruster, Marco/Dospil, Alexander (2009). *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 4. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Hsieh, Patrick C. H./Segers, Vincent F. M./Davis, Michael E./MacGillivray, Catherine/Gannon, Joseph/Molkentin, Jeffery D./Robbins, Jeffrey/Lee, Richard T. (2007). Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature medicine* 13 (8), 970–974. <https://doi.org/10.1038/nm1618>.
- Huang, Wentao/Chiquet-Ehrismann, Ruth/Moyano, José V./Garcia-Pardo, Angeles/Orend, Gertraud (2001). Interference of Tenascin-C with Syndecan-4 Binding to Fibronectin Blocks Cell Adhesion and Stimulates Tumor Cell Proliferation. *Cancer Research* 61 (23), 8586.

- Humphrey, P. P./Buell, G./Kennedy, I./Khakh, B. S./Michel, A. D./Surprenant, A./Trezise, D. J. (1995). New insights on P2X purinoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 352 (6), 585–596.
- Hutchins, G. M./Bulkley, B. H. (1978). Infarct expansion versus extension. Two different complications of acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 41 (7), 1127–1132.
- Idzko, Marco/Ferrari, Davide/Eltzschig, Holger K. (2014). Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* 509 (7500), 310–317. <https://doi.org/10.1038/nature13085>.
- Imanaka-Yoshida, K./Hiroe, M./Nishikawa, T./Ishiyama, S./Shimojo, T./Ohta, Y./Sakakura, T./Yoshida, T. (2001). Tenascin-C modulates adhesion of cardiomyocytes to extracellular matrix during tissue remodeling after myocardial infarction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 81 (7), 1015–1024.
- Imanaka-Yoshida, Kyoko (2012). Tenascin-C in cardiovascular tissue remodeling. From development to inflammation and repair. *Circ J* 76 (11), 2513–2520. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-1033>.
- Imanaka-Yoshida, Kyoko/Matsumoto, Kenn-ichi/Hara, Mari/Sakakura, Teruyo/Yoshida, Toshimichi (2003). The dynamic expression of tenascin-C and tenascin-X during early heart development in the mouse. *Differentiation; research in biological diversity* 71 (4-5), 291–298.
- Isfort, Katrin/Ebert, Franziska/Bornhorst, Julia/Sargin, Sarah/Kardakaris, Rozina/Pasparakis, Manolis/Bähler, Martin/Schwerdtle, Tanja/Schwab, Albrecht/Hanley, Peter J. (2011). Real-time imaging reveals that P2Y2 and P2Y12 receptor agonists are not chemoattractants and macrophage chemotaxis to complement C5a is phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)- and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-independent. *The Journal of biological chemistry* 286 (52), 44776–44787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289793>.
- Itou, Junji/Oishi, Isao/Kawakami, Hiroko/Glass, Tiffany J./Richter, Jenna/Johnson, Austin/Lund, Troy C./Kawakami, Yasuhiko (2012). Migration of cardiomyocytes is essential for heart regeneration in zebrafish. *Development (Cambridge, England)* 139 (22), 4133–4142. <https://doi.org/10.1242/dev.079756>.
- Jacobson, Kenneth A./Gao, Zhan-Guo (2006). Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature reviews. Drug discovery* 5 (3), 247–264. <https://doi.org/10.1038/nrd1983>.
- Jameel, M. N./Zhang, J. (2009). Heart failure management. the present and the future. *Antioxid Redox Signal* 11 (8), 1989–2010. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2488>.
- Jones, Lindsay L./Vignali, Dario A. A. (2011). Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. *Immunologic research* 51 (1), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s12026-011-8209-y>.
- Jones, Peter Lloyd/Jones, Frederick Scheetz (2000). Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function. *Matrix Biology* 19 (7), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(00\)00106-2](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(00)00106-2).
- Jopling, Chris/Sleep, Eduard/Raya, Marina/Martí, Mercè/Raya, Angel/Izpisúa Belmonte, Juan Carlos (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464 (7288), 606–609. <https://doi.org/10.1038/nature08899>.
- Kan, Xiaoyu/Wu, Yina/Ma, Youcai/Zhang, Congcong/Li, Ping/Wu, Lifei/Zhang, Shuai/Li, Yulin/Du, Jie (2016). Deficiency of IL-12p35 improves cardiac repair after myocardial infarction by promoting angiogenesis. *Cardiovascular Research* 109 (2), 249–259. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv255>.
- Katz, Tamar C./Singh, Manvendra K./Degenhardt, Karl/Rivera-Feliciano, José/Johnson, Randy L./Epstein, Jonathan A./Tabin, Clifford J. (2012). Distinct Compartments of the Proepicardial

- Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells. *Developmental Cell* 22 (3), 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.012>.
- Ke, Jianjuan/Yao, Bo/Li, Tao/Cui, Shanshan/Ding, Huang (2015). A2 Adenosine Receptor-mediated Cardioprotection Against Reperfusion Injury in Rat Hearts Is Associated With Autophagy Downregulation. *Journal of cardiovascular pharmacology* 66 (1), 25–34. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000239>.
- Kelm, M./Strauer, B. E. (2005). Das akute Koronarsyndrom. *Der Internist* 46 (3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s00108-005-1357-1>.
- Kennedy-Lydon, Teresa/Rosenthal, Nadia (2015). Cardiac regeneration: epicardial mediated repair. *Proceedings. Biological sciences* 282 (1821), 20152147. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2147>.
- Khakh, Baljit S./Burnstock, Geoffrey/Kennedy, Charles/King, Brian F./North, R. Alan/Séguéla, Philippe/Voigt, Mark/Humphrey, Patrick P. A. (2001). International Union of Pharmacology. XXIV. Current Status of the Nomenclature and Properties of P2X Receptors and Their Subunits. *Pharmacological reviews* 53 (1), 107.
- Khoa, N. D./Montesinos, M. C./Reiss, A. B./Delano, D./Awadallah, N./Cronstein, B. N. (2001). Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A_{2A} receptors in human monocytic THP-1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (7), 4026–4032.
- Kikuchi, Kazu (2014). Advances in understanding the mechanism of zebrafish heart regeneration. *Stem cell research* 13 (3 Pt B), 542–555. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.07.003>.
- Kikuchi, Kazu/Holdway, Jennifer E./Werdich, Andreas A./Anderson, Ryan M./Fang, Yi/Egnaczyk, Gregory F./Evans, Todd/Macrae, Calum A./Stainier, Didier Y. R./Poss, Kenneth D. (2010). Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464 (7288), 601–605. <https://doi.org/10.1038/nature08804>.
- Kleveland, Ola/Kunszt, Gabor/Bratlie, Marte/Ueland, Thor/Broch, Kaspar/Holte, Espen/Michelsen, Annika E./Bendz, Bjørn/Amundsen, Brage H./Espevik, Terje/Aakhus, Svend/Damås, Jan Kristian/Aukrust, Pål/Wiseth, Rune/Gullestad, Lars (2016). Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *European heart journal* 37 (30), 2406–2413. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw171>.
- Klinke, Rainer/Pape, Hans-Christian/Kurtz, Armin/Silbernagl, Stefan/Baumann, Rosemarie/Brenner, Bernhard/Gay, Rüdiger/Rothenburger, Astrid (2010). *Physiologie*. 6. Aufl. Stuttgart, Thieme.
- Koizumi, Shuichi/Ohsawa, Keiko/Inoue, Kazuhide/Kohsaka, Shinichi (2013). Purinergic receptors in microglia: functional modal shifts of microglia mediated by P2 and P1 receptors. *Glia* 61 (1), 47–54. <https://doi.org/10.1002/glia.22358>.
- Komiyama, M./Ito, K./Shimada, Y. (1987). Origin and development of the epicardium in the mouse embryo. *Anatomy and embryology* 176 (2), 183–189.
- Kong, Ping/Christia, Panagiota/Frangogiannis, Nikolaos G. (2014). The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 71 (4), 549–574. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1349-6>.
- Kronlage, Moritz/Song, Jian/Sorokin, Lydia/Isfort, Katrin/Schwerdtle, Tanja/Leipzig, Jens/Robaye, Bernard/Conley, Pamela B./Kim, Hee-Cheol/Sargin, Sarah/Schön, Peter/Schwab, Albrecht/Hanley, Peter J. (2010). Autocrine Purinergic Receptor Signaling Is Essential for Macrophage Chemotaxis. *Science Signaling* 3 (132), ra55. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000588>.

- Kügelgen, Ivar von/Hoffmann, Kristina (2016). Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology* 104, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.030>.
- Kuhn, H. J./Liebherr, G. (1988). The early development of the epicardium in *Tupaia belangeri*. *Anatomy and embryology* 177 (3), 225–234.
- Kukulski, Filip/Ben Yebdri, Fethia/Lecka, Joanna/Kauffmanstein, Gilles/Lévesque, Sébastien A./Martín-Satué, Mireia/Sévigny, Jean (2009). Extracellular ATP and P2 receptors are required for IL-8 to induce neutrophil migration. *Cytokine* 46 (2), 166–170. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.02.011>.
- Kunugi, Satohiko/Iwabuchi, Sadahiro/Matsuyama, Daisuke/Okajima, Takaharu/Kawahara, Koichi (2011). Negative-feedback regulation of ATP release: ATP release from cardiomyocytes is strictly regulated during ischemia. *Biochemical and biophysical research communications* 416 (3-4), 409–415. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.068>.
- Kurkiewicz, T. (1909). O histogenezie miesna sercowego zwierzat kregowych – Zur Histogenese des Herzmuskels der Wirbeltiere. *Bull Int Acad Sci Cracovie*, 148–191.
- Kwee, L./Baldwin, H. S./Shen, H. M./Stewart, C. L./Buck, C./Buck, C. A./Labow, M. A. (1995). Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development (Cambridge, England)* 121 (2), 489–503.
- Lasley, R. D./Jahania, M. S./Mentzer, R. M. (2001). Beneficial effects of adenosine A(2a) agonist CGS-21680 in infarcted and stunned porcine myocardium. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 280 (4), H1660-6. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1660>.
- Lázár, Eniko/Sadek, Hesham A./Bergmann, Olaf (2017). Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out. *European heart journal* 38 (30), 2333–2342. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx343>.
- Lazarowski, Eduardo R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic signalling* 8 (3), 359–373. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9304-9>.
- Lazarowski, Eduardo R./Boucher, Richard C./Harden, T. Kendall (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology* 64 (4), 785–795. <https://doi.org/10.1124/mol.64.4.785>.
- Lepilina, Alexandra/Coon, Ashley N./Kikuchi, Kazu/Holdway, Jennifer E./Roberts, Richard W./Burns, C. Geoffrey/Poss, Kenneth D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127 (3), 607–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.052>.
- Lertsuwan, Jomnarong/Ruchirawat, Mathuros (2017). Inhibitory Effects of ATP and Adenosine on Cholangiocarcinoma Cell Proliferation and Motility. *Anticancer research* 37 (7), 3553–3561. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11725>.
- Libby, Peter (2021). Targeting Inflammatory Pathways in Cardiovascular Disease: The Inflammasome, Interleukin-1, Interleukin-6 and Beyond. *Cells* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/cells10040951>.
- Limana, Federica/Bertolami, Chiara/Mangoni, Antonella/Di Carlo, Anna/Avitabile, Daniele/Mocini, David/Iannelli, Pina/Mori, Roberta de/Marchetti, Carlo/Pozzoli, Ombretta/Gentili, Carlo/Zacheo, Antonella/Germani, Antonia/Capogrossi, Maurizio C. (2010). Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48 (4), 609–618. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.11.008>.
- Limana, Federica/Zacheo, Antonella/Mocini, David/Mangoni, Antonella/Borsellino, Giovanna/Diamantini, Adamo/Mori, Roberta de/Battistini, Luca/Vigna, Elisa/Santini,

- Massimo/Loiaconi, Vincenzo/Pompilio, Giulio/Germani, Antonia/Capogrossi, Maurizio C. (2007). Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circulation Research* 101 (12), 1255–1265. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.150755>.
- Löffler, Georg/Petrides, Petro E. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg; Imprint Springer.
- Lu, David/Insel, Paul A. (2014). Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 6. Purinergic signaling and response in fibroblasts and tissue fibrosis. *American journal of physiology. Cell physiology* 306 (9), C779-88. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00381.2013>.
- Lu, Zhongbing/Fassett, John/Xu, Xin/Hu, Xinli/Zhu, Guangshuo/French, Joel/Zhang, Ping/Schnermann, Jurgen/Bache, Robert J./Chen, YingJie (2008). Adenosine A3 receptor deficiency exerts unanticipated protective effects on the pressure-overloaded left ventricle. *Circulation* 118 (17), 1713–1721. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.788307>.
- Maas, Jason E./Koupenova, Milka/Ravid, Katya/Auchampach, John A. (2008). The A2B adenosine receptor contributes to post-infarction heart failure.
- MacNeill, C./French, R./Evans, T./Wessels, A./Burch, J. B. (2000). Modular regulation of cGATA-5 gene expression in the developing heart and gut. *Developmental biology* 217 (1), 62–76. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9539>.
- Männer, J. (1992). The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anatomy and embryology* 186 (4), 379–385.
- Männer, J. (1993). Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anatomy and embryology* 187 (3), 281–289.
- Männer, J. (1999). Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *The Anatomical record* 255 (2), 212–226.
- Männer, J./Pérez-Pomares, J. M./Macías, D./Muñoz-Chápuli, R. (2001). The origin, formation and developmental significance of the epicardium. A review. *Cells, tissues, organs* 169 (2), 89–103.
- Männer, Jörg/Ruiz-Lozano, Pilar (2007). Development and Function of the Epicardium. In: *Cardiovascular Development*. Elsevier, 333–357.
- Martínez-Estrada, Ofelia M./Lettice, Laura A./Essafi, Abdelkader/Guadix, Juan Antonio/Slight, Joan/Velecela, Víctor/Hall, Emma/Reichmann, Judith/Devenney, Paul S./Hohenstein, Peter/Hosen, Naoki/Hill, Robert E./Muñoz-Chapuli, Ramón/Hastie, Nicholas D. (2010). Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nature genetics* 42 (1), 89–93. <https://doi.org/10.1038/ng.494>.
- Martínez-Ramírez, A. S./Díaz-Muñoz, M./Butanda-Ochoa, A./Vázquez-Cuevas, F. G. (2017). Nucleotides and nucleoside signaling in the regulation of the epithelium to mesenchymal transition (EMT). *Purinergic signalling* 13 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9550-3>.
- Masters, Megan/Riley, Paul R. (2014). The epicardium signals the way towards heart regeneration. *Stem cell research* 13 (3 Pt B), 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.04.007>.
- McIntosh, Victoria J./Lasley, Robert D. (2012). Adenosine receptor-mediated cardioprotection: are all 4 subtypes required or redundant? *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 17 (1), 21–33. <https://doi.org/10.1177/1074248410396877>.
- Metcalf, Riley D./Putoczki, Tracy L./Griffin, Michael D. W. (2020). Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. *Frontiers in immunology* 11, 1424. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01424>.

- Mikawa, T./Gourdie, R. G. (1996). Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174 (2), 221–232. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0068>.
- Mitchell, M. Darren/Laird, Rebecca E./Brown, R. Dale/Long, Carlin S. (2007). IL-1beta stimulates rat cardiac fibroblast migration via MAP kinase pathways. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292 (2), H1139-47. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00881.2005>.
- Mohamadnejad, Mehdi/Sohail, Muhammad A./Watanabe, Azuma/Krause, Diane S./Swenson, E. Scott/Mehal, Wajahat Z. (2010). Adenosine inhibits chemotaxis and induces hepatocyte-specific genes in bone marrow mesenchymal stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (3), 963–973. <https://doi.org/10.1002/hep.23389>.
- Moore, A. W./McInnes, L./Kreidberg, J./Hastie, N. D./Schedl, A. (1999). YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development (Cambridge, England)* 126 (9), 1845–1857.
- Mubagwa, K./Flameng, W. (2001). Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovascular research* 52 (1), 25–39.
- Müller, T./Robaye, B./Vieira, R. P./Ferrari, D./Grimm, M./Jakob, T./Martin, S. F./Di Virgilio, F./Boeynaems, J-M/Virchow, J. C./Idzko, M. (2010). The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 65 (12), 1545–1553. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02426.x>.
- Müller, Tobias/Fay, Susanne/Vieira, Rodolfo Paula/Karmouty-Quintana, Harry/Cicko, Sanja/Ayata, Korcan/Zissel, Gernot/Goldmann, Torsten/Lungarella, Giuseppe/Ferrari, Davide/Di Virgilio, Francesco/Robaye, Bernard/Boeynaems, Jean-Marie/Blackburn, Michael R./Idzko, Marco (2017). The purinergic receptor subtype P2Y2 mediates chemotaxis of neutrophils and fibroblasts in fibrotic lung disease. *Oncotarget* 8 (22), 35962–35972. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16414>.
- Muñoz-Chápuli, R./Macías, D./Ramos, C./Fernández, B./Sans-Coma, V. (1997). Development of the Epicardium in the Dogfish (*Scyliorhinus canicula*). *Acta Zoologica* 78 (1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1997.tb01124.x>.
- Munoz-Chapuli, Ramon/Macias, David/Gonzalez-Iriarte, Mauricio/Carmona, Rita/Atencia, Gerardo/Perez-Pomares, Jose Maria (2002). The epicardium and epicardial-derived cells. Multiple functions in cardiac development. *Revista espanola de cardiologia* 55 (10), 1070–1082.
- Murphy-Ullrich, J. E. (2001). The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *The Journal of clinical investigation* 107 (7), 785–790. <https://doi.org/10.1172/JCI12609>.
- Murry, Charles E./Soonpaa, Mark H./Reinecke, Hans/Nakajima, Hidehiro/Nakajima, Hisako O./Rubart, Michael/Pasumarthi, Kishore B. S./Virag, Jitka Ismail/Bartelmez, Stephen H./Poppa, Veronica/Bradford, Gillian/Dowell, Joshua D./Williams, David A./Field, Loren J. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428 (6983), 664–668. <https://doi.org/10.1038/nature02446>.
- Myrtek, Daniel/Idzko, Marco (2007). Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. *Purinergic signalling* 3 (1-2), 5–11. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9032-0>.
- Nikolaos G. Frangiogiannis (2012). Matricellular Proteins in cardiac adaption and disease. *Physiological Reviews* 92, 635–688.
- Nishioka, Tomohiro/Onishi, Katsuya/Shimojo, Naoshi/Nagano, Yuka/Matsusaka, Hidenori/Ikeuchi, Masaki/Ide, Tomomi/Tsutsui, Hiroyuki/Hiroe, Michiaki/Yoshida, Toshimichi/Imanaka-Yoshida, Kyoko (2010). Tenascin-C may aggravate left ventricular remodeling and function after myocardial infarction in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 298 (3), H1072-8. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00255.2009>.

- North, R. Alan (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiological Reviews* 82 (4), 1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>.
- Ohta, A./Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 414 (6866), 916–920. <https://doi.org/10.1038/414916a>.
- Ohta, Akio/Sitkovsky, Michail (2009). The adenosinergic immunomodulatory drugs. *Current opinion in pharmacology* 9 (4), 501–506. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.05.005>.
- Parmley, W. W./Chuck, L./Kivowitz, C./Matloff, J. M./Swan, H. J. (1973). In vitro length-tension relations of human ventricular aneurysms. Relation of stiffness to mechanical disadvantage. *The American journal of cardiology* 32 (7), 889–894.
- Pérez-Pomares, J. M./Macías, D./García-Garrido, L./Muñoz-Chápuli, R. (1997). Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 210 (2), 96–105. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199710\)210:2<96::AID-AJA3>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199710)210:2<96::AID-AJA3>3.0.CO;2-4).
- Perez-Pomares, J. M./Macias, D./Garcia-Garrido, L./Munoz-Chapuli, R. (1998). The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo. An immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev Biol* 200 (1), 57–68.
- Pérez-Pomares, J. M./Phelps, A./Sedmerova, M./Carmona, R./González-Iriarte, M./Muñoz-Chápuli, R./Wessels, A. (2002). Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart. A model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 247 (2), 307–326.
- Pérez-Pomares, José María/La Pompa, José Luis de (2011). Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circulation Research* 109 (12), 1429–1442. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.245589>.
- Pfeffer, J. M./Pfeffer, M. A./Fletcher, P. J./Braunwald, E. (1991). Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *The American journal of physiology* 260 (5 Pt 2), H1406-14.
- Pfeffer, M. A./Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81 (4), 1161–1172.
- Phosri, Sarawuth/Arieyawong, Ajaree/Bunrukchai, Kwanchai/Parichatikanond, Warisara/Nishimura, Akiyuki/Nishida, Motohiro/Mangmool, Supachoke (2017). Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and α -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway. *Frontiers in pharmacology* 8, 428. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00428>.
- Ponikowski, Piotr/Voors, Adriaan A./Anker, Stefan D./Bueno, Héctor/Cleland, John G. F./Coats, Andrew J. S./Falk, Volkmar/González-Juanatey, José Ramón/Harjola, Veli-Pekka/Jankowska, Ewa A./Jessup, Mariell/Linde, Cecilia/Nihoyannopoulos, Petros/Parissis, John T./Pieske, Burkert/Riley, Jillian P./Rosano, Giuseppe M. C./Ruilope, Luis M./Ruschitzka, Frank/Rutten, Frans H./van der Meer, Peter (2016). 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Revista española de cardiología (English ed.)* 69 (12), 1167. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2016.11.005>.
- Porrello, Enzo R./Mahmoud, Ahmed I./Simpson, Emma/Hill, Joseph A./Richardson, James A./Olson, Eric N./Sadek, Hesham A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, N.Y.)* 331 (6020), 1078–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1200708>.
- Poss, Kenneth D./Wilson, Lindsay G./Keating, Mark T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5601), 2188–2190. <https://doi.org/10.1126/science.1077857>.

- Prabhu, Sumanth D./Frangogiannis, Nikolaos G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction. From Inflammation to Fibrosis. *Circulation Research* 119 (1), 91–112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>.
- Ralevic, Vera/Burnstock, Geoffrey (1998). Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50 (3), 413.
- Ravichandran, Kodi S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207 (9), 1807–1817. <https://doi.org/10.1084/jem.20101157>.
- Ridker, Paul M./Everett, Brendan M./Thuren, Tom/MacFadyen, Jean G./Chang, William H./Ballantyne, Christie/Fonseca, Francisco/Nicolau, Jose/Koenig, Wolfgang/Anker, Stefan D./Kastelein, John J. P./Cornel, Jan H./Pais, Prem/Pella, Daniel/Genest, Jacques/Cifkova, Renata/Lorenzatti, Alberto/Forster, Tamas/Kobalava, Zhanna/Vida-Simiti, Luminita/Flather, Marcus/Shimokawa, Hiroaki/Ogawa, Hisao/Dellborg, Mikael/Rossi, Paulo R. F./Troquay, Roland P. T./Libby, Peter/Glynn, Robert J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *The New England journal of medicine* 377 (12), 1119–1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>.
- Rossini, Roberta/Senni, Michele/Musumeci, Giuseppe/Ferrazzi, Paolo/Gavazzi, Antonello (2010). Prevention of left ventricular remodelling after acute myocardial infarction: an update. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 5 (3), 196–207.
- Rovetto, M. J./Lamberton, W. F./Neely, J. R. (1975). Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circulation Research* 37 (6), 742–751.
- Rudat, Carsten/Kispert, Andreas (2012). Wt1 and epicardial fate mapping. *Circulation Research* 111 (2), 165–169. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.273946>.
- Ryzhov, Sergey/Sung, Bong Hwan/Zhang, Qinkun/Weaver, Alissa/Gumina, Richard J./Biaggioni, Italo/Feoktistov, Igor (2014). Role of adenosine A2B receptor signaling in contribution of cardiac mesenchymal stem-like cells to myocardial scar formation. *Purinergic signalling* 10 (3), 477–486. <https://doi.org/10.1007/s11302-014-9410-y>.
- Sadej, R./Inai, K./Rajfur, Z./Ostapkowicz, A./Kohler, J./Skladanowski, A. C./Mitchell, B. S./Spychala, J. (2008). Tenascin C interacts with ecto-5'-nucleotidase (eN) and regulates adenosine generation in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 1782 (1), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.11.001>.
- Sage, E. H./Bornstein, P. (1991). Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *The Journal of biological chemistry* 266 (23), 14831–14834.
- Sassi, Yassine/Ahles, Andrea/Truong, Dong-Jiunn Jeffery/Baqi, Younis/Lee, Sang-Yong/Husse, Britta/Hulot, Jean-Sébastien/Foinquinos, Ariana/Thum, Thomas/Müller, Christa E./Dendorfer, Andreas/Laggerbauer, Bernhard/Engelhardt, Stefan (2014). Cardiac myocyte-secreted cAMP exerts paracrine action via adenosine receptor activation. *The Journal of clinical investigation* 124 (12), 5385–5397. <https://doi.org/10.1172/JCI74349>.
- Sato, Akira/Hiroe, Michiaki/Akiyama, Daiki/Hikita, Hiroyuki/Nozato, Toshihiro/Hoshi, Tomoya/Kimura, Taizo/Wang, Zheng/Sakai, Satoshi/Imanaka-Yoshida, Kyoko/Yoshida, Toshimichi/Aonuma, Kazutaka (2012). Prognostic value of serum tenascin-C levels on long-term outcome after acute myocardial infarction. *Journal of Cardiac Failure* 18 (6), 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2012.02.009>.
- Säve, Susanne/Mohlin, Camilla/Vumma, Ravi/Persson, Katarina (2011). Activation of adenosine A2A receptors inhibits neutrophil transuroepithelial migration. *Infection and immunity* 79 (8), 3431–3437. <https://doi.org/10.1128/IAI.05005-11>.
- Schafer, Sebastian/Viswanathan, Sivakumar/Widjaja, Anissa A./Lim, Wei-Wen/Moreno-Moral, Aida/DeLaughter, Daniel M./Ng, Benjamin/Patone, Giannino/Chow, Kingsley/Khin, Ester/Tan,

- Jessie/Chothani, Sonia P./Ye, Lei/Rackham, Owen J. L./Ko, Nicole S. J./Sahib, Norliza E./Pua, Chee Jian/Zhen, Nicole T. G./Xie, Chen/Wang, Mao/Maatz, Henrike/Lim, Shiqi/Saar, Kathrin/Blachut, Susanne/Petretto, Enrico/Schmidt, Sabine/Putoczki, Tracy/Guimarães-Camboa, Nuno/Wakimoto, Hiroko/van Heesch, Sebastiaan/Sigmundsson, Kristmundur/Lim, See L./Soon, Jia L./Chao, Victor T. T./Chua, Yeow L./Tan, Teing E./Evans, Sylvia M./Loh, Yee J./Jamal, Muhammad H./Ong, Kim K./Chua, Kim C./Ong, Boon-Hean/Chakaramakkil, Mathew J./Seidman, Jonathan G./Seidman, Christine E./Hubner, Norbert/Sin, Kenny Y. K./Cook, Stuart A. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature* 552 (7683), 110–115. <https://doi.org/10.1038/nature24676>.
- Schindelin, Johannes/Arganda-Carreras, Ignacio/Frise, Erwin/Kaynig, Verena/Longair, Mark/Pietzsch, Tobias/Preibisch, Stephan/Rueden, Curtis/Saalfeld, Stephan/Schmid, Benjamin/Tinevez, Jean-Yves/White, Daniel James/Hartenstein, Volker/Eliceiri, Kevin/Tomancak, Pavel/Cardona, Albert (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods* 9 (7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Sengbusch, Jennifer K./He, Wei/Pinco, Karen A./Yang, Joy T. (2002). Dual functions of alpha4beta1 integrin in epicardial development. Initial migration and long-term attachment. *The Journal of cell biology* 157 (5), 873–882. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203075>.
- Senyo, Samuel E./Steinhauser, Matthew L./Pizzimenti, Christie L./Yang, Vicky K./Cai, Lei/Wang, Mei/Wu, Ting-Di/Guerquin-Kern, Jean-Luc/Lechene, Claude P./Lee, Richard T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493 (7432), 433–436. <https://doi.org/10.1038/nature11682>.
- Shi, Huairui/Zhang, Xuehong/He, Zekun/Wu, Zhiyong/Rao, Liya/Li, Yushu (2017). Metabolites of Hypoxic Cardiomyocytes Induce the Migration of Cardiac Fibroblasts. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 41 (1), 413–421. <https://doi.org/10.1159/000456531>
- Shinde, A. V./Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction. a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* 70, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.015>.
- Sitaraman, S. V./Merlin, D./Wang, L./Wong, M./Gewirtz, A. T./Si-Tahar, M./Madara, J. L. (2001). Neutrophil-epithelial crosstalk at the intestinal luminal surface mediated by reciprocal secretion of adenosine and IL-6. *J Clin Invest* 107 (7), 861–869. <https://doi.org/10.1172/JCI11783>.
- Smart, Nicola/Bollini, Sveva/Dubé, Karina N./Vieira, Joaquim M./Zhou, Bin/Davidson, Sean/Yellon, Derek/Riegler, Johannes/Price, Anthony N./Lythgoe, Mark F./Pu, William T./Riley, Paul R. (2011). De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474 (7353), 640–644. <https://doi.org/10.1038/nature10188>.
- Smart, Nicola/Dubé, Karina N./Riley, Paul R. (2013). Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation. *Vascular pharmacology* 58 (3), 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.08.001>.
- Smith, Christopher L./Baek, Seung Tae/Sung, Caroline Y./Tallquist, Michelle D. (2011). Epicardial-derived cell epithelial-to-mesenchymal transition and fate specification require PDGF receptor signaling. *Circulation Research* 108 (12), e15-26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.235531>.
- Smits, Anke M./Dronkers, Esther/Goumans, Marie-José (2018). The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacological research* 127, 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.020>.
- Smits, Anke M./Riley, Paul R. (2014). Epicardium-Derived Heart Repair. *Journal of developmental biology* 2 (2), 84–100. <https://doi.org/10.3390/jdb2020084>.
- Sparks, H. V./Bardenheuer, H. (1986). Regulation of adenosine formation by the heart. *Circulation Research* 58 (2), 193–201. <https://doi.org/10.1161/01.RES.58.2.193>.

- Sutton, M. G./Sharpe, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101 (25), 2981–2988.
- Sylva, Marc/van den Hoff, Maurice J. B./Moorman, Antoon F. M. (2014). Development of the human heart. *American journal of medical genetics. Part A* 164A (6), 1347–1371. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35896>.
- Tait Wojno, Elia D./Hunter, Christopher A./Stumhofer, Jason S. (2019). The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity* 50 (4), 851–870. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.011>.
- Tamaoki, Masashi/Imanaka-Yoshida, Kyoko/Yokoyama, Kazuto/Nishioka, Tomohiro/Inada, Hiroyasu/Hiroe, Michiaki/Sakakura, Teruyo/Yoshida, Toshimichi (2005). Tenascin-C Regulates Recruitment of Myofibroblasts during Tissue Repair after Myocardial Injury. *The American journal of pathology* 167 (1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)62954-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62954-9).
- Tennant, Robert/Wiggers, Carl J. (1935). The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *American Journal of Physiology* 112 (2), 351–361.
- Teringova, Elena/Tousek, Petr (2017). Apoptosis in ischemic heart disease. *Journal of translational medicine* 15 (1), 87. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1191-y>.
- Thiel, Manfred/Caldwell, Charles C./Sitkovsky, Michail V. (2003). The critical role of adenosine A2A receptors in downregulation of inflammation and immunity in the pathogenesis of infectious diseases. *Microbes and infection* 5 (6), 515–526.
- Tian, Xueying/Pu, William T./Zhou, Bin (2015). Cellular origin and developmental program of coronary angiogenesis. *Circulation Research* 116 (3), 515–530. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305097>.
- Toldo, Stefano/Zhong, Hongyan/Mezzaroma, Eleonora/van Tassell, Benjamin W./Kannan, Harsha/Zeng, Dewan/Belardinelli, Luiz/Voelkel, Norbert F./Abbate, Antonio (2012). GS-6201, a selective blocker of the A2B adenosine receptor, attenuates cardiac remodeling after acute myocardial infarction in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 343 (3), 587–595. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.191288>.
- van Calker, D./Müller, M./Hamprecht, B. (1979). Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of neurochemistry* 33 (5), 999–1005.
- van der Hoeven, Dharini/Wan, Tina C./Auchampach, John A. (2008). Activation of the A(3) adenosine receptor suppresses superoxide production and chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils. *Molecular pharmacology* 74 (3), 685–696. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048066>.
- van Wijk, Bram/Gunst, Quinn D./Moorman, Antoon F. M./van den Hoff, Maurice J. B. (2012). Cardiac regeneration from activated epicardium. *PloS one* 7 (9), e44692. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044692>.
- Vecchio, Elizabeth A./White, Paul J./May, Lauren T. (2017). Targeting Adenosine Receptors for the Treatment of Cardiac Fibrosis. *Frontiers in pharmacology* 8, 243. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00243>.
- Vignali, Dario A. A./Kuchroo, Vijay K. (2012). IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature immunology* 13 (8), 722–728. <https://doi.org/10.1038/ni.2366>.
- Vinten-Johansen, J./Thourani, V. H./Ronson, R. S./Jordan, J. E./Zhao, Z. Q./Nakamura, M./Velez, D./Guyton, R. A. (1999). Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *The Annals of thoracic surgery* 68 (5), 1942–1948.
- Viragh, S./Challice, C. E. (1981). The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *The Anatomical record* 201 (1), 157–168. <https://doi.org/10.1002/ar.1092010117>.

- Virágh, S./Gittenberger-de Groot, A. C./Poelmann, R. E./Kálmán, F. (1993). Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anatomy and embryology* 188 (4), 381–393.
- Vitiello, L./Gorini, S./Rosano, G./La Sala, A. (2012). Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood* 120 (3), 511–518. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406496>.
- Vracko, R./Thorning, D./Frederickson, R. G. (1989). Connective tissue cells in healing rat myocardium. A study of cell reactions in rhythmically contracting environment. *The American journal of pathology* 134 (5), 993–1006.
- Vrancken Peeters, M. P./Mentink, M. M./Poelmann, R. E./Gittenberger-de Groot, A. C. (1995). Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anatomy and embryology* 191 (6), 503–508.
- Wakai, A./Wang, J. H./Winter, D. C./Street, J. T./O'Sullivan, R. G./Redmond, H. P. (2001). Adenosine inhibits neutrophil vascular endothelial growth factor release and transendothelial migration via A2B receptor activation. *Shock (Augusta, Ga.)* 15 (4), 297–301.
- Wang, Xu/Chen, Deyu (2018). Purinergic Regulation of Neutrophil Function. *Frontiers in immunology* 9, 399. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00399>.
- Weeke-Klimp, Alida/Bax, Noortje A. M./Bellu, Anna Rita/Winter, Elizabeth M./Vrolijk, Johannes/Plantinga, Josée/Maas, Saskia/Brinker, Marja/Mahtab, Edris A. F./Gittenberger-De Groot, Adriana C./van Luyn, Marja J. A./Harmsen, Martin C./Lie-Venema, Heleen (2010). Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49 (4), 606–616. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.07.007>.
- Wessels, A./Pérez-Pomares, J. M. (2004). The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* 276 (1), 43–57. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10129>.
- Wessels, Andy/van den Hoff, Maurice J. B./Adamo, Richard F./Phelps, Aimee L./Lockhart, Marie M./Sauls, Kimberly/Briggs, Laura E./Norris, Russell A./van Wijk, Bram/Perez-Pomares, Jose M./Dettman, Robert W./Burch, John B. E. (2012). Epicardially derived fibroblasts preferentially contribute to the parietal leaflets of the atrioventricular valves in the murine heart. *Developmental biology* 366 (2), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.04.020>.
- Willems, I. E./Arends, J. W./Daemen, M. J. (1996). Tenascin and fibronectin expression in healing human myocardial scars. *The Journal of pathology* 179 (3), 321–325. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199607\)179:3<321::AID-PATH555>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199607)179:3<321::AID-PATH555>3.0.CO;2-8).
- Willems, Laura/Ashton, Kevin J./Headrick, John P. (2005). Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovascular research* 66 (2), 245–255. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.11.008>.
- Williams, Adrienne J./Cronstein, Bruce N. (2012). The effect of A(2A) adenosine receptor activation on C-C chemokine receptor 7 expression in human THP1 macrophages during inflammation. *Inflammation* 35 (2), 614–622. <https://doi.org/10.1007/s10753-011-9353-1>.
- Winter, E. M./Grauss, R. W./Hogers, B./van Tuyn, J./van der Geest, R./Lie-Venema, H./Steijn, R. Vicente/Maas, S./DeRuiter, M. C./deVries, A. A. F./Steendijk, P./Doevendans, P. A./van der Laarse, A./Poelmann, R. E./Schalij, M. J./Atsma, D. E./Gittenberger-de Groot, A. C. (2007). Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* 116 (8), 917–927. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.668178>.
- Ye, Jing/Wang, Yuan/Wang, Zhen/Liu, Ling/Yang, Zicong/Wang, Menglong/Xu, Yao/Di Ye/Zhang, Jishou/Lin, Yingzhong/Ji, Qingwei/Wan, Jun (2020). Roles and Mechanisms of Interleukin-12 Family Members in Cardiovascular Diseases: Opportunities and Challenges. *Frontiers in pharmacology* 11, 129. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00129>.

- Yegutkin, Gennady G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (5), 673–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>.
- Yu, Ningpu/Erb, Laurie/Shivaji, Rikka/Weisman, Gary A./Seye, Cheikh I. (2008). Binding of the P2Y2 Nucleotide Receptor to Filamin A Regulates Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 102 (5), 581–588. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.162271>.
- Zangi, Lior/Lui, Kathy O./Gise, Alexander von/Ma, Qing/Ebina, Wataru/Ptaszek, Leon M./Später, Daniela/Xu, Huansheng/Tabebordbar, Mohammadsharif/Gorbatov, Rostic/Sena, Brena/Nahrendorf, Matthias/Briscoe, David M./Li, Ronald A./Wagers, Amy J./Rossi, Derrick J./Pu, William T./Chien, Kenneth R. (2013). Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nature biotechnology* 31 (10), 898–907. <https://doi.org/10.1038/nbt.2682>.
- Zantl, Roman/Horn, Elias (2011). Chemotaxis of slow migrating mammalian cells analysed by video microscopy. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 769, 191–203. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-207-6_13.
- Zhang, Hao/Zhong, Hongyan/Everett, Thomas H./Wilson, Emily/Chang, Roger/Zeng, Dewan/Belardinelli, Luiz/Olgin, Jeffrey E. (2014). Blockade of A2B adenosine receptor reduces left ventricular dysfunction and ventricular arrhythmias 1 week after myocardial infarction in the rat model. *Heart rhythm* 11 (1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.10.023>.
- Zhong, Hongyan/Belardinelli, Luiz/Zeng, Dewan (2011). Pro-Fibrotic Role of the A2B Adenosine Receptor in Human Cardiac Fibroblasts. *Journal of Cardiac Failure* 17 (8), S65. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2011.06.234>.
- Zhou, B./Honor, L. B./He, H./Ma, Q./Oh, J. H./Butterfield, C./Lin, R. Z./Melero-Martin, J. M./Dolmatova, E./Duffy, H. S./Gise, Av/Zhou, P./Hu, Y. W./Wang, G./Zhang, B./Wang, L./Hall, J. L./Moses, M. A./McGowan, F. X./Pu, W. T. (2011). Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin Invest* 121 (5), 1894–1904. <https://doi.org/10.1172/JCI45529>.
- Zhou, Bin/Honor, Leah B./Ma, Qing/Oh, Jin-Hee/Lin, Rwei-Zeng/Melero-Martin, Juan M./Gise, Alexander von/Zhou, Pingzhu/Hu, Tianyuan/He, Lingjuan/Wu, Kai Hong/Zhang, Hui/Zhang, Yuebo/Pu, William T. (2012). Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 52 (1), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.08.020>.
- Zhou, Bin/Ma, Qing/Rajagopal, Satish/Wu, Sean M./Domian, Ibrahim/Rivera-Feliciano, José/Jiang, Dawei/Gise, Alexander von/Ikeda, Sadakatsu/Chien, Kenneth R./Pu, William T. (2008). Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454 (7200), 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature07060>.
- Zimmermann, H. (1996). Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 49 (6), 589–618. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(96\)00026-3](https://doi.org/10.1016/0301-0082(96)00026-3).
- Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (4-5), 299–309.
- Zuccarini, Mariachiara/Giuliani, Patricia/Buccella, Silvana/Di Liberto, Valentina/Mudò, Giuseppa/Belluardo, Natale/Carluccio, Marzia/Rossini, Margherita/Condorelli, Daniele Filippo/Rathbone, Michel Piers/Caciagli, Francesco/Ciccarelli, Renata/Di Iorio, Patrizia (2017). Modulation of the TGF- β 1-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) mediated by P1 and P2 purine receptors in MDCK cells. *Purinergic signalling* 13 (4), 429–442. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9571-6>.

7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Jürgen Schrader für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit unter seiner Betreuung zu bewerkstelligen. Vielen Dank für die wertvolle Unterstützung und die vielen fachlichen Anregungen.

Bei Dr. Julia Hesse bedanke ich mich für die Anleitung bei den Experimenten, die unermüdliche fachliche Unterstützung und die vielen hilfreichen Korrekturen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Zhaoping Ding für die Durchführung der experimentellen Herzinfarkte bedanken, sowie bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die große Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt im Besonderen meinen Eltern, meiner Schwester und meinem Mann für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.