

Die Rolle epikardialer stromaler Zellen in der Heilungsphase nach Myokardinfarkt

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

vorgelegt von

Ria Zalfen
aus Duisburg

Düsseldorf, November 2023

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

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jürgen Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Tag der mündlichen Prüfung:

07.02.2024

Zusammenfassung

Nach einem Myokardinfarkt wird das Epikard aktiviert und es bildet sich eine Multizellschicht aus proliferierenden, epikardialen stromalen Zellen (EpiSCs), in denen Teile des embryonalen Genprogramms reaktiviert werden. Diese EpiSCs besitzen aufgrund ihrer multipotenten Zelleigenschaften das Potenzial, zur Herzheilung nach Infarkt beizutragen. Eine Voraussetzung zur Entwicklung therapeutischer Strategien, um EpiSCs für die Förderung der Herzheilung zu nutzen, ist es ein tieferes Verständnis der zellulären Eigenschaften der EpiSCs nach Infarkt zu erarbeiten.

In der vorliegenden Arbeit wurden EpiSCs in einem Infarkt-Mausmodell hinsichtlich ihrer zellulären Heterogenität und ihres Potenzials zur Herzheilung untersucht. Basierend auf vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde die Lokalisation von identifizierten EpiSC-Zellclustern 5 Tage nach Infarkt mittels RNA-*in situ*-Hybridisierung definiert. Hier konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen der Lokalisation und dem transkriptionellen Charakter der EpiSC-Zellcluster gezeigt werden. Eine detaillierte Analyse der EpiSCs an zwei Zeitpunkten nach Infarkt (5 und 21 Tage) mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNAseq) zeigte unter anderem einen Rückgang von proliferierenden EpiSCs 21 Tage nach Infarkt. Aufbauend auf Hinweisen, dass Sphingolipid-1-Phosphat (S1P) und Thymosin-beta 4 (Tβ4) erfolgsversprechende Moleküle bei der Herzheilung sein könnten, wurde deren Wirkung auf EpiSCs näher analysiert. Nach pharmakologischer Anreicherung von S1P *in vivo* konnten in histologischen Analysen Kardiomyozyten-Vorläufer identifiziert werden. Eine Lipidomics-Analyse der Sphingolipide in EpiSCs nach Infarkt zeigte eine signifikante Erhöhung von Ceramid C16:0 im Vergleich zu Fibroblasten und belegt erstmals eine mögliche Rolle von S1P in EpiSCs. Um die Bedeutung von Tβ4 in Infarkt-aktivierten EpiSCs zu untersuchen, wurde ein AAV9-Vektorsystem zur herzspezifischen Tβ4-Überexpression entwickelt und dies führte zu einem Trend einer Erhöhung von WT-1⁺-Zellen. ScRNAseq-Analysen 5 und 14 Tage nach Infarkt ergaben, dass die Expression einer Vielzahl von Genen nach Tβ4-Überexpression verändert war, darunter eine gesteigerte Expression von Kollagen vor allem 14 Tage nach Infarkt.

Zusammen bilden die erhobenen Daten die Grundlage, das Infarktgeschehen auf Zellebene besser zu verstehen und zukünftig neue Therapiemöglichkeiten zur Förderung der Herzheilung zu entwickeln.

Summary

Myocardial infarction leads to the activation of the epicardium, forming a multi-cell layer of proliferating epicardial stromal cells (EpiSCs) by reactivating their embryonic gene program. Due to their multipotent cell characteristics, EpiSCs have the potential to improve cardiac healing after infarction. For developing new therapeutic strategies by pharmacologically targeting EpiSCs, a deeper understanding of the cellular characteristics of EpiSCs is required.

The present study aimed at analyzing EpiSCs regarding their cellular heterogeneity and their potential for infarct healing in a mouse infarction model. Based on recent findings of our group, the localization of single-cell RNA sequencing (scRNAseq)-identified cell clusters 5 days post infarction was defined by using RNA-*in situ*-hybridization. Individual transcriptionally defined cell clusters could be attributed to a specific localization within the epicardial cell layer. ScRNAseq of EpiSCs 5 and 21 days after infarction characterized the temporal changes in gene expression within the EpiSC clusters. This includes a significant reduction of proliferating cells at 21 days post infarction.

The second focus of the present work concerned the role of two molecules on EpiSCs in infarct healing: Sphingosine-1-phosphate (S1P) and thymosin-beta 4 (T β 4). Pharmacological enrichment of S1P resulted in the formation of cardiomyocyte precursor cells in infarcted hearts as identified by histochemistry. Using MS-based lipidomic analysis, the sphingolipid composition in stromal cells after infarction was analyzed. A significant higher level of ceramide C16:0 in EpiSCs in comparison to fibroblasts was observed, suggesting a functional relevance of S1P in EpiSCs. To analyze the cardioprotective effects of T β 4 and its impact on EpiSCs, an AAV9 vector system for heart-specific T β 4 overexpression was generated. This T β 4 overexpression led to the trend of an increase in WT-1⁺-cells within the epicardial layer. ScRNAseq analysis of EpiSCs 5 and 14 days after infarction characterized multiple temporal changes in EpiSC gene expression in response to T β 4 overexpression. This included an increased expression of collagen, especially 14 days after infarction.

In summary, the data obtained improved our understanding of the molecular and cellular processes in infarct-activated EpiSCs and thus may be helpful to develop future strategies to better target EpiSCs in the healing process.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Single-cell transcriptomics defines heterogeneity of epicardial cells and fibroblasts within the infarcted murine heart

Publiziert in: Elife, 2021

Impact Faktor: 8,71

Eigenanteil an dieser Arbeit: 15 %

RNA-*in situ*-Hybridisierung

Datenauswertung

Hesse J.*, Owenier C.*, Lautwein T., Zalfen R., Weber J., Ding Z., Alter C., Lang A., Grandoch M., Gerdes N., Fischer J., Klau G., Dieterich C., Köhrer K., Schrader J.,
Single-cell transcriptomics defines heterogeneity of epicardial cells and fibroblasts within the infarcted murine heart

Abkürzungsverzeichnis

AAV9	Adeno-assoziiertes Virus des Serotyps 9
Abb	Abbildung
aCF	<i>activated cardiac fibroblast</i>
ACTN2	α -Aktinin 2
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AP	Alkalische Phosphatase
α -SMA	<i>α-Smooth muscle actin</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AvgLog2FC	<i>Average Log2 Fold Change</i>
CA	Chicken β -actin/CMV Promotor
CF	<i>cardiac fibroblast</i>
CHAD	Chondroadherin
CILP2	<i>Cartilage intermediate layer protein 2</i>
COL	Kollagen
COMP	<i>Cartilage oligomeric matrix protein</i>
cTnT	<i>cardiac Troponin T</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DOP	4-Deoxypyridoxin
ECM	extrazelluläre Matrix
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EPDC	<i>epicardium derived cells</i>
EpiSC	epikardiale stromale Zellen
Ery	Erythrozyten
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FSTL1	Follistatin-like 1
gc	<i>genome copies</i>
GEM	Gel-Beads in Emulsion

GFP	grün fluoreszierendes Protein
HA	Hämagglutinin
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IC	Immunzellen
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
i.v.	intravenös
KHK	koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyozyten
LAD	<i>left anterior descending coronary</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography/tandem mass-spectrometry</i>
LOX	Lysosyl-Oxidase
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MS	Massenspektrometrie
NF-κB	<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NSTEMI	<i>non-ST-elevation myocardial infarction</i>
OD	optische Dichte

PAI	Proteinaseinhibitor
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
pMI	post-Myokardinfarkt
Postn	Periostin
RA	Retinolsäure
RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
s.c.	subcutan
scRNAseq	Einzelzell-RNA-Sequenzierung
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
SV40	Simian Virus 40 Polyadenylierungssequenz
Tβ4	Thymosin-beta 4
Tbx18	T-Box-Transkriptionsfaktor 18
Tcf21	Transkriptionsfaktor 21
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP-1	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinase 1</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNC	Tenascin-C
U	<i>Unit</i>
UMAP	<i>Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction</i>
UMI	<i>Unique Molecular Identifier</i>
UPRT	Uracil-Phosphoribosyltransferase
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

VIM	Vimentin
WT-1	Wilms-Tumor-Protein 1
YFP	gelb fluoreszierendes Protein

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Publikationen	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Inhaltsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Der Myokardinfarkt	1
1.1.1 Entstehung eines Myokardinfarktes	1
1.1.2 Wundheilung nach Myokardinfarkt	3
1.2 Epikardiale stromale Zellen	6
1.2.1 Das Epikard in der Herzentwicklung	6
1.2.2 Aktivierung epikardialer Zellen nach Myokardinfarkt	7
1.3 Herzheilung nach Myokardinfarkt	8
1.3.1 Potential von EpiSCs zur Herzheilung	9
1.3.2 Rolle von S1P bei der Herzheilung	10
1.3.3 Einfluss von Thymosin-beta 4	11
1.4 Zielsetzung	13
2. Material	14
2.1 Geräte und Apparaturen	14
2.2 Puffer und Medien	14
2.3 Antikörper und Sonden	15
2.4 Software	16
3. Methoden	18
3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	18
3.1.1 Wildtyp-Mauslinie	18
3.1.2 Transgene Mauslinien	18
3.2 Induktion des Herzinfarkts	19
3.3 Transduktion von Tβ4 mittels eines AAV9	20
3.4 <i>In vivo</i>-Biolumineszenzmessung	21
3.5 Quantitative Bestimmung von Tβ4 in Serum und Herzgewebe	22
3.6 S1P-Anreicherung	23
3.7 Zellisolation	23
3.8 Zellsortierung	24
3.8.1 Magnetische Zellsortierung	24

3.8.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung	25
3.9	Histologie	25
3.9.1	Kryoschnitte.....	26
3.9.2	Paraffinschnitte	26
3.9.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	26
3.9.4	Immunhistochemiefärbung.....	27
3.9.5	RNA-in situ-Hybridisierung	29
3.10	Massenspektrometrie.....	29
3.11	Einzelzell-RNA-Sequenzierung.....	30
3.11.1	Sequenzierung und Datenverarbeitung.....	30
3.11.2	Filtern und Clustern der Datensätze	31
3.11.3	Vergleich von Clusteranalysen mit unterschiedlichen Konditionen.....	32
3.12	Statistische Auswertung.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Charakterisierung der Heterogenität von EpiSCs	34
4.1.1	Lokalisation der EpiSC-Cluster nach Infarkt.....	34
4.1.2	Vergleich von EpiSCs an Tag 5 und 21 nach Infarkt	39
4.1.2.1	Einordnung der Cluster.....	39
4.1.2.2	Charakterisierung der Cluster	41
4.1.2.3	Vergleich der Genexpression an Tag 5 und 21 nach Infarkt.....	47
4.1.3	Expression von WT-1 im Epikard zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt	50
4.2	Einfluss von S1P auf die Herzheilung	51
4.2.1	Lipidomics-Analyse von EpiSCs und aCFs nach Infarkt	53
4.2.2	Lineage-Tracing der EpiSCs nach S1P-Anreicherung nach Infarkt	55
4.3	Einfluss von T β 4 auf die Herzheilung	56
4.3.1	Charakterisierung der T β 4-Überexpression mit AAV9.....	57
4.3.2	Auswirkungen der T β 4-Überexpression auf WT-1-exprimierende Zellen.	60
4.3.3	Genexpressionsanalyse von EpiSCs bei T β 4-Überexpression 5 Tage nach Infarkt	61
4.3.3.1	Einordnung der Cluster	62
4.3.3.2	Charakterisierung der Cluster.....	63
4.3.3.3	Einfluss der T β 4-Überexpression auf die Genexpression von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt.....	68
4.3.4	Genexpressionsanalyse von EpiSCs bei T β 4-Überexpression 14 Tage nach Infarkt.....	72

4.3.4.1	Einordnung der Cluster	72
4.3.4.2	Charakterisierung der Cluster	74
4.3.4.3	Einfluss der Tβ4-Überexpression auf die Genexpression von EpiSCs 14 Tage nach Infarkt	79
5	Diskussion	83
5.1	Heterogenität des Epikards	83
5.1.1	Zusammenhang zwischen Lokalisation und Zellcharakterisierung	84
5.1.2	Zelluläre und funktionelle Heterogenität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt	85
5.1.3	WT-1-Expression nach Infarkt	90
5.2	EpiSCs in der Herzheilung nach Myokardinfarkt	91
5.2.1	Rolle von EpiSCs bei der Herzheilung nach Myokardinfarkt unter Einfluss von S1P	91
5.2.2	Rolle von EpiSCs bei der Herzheilung nach Myokardinfarkt unter Einfluss von T β 4	92
5.3	Ausblick	95
6.	Literaturverzeichnis	97
7.	Appendix	107
8.	Danksagung	109
9.	Eidstattliche Erklärung	111

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Das menschliche Herz, ein muskuläres Hohlorgan von der Größe einer Faust und der Form eines abgerundeten Kegels¹, versorgt alle lebenswichtigen Organe des Körpers mit Blut und dadurch mit Energie und Sauerstoff². Es teilt sich in vier Binnenräume auf: Venöses Blut gelangt zunächst in das rechte Atrium und von dort in den rechten Ventrikel. Nach Oxygenierung in der Lunge erreicht das Blut das linke Atrium und von dort den linken Ventrikel. Die Koronararterien versorgen das Herz mit Sauerstoff, sodass bei einem Gesunden selbst bei erhöhtem Sauerstoffverbrauch das Myokard nicht ischämisch wird^{1,3}. Das Herz ist auf eine kontinuierliche Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen angewiesen, sodass dem kardiovaskulärem System und seinen Erkrankungen eine zentrale Rolle zukommen². Der Myokardinfarkt (MI) stellt dabei die Haupttodesursache weltweit dar⁴. In Deutschland lag im Jahr 2020 bei 5,8 % der Erwachsenen eine koronare Herzkrankheit vor, worunter auch das Auftreten eines Myokardinfarktes und chronische Folgebeschwerden nach einem überstandenen Myokardinfarkt zählen. Dabei war die Prävalenz bei Frauen mit 5,1 % niedriger als bei Männern mit 6,6 %⁵.

1.1.1 Entstehung eines Myokardinfarktes

Der Myokardinfarkt ist definiert als pathologischer myokardialer Zelltod aufgrund einer anhaltenden Ischämie⁶. Eine myokardiale Ischämie stellt damit den ersten Schritt in der Entwicklung eines Myokardinfarktes dar, die aus einer Imbalance des Sauerstoffverbrauchs und -angebots resultiert⁶. Man unterscheidet zwei Kategorien von Myokardinfarkten. Tritt im Elektrokardiogramm eine ST-Erhebung auf, spricht man vom STEMI (*ST-elevation myocardial infarction*). Dabei kommt es zu einer transmuralen Ischämie, welche die komplette Wand des Myokards betrifft. Häufig liegt diesem Ereignis ein Verschluss von einem oder mehreren Koronargefäßen zugrunde. Bei dem NSTEMI (*non-ST-elevation myocardial infarction*) hingegen tritt keine ST-Erhebung auf und der Infarkt durchzieht nicht die gesamte Myokardwand^{1,6}. Zusätzlich zu den genannten Kategorien werden, basierend auf pathologischen, klinischen und prognostischen Unterschieden, 4 weitere Subtypen von Myokardinfarkten unterschieden⁶. Zum einen kann der Myokardinfarkt aufgrund einer koronaren

Herzkrankheit (KHK) entstehen, dem ein Verschluss einer Koronararterie beziehungsweise einem ihrer Äste zugrunde liegt⁷. Auslöser ist eine Ruptur oder Erosion eines arteriosklerotischen Plaque, woraufhin sich ein Thrombus bildet, an den sich Thrombozyten und Leukozyten anlagern, welche daraufhin eine Koronararterie verschließen^{1,6}. Aber auch pathophysiologische Mechanismen, wie Vasospasmen der Koronararterien und Koronardissektionen können Auslöser einer myokardialen Ischämie und damit Ursache eines Herzinfarktes sein^{6,8}. Aufgrund des unzureichenden Blutzufusses in dem nachgeschalteten Myokard entsteht eine sogenannte Koagulationsnekrose^{1,9}. Im Ergebnis führt ein Myokardinfarkt dazu, dass die Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten, KM) aufgrund der anhaltenden Ischämie absterben⁹. Die Größe des infarzierten Bereichs ist von der Lokalisation des Gefäßverschlusses sowie von der Kollateralversorgung abhängig¹.

Eine myokardiale Ischämie führt zu einem verringerten Sauerstoffdruck in den Herzmuskelzellen und anschließendem Ausfall der oxidativen Phosphorylierung mit sistierender ATP-Bildung. Das Fehlen von zellulärem ATP führt zu einem Funktionsverlust der Natriumpumpen, gefolgt von Einströmen von Natrium und Wasser in die Zellen und damit zu einem Anschwellen der Zellen¹⁰. Das Sistieren des aeroben Stoffwechsels und die Akkumulation von Stoffwechselprodukten tritt innerhalb der ersten 10 Sekunden (sek) einer Koronarokklusion auf. Bereits in den ersten 10 – 15 Minuten (min) der Ischämie treten die ersten strukturellen Veränderungen, wie verringertes zelluläres Glykogen, gelockerte Myofibrillen und Risse des Sarkolemms¹⁰, auf. Auch Veränderungen der Mitochondrien können bereits 10 min nach einer koronaren Okklusion beobachtet werden¹¹. Irreversible Schäden der Kardiomyozyten entstehen nach einer 20 - 40 min anhaltenden Ischämie¹⁰. Zellen, die aufgrund der Nekrose absterben, setzen ihren intrazellulären Inhalt frei, wodurch eine Entzündungsreaktion initiiert wird, indem Mechanismen des angeborenen Immunsystems aktiviert werden¹². Die Gewebenekrose aufgrund von myokardialen Zelltod entwickelt sich von dem Subendokard bis zum Subepikard über mehrere Stunden¹³. Eine frühe Reperfusion, also der erneute Blutfluss in die verschlossene Arterie, bewahrt die Viabilität des ischämischen Myokards und reduziert die Infarktgröße. Eine möglichst frühe Diagnose ist daher entscheidend für die Überlebenschance eines Infarktpatienten^{7,9}. Dies beinhaltet eine frühzeitige Reperfusionstherapie, um den ischämischen Gewebsschaden des Myokards zu reduzieren^{14,15}. Die Standardtherapie eines Myokardinfarktes beruht daher auf

Strategien zur Reperfusion des Gewebes¹⁶. Dabei kann es jedoch paradoxerweise auch zu einer Verschlimmerung der Gewebeschädigung, dem sogenannten Reperfusionstrauma, kommen¹⁷.

1.1.2 Wundheilung nach Myokardinfarkt

Die Ischämie während eines Myokardinfarktes führt zu einem massiven Absterben von Kardiomyozyten^{18,19}, die aufgrund der eingeschränkten regenerativen Fähigkeiten des adulten Herzens nicht ersetzt werden können²⁰. Diese Nekrose der Kardiomyozyten leitet eine Entzündungskaskade ein, die dazu führt, dass tote Zellen aus dem Infarktbereich entfernt werden und das beschädigte Gewebe durch Narbengewebe ersetzt wird¹². Die Wundheilung nach Myokardinfarkt kann in drei ineinander übergehende Phasen eingeteilt werden: Die Inflammationsphase, die Proliferationsphase und die Reifungsphase²¹. Dabei spielen kardiale Fibroblasten (CFs) eine wesentliche Rolle. CFs werden als mesenchymale Zellen definiert, die sich im kardialen Interstitium befinden²². Sie sind der im Herzen am häufigsten vorkommende Zelltyp²³. Die Phasen der Wundheilung werden mit verschiedenen Phänotypen der CFs assoziiert¹².

Die Inflammationsphase zeichnet sich durch die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen der Fibroblasten aus, die zu der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten in den Infarktbereich führen, um tote Zellen und Zelldebris zu entfernen^{24,25}. Bei der Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten spielt das Komplementsystem eine entscheidende Rolle²⁶. Das Komplementsystem, welches Teil des angeborenen Immunsystems ist, wird im Zuge der ischämischen myokardialen Gewebeschädigung aktiviert²⁷. Während der Inflammationsphase spielen zudem Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) eine wichtige Rolle, die direkt mit zellulären Lipiden, Proteinen oder DNA interagieren können. Granger *et al.* zeigten, dass ROS in der Chemotaxis von Leukozyten nach Infarkt beteiligt sind²⁸. Zudem können ROS Zytokin- und Chemokinkaskaden über die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) auslösen²⁹⁻³². Die Aktivierung des NF- κ B-Systems stellt einen wesentlichen Schritt in der Entzündungsantwort nach Infarkt dar, indem es die Bildung von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in dem ischämischen Myokard reguliert³³. Gene, die von NF- κ B, einer Familie an Transkriptionsfaktoren, reguliert

werden, sind in der Entzündungsantwort, Zelladhäsion und Wachstumskontrolle involviert³⁴. Neben ROS und dem Chemokin IL-1 β kann das NF- κ B-System auch über Signalwege der Toll-like Rezeptoren (TLR) aktiviert werden. TLRs erkennen molekulare Muster von Pathogenen und werden durch endogene Liganden von beschädigtem Gewebe aktiviert³⁵.

Eine entscheidende Rolle in der Inflammationsphase spielen Chemokine, die Leukozyten in das Infarktareal rekrutieren, welche die Entzündungsreaktion aufrechterhalten und modulieren^{25,36}. Auch Zytokine werden in Zuge der Aktivierung von Zytokinkaskaden in dem infarzierten Myokard induziert und sezerniert, darunter die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6^{37,38}. Genauso wie Chemokine übernehmen Zytokine eine Vielzahl an biologischen Funktionen in der Infarktheilung¹². Zytokine und Wachstumsfaktoren werden von Neutrophilen und Makrophagen während der Wundheilung sezerniert, was zu der Bildung von Granulationsgewebe führt. Zusätzlich entfernen sie tote Zellen und Zelldebris aus dem Infarktbereich¹². Nachdem die Anzahl an Neutrophilen in dem Infarktareal abnimmt, vergrößert sich die Population der Makrophagen, die nun die dominanten Phagozytose-betreibenden Zellen darstellen. Durch Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimulieren sie die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen. Zudem produzieren sie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), welche die noch existierende extrazelluläre Matrix (ECM) degradieren²¹.

In der Proliferationsphase wird die Expression von inflammatorischen Mediatoren gehemmt, während die Wundheilung sowie die Narbenbildung gefördert wird³⁹. Ein Schlüsselmediator in dem Übergang der Inflammationsphase zur Fibrose stellt *Transforming growth factor beta* (TGF- β) dar⁴⁰. TGF- β deaktiviert Makrophagen und inhibiert die Chemokin- und Zytokinsynthese, wohingegen es die Synthese von ECM-Proteine durch Fibroblasten sowie Matrixablagerung fördert⁴¹. Zudem unterdrückt TGF- β die Matrix-Degradierung, indem es die Expression von Proteinase wie Plasminogenaktivatoren und Kollagenasen verringert, aber die Synthese von Proteinaseinhibitoren, wie PAI-1 und *Tissue inhibitors of metalloproteinase 1* (TIMP-1) erhöht^{42,43}. Zudem proliferieren in dieser Phase Fibroblasten und Endothelzellen¹². Neben TGF- β fördern die Faktoren *Fibroblast growth factor* (FGF), Angiotensin II und *Platelet derived growth factor* (PDGF) die aCF-Proliferation⁴⁴⁻⁴⁶. Fu *et al.* konnten in einer Studie zwei dynamische Stadien von CFs nach Infarkt unterscheiden. Während sie Periostin (POSTN) exprimierende aktivierte Fibroblasten (aCFs) an Tag 2 - 4 nach

Infarkt identifizieren konnten, differenzierten sie sich an Tag 3 – 7 in α -SMA⁺-Fibroblasten, die das kontraktile Protein *α -Smooth muscle actin* (α -SMA) exprimieren und als Myofibroblasten bezeichnet werden⁴⁷. Die aCFs proliferieren und sezernieren anti-inflammatorische und proangiogene Faktoren. Durch die Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, wie Periostin (POSTN), Tenascin-C und Kollagenen (COL1A1 oder COL3A1)⁴⁸, bauen sie eine neue ECM auf^{25,49}. aCF stellen den vorwiegenden Zelltyp des Granulationsgewebes dar und werden apoptotisch, wenn das Narbengewebe reift^{50,51}. Zudem wird ein mikrovaskuläres Netzwerk gebildet. Die neu gebildeten Gefäße stellen einen wichtigen Bestandteil des Granulationsgewebes dar und werden für die Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen der hochdynamischen und metabolisch aktiven Zellen der Wundheilung benötigt. Die Freisetzung angiogener Wachstumsfaktoren, wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), induzieren das Wachstum neuer Gefäße^{52,53}.

In der nächsten Phase erfolgt die Reifung der Narbe. Dabei werden Fibroblasten und Endothelzellen apoptotisch und es bildet sich eine auf Kollagenen basierende Narbe¹². Enzyme, wie Lysosyl-Oxidase (LOX), werden im Infarktareal induziert und führen zu einer Quervernetzung (*Crosslinking*) des Kollagens, sodass die Stabilität und Dehnbarkeit der Narbe erhöht wird^{54,55}. In der frühen Reifungsphase produzieren Fibroblasten weiterhin anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, und pro-fibrotische Faktoren, wie TGF- β 1. Nun nimmt die Anzahl der aCFs ab und die Fibroblasten gehen in einen Phänotyp über, der die Narbenreifung und Homöostase in dem remodelliertem Myokard fördert⁴⁹. Fu *et al.* beschrieben diesen Fibroblasten-Phänotyp als Matrifibrozyten, die sich 7-10 Tage nach Infarkt bilden und Matrixmoleküle wie Chondroadherin (CHAD), Cartilage intermediate layer protein 2 (CILP2) und Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) exprimieren⁴⁷ (*formale Änderung nach Anmerkung von Prof. Dr. Scheller: „Unterschiedliche Schriftarten/Größen auf Seite 5“*).

Die Wundheilung nach Infarkt geht mit molekularen und zellulären Veränderungen sowie Veränderungen der ventrikulären Struktur einher, was auch als Remodellierung des Ventrikels bezeichnet wird¹². Eine pathologische Remodellierung geht mit einem vergrößerten, umgeformten Ventrikel und einer verschlechterten Herzfunktion einher. Dies wird mit einer geringeren Prognose nach Herzinfarkt assoziiert und kann letztendlich zu Herzversagen führen¹². Andererseits bietet das während der

Remodellierung aufgebaute Netzwerk aus ECM mechanische Stabilität und verringert eine Ausweitung des Infarktes¹².

1.2 Epikardiale stromale Zellen

Das Epikard ist anatomisch gesehen Teil des Perikards und bezeichnet die äußere Zellschicht des Herzens, bestehend aus Zellen mesothelialer Herkunft^{56,57}. Während sich das Epikard im adulten Herzen in einem ruhenden Zustand befindet, wird es nach Myokardinfarkt aktiviert. Die epikardialen Zellen proliferieren und bilden eine Multizellschicht aus epikardialen stromalen Zellen (EpiSCs)^{57,58}.

1.2.1 Das Epikard in der Herzentwicklung

In der frühen Entwicklung besteht das embryonale, schlauchförmige Herz nur aus zwei Schichten, dem Myokard und dem Endokard. Das Epikard entsteht aus dem sogenannten Proepikard, einer extrakardialen, mesothelialen Zellpopulation⁵⁹. In der Maus wird das Proepikard ab dem Embryonaltag 8.5 sichtbar⁶⁰. Das Proepikard besteht aus einer äußeren Schicht, die sich aus Wilms' Tumor 1 (*Wt1*)-exprimierenden Epithelzellen zusammensetzt, und einem inneren Kern aus ECM, in der sich mesenchymalen Zelltypen sowie Endothelzellen befinden⁶¹. Zusammen mit dem T-Box-Transkriptionsfaktor 18 (*Tbx18*) und dem Transkriptionsfaktor 21 (*Tcf21*) dient *Wt1* als Marker für das Proepikard und später in der Entwicklung für epikardiale Zellen^{62,63}. Sobald das embryonale Herz eine Schleife gebildet hat, bildet sich eine epikardiale Schicht aus den Zellen des Proepikards, die das Herz umgibt⁶⁴. Am Embryonaltag 11.5, wenn das Epikard das Herz komplett bedeckt, konnten mehrere epikardspezifische Proteine identifiziert werden, darunter WT-1⁶⁵, TBX18⁶⁶, TCF21⁶⁷, GATA5⁶⁸ und Zytokeratin⁶⁹, die aber nicht unbedingt in den selben Zellen exprimiert werden. Hierbei ist noch unklar, ob die verschiedenen Zellpopulationen unterschiedliche Stadien der Differenzierung repräsentieren oder ob es sich um bestimmte Populationen mit spezifischen Fähigkeiten handelt⁵⁶. Sobald das Epikard ausgebildet ist, durchläuft ein Teil der epikardialen Zellen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT)⁷⁰, bei dem sie sich in mesenchymale Vorläuferzellen, den *epicardium derived cells* (EDPCs), differenzieren. Von dem Subepikard aus migrieren EPDCs in das myokardiale Interstitium, wo sie sich in verschiedene Zelltypen differenzieren und damit zur Entwicklung und Reifung des Myokards beitragen⁷¹. Dazu zählt die Differenzierung in interstitielle und adventitielle

Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskulaturzellen^{64,72,73}. Die Differenzierung der EPDCs in Kardiomyozyten wurde unter anderem von der Forschungsgruppe Zhou *et al.* beschrieben, gilt jedoch in der Literatur als umstritten^{65,74}. Die epikardialen Zellen des embryonalen Herzens tragen durch die Produktion parakriner Faktoren sowohl zum Wachstum und zur Differenzierung des Herzmuskels als auch zu der Entwicklung der Koronargefäße bei^{75,76}.

1.2.2 Aktivierung epikardialer Zellen nach Myokardinfarkt

Im adulten Herzen besteht das Epikard aus einer ruhenden Einzelzellschicht, in der die epikardialen Gene *Wt1*, *Raldh2* und *Tbx18* deutlich runterreguliert und in der 3 Monate alten Maus kaum detektierbar sind⁷⁷. Während die *Wt1*-Expression im Embryo in 90 % der epikardialen Zellen detektiert werden kann, wird *Wt1* im adulten, gesunden Herzen von weniger als 25 % der epikardialen Zellen exprimiert, die zudem keine Migration ins Myokard aufzeigen⁷⁸. Nach Infarkt jedoch wird das Epikard reaktiviert, die EpiSCs proliferieren, durchlaufen EMT und migrieren^{70,79}. Innerhalb der ersten Tage nach Infarkt werden die embryonalen Genprogramme teilweise reaktiviert, sodass die epikardialen Gene *Wt1*, *Raldh2* und *Tbx18* wieder hochreguliert werden^{78,80,81}. An Tag 5 nach Infarkt erreicht die Expression dieser Gene ihr Maximum, nimmt aber ab Tag 14 nach Infarkt wieder ab⁷⁸. Dass die Hochregulierung der Gene nicht nur in dem Bereich des Infarktareals, sondern im gesamten Epikard auftritt, lässt sich womöglich auf die Sezernierung von spezifischen Faktoren in die Perikardflüssigkeit zurückführen^{80,82}. Wie die Aktivierung des Epikards auf Transkriptionsebene reguliert wird, ist bisher unklar. Vermutlich spielt aber die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren hierbei eine Rolle⁸¹.

Innerhalb der ersten 3 Tage nach Infarkt wird das Epikard, welches vor allem im Bereich über dem Infarktareal nicht mehr nachweisbar ist, neu aufgebaut⁵⁸. Dabei proliferieren noch vorhandene epikardiale Zellen, insbesondere die WT1⁺-EpiSCs, sodass sich ein mehrschichtiges, bis zu 50-70 µm dickes Epikard bildet^{58,78}. Neben embryonalen epikardialen Genen werden im Zuge der Epikardaktivierung auch Gene von EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren, wie *Smad1*, *Snail*, *Slug* oder *Twist*, hochreguliert^{58,78}. Die Forschungsgruppe van Wijk *et al.* konnte nachweisen, dass EpiSCs, die EMT-Marker exprimierten, verantwortlich für die Bildung des subepikardialen Mesenchyms sind⁵⁸.

Ob EpiSCs die Fähigkeit besitzen, in das beschädigte Gewebe zu migrieren, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Während einerseits eine Migration der WT-1⁺-EpiSCs in das Myokard mittels Lineage-Tracing Versuchen nicht bestätigt werden konnte^{78,83}, konnten andere Forschungsgruppen die Migration von EpiSCs in den Infarktbereich beobachten^{77,84,85}. Die unterschiedlichen Beobachtungen sind vermutlich auf technische Gegebenheiten und verschiedene Methoden zurückzuführen⁵⁶. Ähnlich wie im embryonalen Herzen können sich auch die epikardialen Zellen des adulten, infarzierten Herzens in andere Zelltypen differenzieren. Dabei differenziert sich der Großteil der Zellen in Fibroblasten, aber auch in glatte Muskelzellen und Perizyten^{58,78,83,85–87}. Unter bestimmten Gegebenheiten konnte auch eine Differenzierung in Endothelzellen und Kardiomyozyten beobachtet werden^{77,85} (siehe 1.3.3).

Da sich die nach Infarkt gebildeten EpiSCs in ihrer Markerexpression unterscheiden, werden sie als eine heterogene Zellpopulation angesehen⁸⁸. In durchflusszytometrischen Analysen von EpiSCs der Forschungsgruppe Bollini *et al.* konnten nach Infarkt drei Subpopulationen identifiziert werden, die kardiale Vorläufer- und mesenchymale Stammzellmarker exprimierten und eine unterschiedliche Expression der Gene *Sca-1*, *Cd44* und *Cd90* aufwiesen⁸⁸. In Transkriptomanalysen von EpiSCs, die von unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnten 5 Tage nach Infarkt sogar 11 transkriptionell unterschiedliche Zellcluster unterschieden werden⁸⁹. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Begriff „epikardiale stromale Zellen/EpiSCs“ umfasst alle stromalen Zellen des Epikards und Subepikards.

1.3 Herzheilung nach Myokardinfarkt

Da die Schädigung des Herzmuskels nach einem Infarkt irreversibel ist und Kardiomyozyten des adulten Herzens nicht wieder in den Zellzyklus eintreten können, um das nekrotische Gewebe zu ersetzen, wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte verschiedene Strategien mit dem Ziel entwickelt, die Herzheilung zu fördern. Hierzu zählt die Stimulation der Kardiomyozytenproliferation, die Verwendung von Stammzellen oder aus Stammzellen generierte Kardiomyozyten, die Modellierung der Gewebsheilung mittels Therapeutika oder auch die Applikation von viralen Vektoren und biotechnologisch hergestellten Patches^{90–92}. In einer weiteren Strategie liegt der Fokus auf der Heilung des kardiovaskulären Gewebes mithilfe von Vorläuferzellen, die

durch die Bildung neuer Gefäße den Blutfluss aufrecht erhalten, oder auch die Entzündungsreaktion und die Fibrose nach Infarkt modulieren sollen⁷⁹.

1.3.1 Potential von EpiSCs zur Herzheilung

Neben ihrer Fähigkeit, sich nach Aktivierung in andere Zelltypen zu differenzieren, können EpiSCs auch über parakrine Prozesse zur Herzheilung beitragen⁵⁶. Zhou *et al.* zeigten, dass EpiSCs parakrine Faktoren sezernieren, die unter anderem die Angiogenese fördern. Zudem wiesen sie in Versuchen an der Maus nach, dass nach Injektionen von EpiSC-konditioniertem Medium in das infarzierte Herz die Infarktgröße reduziert und die Herzfunktion verbessert wurde⁷⁸. Der proangiogene Effekt konnte auch bereits bei humanen EpiSCs festgestellt werden, die in das infarzierte Mäuseherz injiziert wurden und dort die Vaskularisierung verbesserten. Nach der Injektion konnte ebenfalls eine verbesserte Herzfunktion und eine verringerte Remodellierung des Ventrikels beobachtet werden⁹³. Daneben sezernieren EpiSCs nach Aktivierung auch parakrine Faktoren, die potenziell mitogen auf Kardiomyozyten wirken^{94,95}. Hierzu zählen unter anderem Follistatin-like 1 (FSTL1), Retinolsäure (RA) und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGFs), welche die Kardiomyozytenproliferation fördern^{96,97}. Bei der Ko-Kultivierung von EpiSCs und Kardiomyozyten konnte eine erhöhte Kardiomyozytenproliferation und -differenzierung festgestellt werden^{98,99}. Nach bisherigem Stand der Charakterisierung der EpiSCs erfüllen sie zudem teilweise Eigenschaften, die auch multipotente Vorläuferzellen aufweisen. Hierzu zählt die Expression embryonaler Gene, die Proliferation nach Gewebeschädigung und ihre Fähigkeit, sich in andere Zelltypen zu differenzieren⁵⁶. Darüber hinaus exprimieren einige Zellen des adulten Herzens Stammzellmarker, wie die Rezeptor-Tyrosinkinase *c-Kit* oder das Stammzellantigen *Sca-1* an der Zelloberfläche^{100,101}. Insgesamt können demnach EpiSCs die Herzheilung nach Infarkt durch die Differenzierung in andere Zelltypen oder die Produktion und Sekretion von parakrinen Faktoren, aber auch von Chemokinen fördern. Wie die zelluläre Antwort des Epikards nach Herzinfarkt optimiert werden kann, um die Herzheilung zu verbessern, ist derzeit Gegenstand aktueller Forschung⁵⁶. Abbildung 1 zeigt, wie EpiSCs zur Wundheilung nach Infarkt beitragen können.

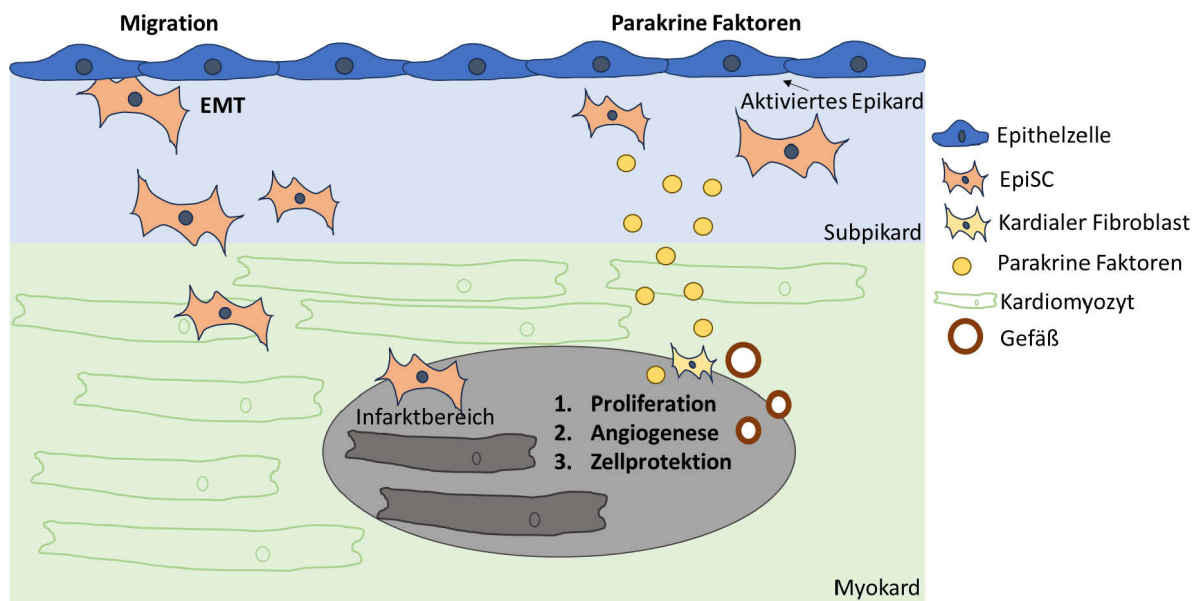


Abbildung 1: Mögliche Beiträge der epikardialen stromalen Zellen (EpiSCs) zur Wundheilung nach Infarkt. Aktivierte Epikardzellen durchlaufen epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und bilden EpiSCs, die in geringem Umfang in den Infarktbereich migrieren und sich in Fibroblasten und glatte Muskulaturzellen differenzieren können. EpiSCs tragen zur Wundheilung bei, indem sie parakrine Faktoren sezernieren, die Zellproliferation und Angiogenese fördern und protektiv auf Kardiomyozyten wirken. Die Abbildung wurde nach Smits *et al.* modifiziert⁵⁶.

1.3.2 Rolle von S1P bei der Herzheilung

Zu medikamentös beeinflussbaren Zielstrukturen, die die Herzremodellierung nach Infarkt, unabhängig von der Revaskularisierung und Infarktgröße, verbessern können, ist bisher wenig bekannt. Ein vielversprechendes Ziel aktueller Forschung stellt der Signalweg von Sphingosin-1-Phosphat (S1P) dar, ein bioaktives, endogenes Sphingolipid. S1P wird durch die Phosphorylierung von Sphingosin, katalysiert durch Sphingosinkinasen, generiert^{102,103}. S1P kann entweder über spezifische S1P-Phosphatasen zurück zu Sphingosin dephosphoryliert werden oder irreversibel zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin über S1P-Lyase degradiert werden¹⁰⁴. Es gibt fünf G-Protein-gekoppelte Rezeptoren für S1P (S1P1-5), von denen die Rezeptoren S1P1-3 ubiquitär exprimiert sind¹⁰⁵. Wird S1P an der Plasmamembran gebildet, kann es von der Zelle exportiert werden und sowohl auf eine autokrine als auch parakrine Weise wirken¹⁰⁶. Der S1P-Signalweg beeinflusst vielfältige zelluläre Eigenschaften, wie Zelladhäsion, -migration, -proliferation und -differenzierung. Auch an der Organentwicklung oder der Regulierung des Immunsystems und des kardiovaskulären Systems ist der S1P-Signalweg beteiligt^{107,108}. Im Herzen trägt der S1P-Signalweg zur

Regulierung der Chronotropie und Inotropie des Herzens sowie zur Kardioprotektion und der Herzremodellierung nach Infarkt bei¹⁰⁸. So konnte in isoliert perfundierten Herzen neonataler Ratten eine Vorbehandlung mit S1P die Herzfunktion nach Infarkt signifikant erhöhen¹⁰⁹. Zudem konnte beobachtet werden, dass *High Density Lipoprotein* (HDL), der Hauptträger von S1P im Serum, Kardiomyozyten vor hypoxischem Schaden schützt und dieser Effekt von den Rezeptoren S1P1 und S1P3 abhängig ist^{110–112}. Ebenso konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie von Polzin *et al.* eine verbesserte Herzfunktion und Infarktheilung, unabhängig von der Infarktgröße, durch S1P festgestellt werden¹¹³. S1P wurde in den Versuchen über die Verabreichung des S1P-Lyasehemmers 4-Desoxypyridin (DOP) endogen angereichert. Dabei konnte der Effekt von S1P dem S1P1-Rezeptor von Kardiomyozyten zugeordnet werden. Polzin *et al.* identifizierten demnach S1P1 als vielversprechendes Ziel in der Behandlung nach Infarkt¹¹³. Zudem vermuteten sie einen möglichen parakrinen Effekt durch einen Crosstalk mit anderen Zelltypen, was jedoch noch weiter erforscht werden muss¹¹³. Welche Rolle EpiSCs dabei spielen, ist bisher noch nicht bekannt.

1.3.3 Einfluss von Thymosin-beta 4

Um die Herzheilung nach Infarkt über die Antwort der EpiSCs auf Gewebeschaden zu fördern, können die epikardialen Zellen mit exogenen Faktoren stimuliert werden. Ein Faktor, der in eine Vielzahl an pathophysiologischen Mechanismen nach kardialer Ischämie eingreift, ist das Protein Thymosin-beta 4 (T β 4)¹¹⁴. T β 4 ist ein 5 kDa und 43 Aminosäuren großes Protein, das im Zytosol und dem Nukleus vorkommt, aber auch von Zellen sezerniert werden kann^{115–117}. T β 4 wird ubiquitär im Gewebe und in Zellen, mit der Ausnahme von Erythrozyten, exprimiert¹¹⁸. Neben ihrer Bindungs-affinität zu G-Aktin bildet T β 4 auch Komplexe mit F-Aktin¹¹⁵. Aufgrund von verschiedenen Mechanismen, wie Förderung der Angiogenese, Induktion der Endothelzell-differenzierung oder anti-inflammatorische Eigenschaften, kann T β 4 die Wundheilung fördern^{119–121}. Die Forschungsgruppe Bock-Marquette *et al.* konnte 2004 erstmals den kardioprotektiven Effekt von T β 4 nach Myokardinfarkt nachweisen. Demzufolge steigert T β 4 nicht nur die myokardiale und endotheliale Zellmigration im embryonalen Herzen, sondern führte nach schon einer T β 4-Injektion zu einer verbesserten Herzfunktion, Wachstum der Koronargefäße und inhibierter Entzündung

in adulten infarzierten Mäusen^{114,117}. Diese kardioprotektiven Effekte von T β 4 konnten auf eine verbesserte Überlebensrate von Kardiomyozyten und Endothelzellen sowie auf eine verringerte Entzündungsantwort zurückgeführt werden¹²². In einer weiteren Studie von Smart *et al.* in der Maus wurde das Epikard vor Infarkt mit systemischen T β 4-Injektionen konditioniert. Zur Untersuchung der Differenzierung der epikardialen Zellen nach Infarkt wurde eine Reportermauslinie verwendet, mit deren Hilfe WT-1⁺-EpiSCs über die Expression von YFP nachverfolgt werden konnten. Nach der Behandlung mit T β 4 konnte neben einer Reaktivierung der WT-1-Expression eine Differenzierung der WT-1⁺-EpiSCs in Kardiomyozyten beobachtet werden, die mit den umliegenden Zellen elektrisch gekoppelt waren⁷⁷. Zusätzlich wurden YFP⁺-Zellen aus infarzierten, T β 4-behandelten Mäusen isoliert und in das infarzierte Myokard von Wildtypmäusen transplantiert. Auch in den Wildtypmäusen konnten YFP⁺-Zellen gefunden werden, die sich in Kardiomyozyten differenzierten, wobei die Anzahl der differenzierten Kardiomyozyten jedoch sehr gering war⁷⁷. Bollini *et al.* verglichen das Expressionsprofil von embryonalen epikardialen Zellen und adulten infarzierten EpiSCs nach T β 4-Behandlung. Dabei konnten sie eine Population innerhalb der adulten EpiSCs identifizieren, die positiv für die kardialen Vorläuferzellmarker WT-1, SCA-1, CD90^{hi} und CD44^{hi} waren. Daraus schlossen sie, dass T β 4 nach Infarkt eine Population an kardialen Vorläuferzellen im Epikard stimuliert⁸⁸.

Über die Signalwege von T β 4 ist bisher wenig bekannt. Nachgewiesen wurde, dass der kardioprotektive Effekt mit einer Hochregulation der *Integrin-Linked Kinase*- und Proteinkinase B-Aktivität im Herzen einhergeht¹¹⁷. Hinkel *et al.* konnten zudem zeigen, dass T β 4 zu einer Translokation von MRTF-A, einem weiteren Aktin-gebundenen Protein, in den Zellkern und dort zur Transkription der Gene *Ccn1*, einem essentiellen Gen für Angiogenese, und *Ccn2* führt¹²³.

1.4 Zielsetzung

Vor dem oben genannten Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen näher untersucht:

1. Wodurch zeichnet sich die zelluläre Heterogenität von EpiSCs nach Myokardinfarkt aus?

Die zelluläre Heterogenität von EpiSCs wurde mithilfe der Einzelzell-RNA-Sequenzierung analysiert. Basierend auf der vorangegangenen Analyse unserer Arbeitsgruppe von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt wurde ein besonderes Augenmerk auf die Untersuchung der zellulären Lokalisation der identifizierten EpiSC-Populationen mithilfe der RNA-*in situ*-Hybridisierung gelegt. Zusätzlich wurde eine weitere Einzelzell-RNA-Sequenzierung der EpiSCs zu einem späteren Zeitpunkt nach Infarkt (21 Tage nach Infarkt) durchgeführt und die Genexpression der EpiSCs zu beiden Zeitpunkten nach Infarkt verglichen, um Veränderungen der EpiSCs und ihrer Funktionalität über die Zeit nach Infarkt zu untersuchen. Zudem wurde die zelluläre Verteilung des klassischen EpiSC-Markers WT-1 auf Proteinebene zu verschiedenen Zeitpunkten (1, 7, 14, 21 Tage nach Infarkt) mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht.

2. Welche Rolle haben EpiSCs in der Herzheilung unter Einfluss von S1P und T β 4?

Da bereits beschrieben wurde, dass S1P über kardioprotektive Eigenschaften einen Einfluss auf die Herzheilung hat und Vorarbeiten Hinweise auf eine Beteiligung der EpiSCs nahelegten, wurden in diesem Versuchsteil die intrazellulären Sphingolipide von EpiSCs und aCFs nach Infarkt mittels LC-MS Lipidomicsanalyse untersucht. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss einer induzierten S1P-Anreicherung auf die Differenzierung von EpiSCs nach Infarkt näher analysiert.

Um den bekannten Effekt von T β 4 auf die Infarktheilung zu verstärken, wurde T β 4 kardiomyozytenspezifisch mittels AAV9 überexprimiert. Die T β 4-Überexpression wurde zunächst zellbiologisch charakterisiert. Danach wurde die Frage untersucht, welchen Einfluss T β 4 auf die Genexpression und Differenzierung von EpiSCs hat.

2. Material

2.1 Geräte und Apparaturen

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Apparaturen.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Ohaus Europe, PA214 (Greifensee, Schweiz)
Autoklav	F. & M. Lautenschläger, 5169 (Köln, Deutschland)
Gelelektrophoresesystem	Invitrogen, Mini Gel Tank (Waltham, USA)
Heizblock	Eppendorf, Thermomixer compact (Hamburg, Deutschland)
Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Heracell 150 i (Waltham, USA)
IVIS Lumina II	Caliper Life Sciences (Hopkinton, USA)
Kryostat	Leica Biosystems, CM 1850 (Nußloch, Deutschland)
Langendorffapparatur	Werkstatt der Physiologie, Universität Düsseldorf Datenaufzeichnung: ADInstruments Powerlab/16SP (Spechbach, Deutschland) Schlauchpumpe: Abimed, Minipuls3 (Langenfeld, Deutschland)
Mikroskop	Olympus, MX 61 (Hamburg, Deutschland)
MojoSort Magnet	Biolegend (San Diego, USA)
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, NanoDrop 2000 (Waltham, USA)
pH-Meter	Knick, 766 Calimatic (Berlin, Deutschland)
Pipetten	Eppendorf, Research (Hamburg, Deutschland)
Platten-Lesegerät	BMG Labtech, FLUOstar OPTIMA (Ortenberg, Deutschland)
Plattenschüttler	IKA Werke, MTS 2/4 (Staufen, Deutschland)
Realtime-PCR-Gerät	Thermo Fisher Scientific, StepOnePlus (Waltham, USA)
Sterilwerkbank	Labogene, Scanlaf Mars Pro Cytosafe Class 2 (Lillerod, Dänemark)
UPLC	Waters Corporation (Milford, USA)
Vortexer	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Zentrifugen	Beckman Coulter, Allegra X-30R (Brea, USA) Eppendorf, 5415R and 5424R (Hamburg, Deutschland) Thermo Fisher Scientific, Heraeus Megafuge 16R (Waltham, USA)
10X Chromium Single Cell Gene Expression Solution	10X Genomics (Pleasanton, USA)

2.2 Puffer und Medien

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

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Medien und deren Zusammensetzungen.

Medium/Puffer	Zusätze	Konzentration	Hersteller
Blocking Puffer	PBS Saponin Normal Goat Serum	- 0,2 % 5 %	-
Zellkulturmedium	DMEM High Glucose FCS Penicillin/Streptomycin Pyruvat	 20 % 1 % 1 %	Sigma Aldrich (Darmstadt) PAN-Biotech (Aidenbach) Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Puffer für Durchfluss- zytometrie	PBS BSA EDTA	- 2 % 1 mM	-
Laufpuffer A	ddH ₂ O Acetonitril TEAA (pH 7)	 3 % 0,1 M	-
Laufpuffer B	ddH ₂ O Acetonitril	 90 %	-
PBS	-	-	Carl Roth (Karlsruhe)
Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	PBS Saponin	- 0,2 %	- Carl Roth (Karlsruhe)

2.3 Antikörper und Sonden

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper und weitere Marker für die Immunfluoreszenzfärbung.
Verwendung: Immunfluoreszenzfärbungen (IF), Immunhistochemie-Färbungen (IHC) und Durchfluss-
zytometrische Zellsortierung (Flow).

Spezifität	Klon	Herkunft	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
ACTN2	EA-53	Maus	IHC, IF	1:200	Sigma-Aldrich
α-SMA	Polyklonal	Kaninchen	IF	1:100	Abcam
CD31	Mec 13.3	Ratte	Flow	1:100	BD Biosciences
CD45	30-F11	Ratte	Flow	1:400	BD Biosciences
cTnT	Polyklonal	Kaninchen	IF	1:200	Invitrogen
Fixable Viability Dye eFluor 780	-	-	Flow	1:2000	eBioscience
HA-Tag	16.43	Ratte	IF	1:200	Novus Biologicals
HA-Tag	Polyklonal	Kaninchen	IF	1:200	Invitrogen
Phalloidin (Alexa Fluor 488)	-	<i>Amanita Phalloides</i>	IF	1:250	Invitrogen
POSTN	Polyklonal	Kaninchen	IF	1:100	OriGene Technologies
RFP	5F8	Ratte	IF	1:200	ChromoTek
RFP	GT1610	Maus	IHC, IF	1:100	Sigma-Aldrich
RFP	Polyklonal	Kaninchen	IF	1:50	Novus Biologicals
TNC	4C8MS	Maus	IF	1:50	IBL International
VIM	EPR3776	Kaninchen	IF	1:100	Abcam

WT-1	CAN-R9(IHC)-56-2	Kaninchen	IF	1:50	Abcam
------	------------------	-----------	----	------	-------

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen (IF).

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Herkunft	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Alexa Fluor 488	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-Kaninchen-IgG	Alexa Fluor 594	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-Maus-IgG	Alexa Fluor 488	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-Maus-IgG	Alexa Fluor 594	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-Ratte-IgG	Alexa Fluor 488	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen
Anti-Ratte-IgG	Alexa Fluor 594	Polyklonal	Ziege	IF	1:1000	Invitrogen

Tabelle 5: Verwendete Sonden für die RNA-*in situ*-Hybridisierung des Hersteller Advanced Cell Diagnostics (Hayward, USA).

Sonde	Katalognr.	Beschreibung
Mm-Msln	443241	Mus musculus mesothelin (Msln) mRNA
Mm-Wt1	432711	Mus musculus Wilms tumor 1 homolog (Wt1) mRNA
Mm-Cd44	479191	Mus musculus CD44 antigen (Cd44) transcript variant 1 mRNA
Mm-Ifit3	508251	Mus musculus interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (Ifit3) mRNA
Mm-Cxcl10	408921	Mus musculus chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10) mRNA
Mm-Sfrp2	400381	Mus musculus secreted frizzled-related protein 2 (Sfrp2) mRNA
Mm-Pcsk6	593361	Mus musculus proprotein convertase subtilisin/kexin type 6 (Pcsk6) transcript variant 1 mRNA
Mm-Top2a	491221	Mus musculus topoisomerase (DNA) II alpha (Top2a) mRNA
Mm-Dkk3	400931	Mus musculus dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (Dkk3) mRNA
Mm-Gatm	586441	Mus musculus glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase) (Gatm) mRNA
Positivkontrolle Mm-Ppib	313911	Mus musculus Peptidylprolyl Isomerase B (Ppib) mRNA
Negativkontrolle DapB	310043	Bacillus subtilis Dihydrodipicolinat Reduktase

2.4 Software

Zur Erstellung der vorliegenden Arbeit wurden folgende Programme verwendet:

- Microsoft Word, Excel und PowerPoint (Microsoft Corporation (2021); Microsoft Office)

- Inkscape (Inkscape Project (2020), verfügbar auf: <https://inkscape.org>).
- Graphpad Prism (GraphPad Prism Version 7 für Windows, GraphPad Software (San Diego, California, USA))

Weitere verwendete Computerprogramme werden in der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt.

3. Methoden

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere wurden in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und mit Standardfutter und Wasser *ad libitum* versorgt. Alle Tierversuche erfolgten gemäß der Tierschutzverordnung und wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt.

3.1.1 Wildtyp-Mauslinie

Versuche an Wildtyp-Mäusen wurden mit C57BL/6J Tieren von Janvier (Le Genest Isle, Frankreich) durchgeführt, die bis zum Beginn der Versuche in der ZETT und anschließend in den Laborräumen des Instituts für Molekulare Kardiologie gehalten und versorgt wurden. Es wurden 8 bis 12 Wochen alte männliche Versuchstiere verwendet.

3.1.2 Transgene Mauslinien

Die verwendeten transgenen Tiere wurden in der ZETT gezüchtet und dort bis zum Versuchsbeginn und während der Versuche gehalten. Alle transgenen Tiere wurden vor ihrer Verwendung über Ohrstanzen-Biopsien genotypisiert. Die Genotypisierungen wurden mittels Real-Time-PCR von dem Dienstleister Transnetyx (Cordova, USA) durchgeführt.

Zur Nachverfolgung von EpiSCs und zur Identifizierung einer möglichen Zelldifferenzierung wurden die transgenen Reportermauslinien $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ und $Wt1^{CreERT2}UPRT$ genutzt. Diesen Mauslinien exprimieren jeweils ein Reporterprotein, das rot-fluoreszierende Protein TdTomato der $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Linie bzw. die Uracil-Phosphoribosyltransferase (UPRT) der $Wt1^{CreERT2}UPRT$ -Linie, spezifisch in EpiSCs.

Für beide Mauslinien wurde ein transgener Mausstamm, welcher die Cre-Rekombinase mit mutiertem Östrogenrezeptor (ERT) unter einem Zelltyp-spezifischen Promotor exprimiert, mit einem Mausstamm verpaart, der das Gen des Reporterproteins trägt. Im Fall der $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Linie wurde das TdTomato-

Gen am Gt(ROSA)26Sor-Lokus inseriert wurde. Zur Generierung der $Wt1^{CreERT2}UPRT$ -Linie wurde die Mauslinie B6;D2-Tg(CAG-GFP,-Uprt)985Cdoe/J (stock no. 021469; Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA), die uns freundlicherweise von Dr. med. Mirko Völkers (Uniklinik Heidelberg) zu Verfügung gestellt wurde, mit der $Wt1^{CreERT2}$ -Linie in der ZETT verpaart. Für die EpiSC-spezifische Reporterexpression in beiden Mauslinien wird die Cre-Rekombinase unter dem Promotor von $Wt1$ exprimiert. In beiden Reportermauslinien wird die Cre-Aktivität über den mutierten Östrogenrezeptor durch Tamoxifen, einem Östrogenanalogon, induziert. Vor dem TdTomato- bzw. dem UPRT-Gen ist ein mit loxP-Seiten flankiertes Stop-Codon geschaltet. Nach Gabe von Tamoxifen transloziert die Cre-Rekombinase in den Zellkern, wo sie spezifisch die loxP-flankierten Sequenzen erkennt und das zwischenliegende Stop-Codon entfernt¹²⁴. Hierdurch kommt es zur Transkription des TdTomato- bzw. des UPRT-Gens in $WT-1^+$ -Zellen. Im Fall der $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Linie werden die $WT-1^+$ -Zellen durch das fluoreszierende TdTomato-Protein markiert, sodass $WT-1$ -exprimierende Zellen sowie aus ihnen entstandene Zellen im Mäuserzen verfolgt werden können (Lineage Tracing). Auch die $Wt1^{CreERT2}UPRT$ -Linie kann zum Lineage Tracing der $WT-1$ -exprimierenden Zellen verwendet werden. Für die Versuche wurden $Wt1^{CreERT2}$ -heterozygote und $ROSA^{tdTomato}$ - bzw. $UPRT$ -homozygote Tiere genutzt. Zur Induktion der Cre-Rekombinase erfolgten intraperitoneale Injektionen von Tamoxifen (2 mg in Sesamöl) entsprechend eines publizierten Protokolls⁷⁷ 5 und 3 Tage vor Infarkt.

3.2 Induktion des Herzinfarkts

Um die Bedingungen eines Myokardinfarktes mit anschließender Reperfusion im Menschen bestmöglich im Mausmodell darzustellen, wurde das Mäuseherz für 50 min einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion ausgesetzt. Dabei wurde 30 Minuten vor Induktion des Herzinfarkts gewichtsadaptiert Buprenorphin (0.1 mg/kg) subcutan (s.c.) zur Schmerzbekämpfung verabreicht. Für die Induktion des Herzinfarktes wurden die Tiere mit 1,5 % Isofluran, nach vorherigem Anfluten mit 2-3 % Isofluran, in medizinischer Umgebungsluft (80 % N_2 , 20% O_2) narkotisiert und intubiert (Vasofix Braunüle 20 G). Das Tier wurde auf eine Wärmeplatte mit rektaler Temperaturregulation positioniert und mittels zweier Elektroden wurde ein permanentes EKG (der Abl. II nach Eindhoven entsprechend) abgeleitet.

Anschließend wurde der Thorax geöffnet und mit einem 7/0 Prolene-Faden die linke vordere absteigende Koronararterie (*left anterior descending coronary artery*, LAD) für 50 min ligiert. Hiernach erfolgte die Reperfusion durch Lösen der Ligatur und der schichtweise Wundverschluss sowie die Desinfektion der Wunde.

Als Versuchskontrolle wurden Sham-Operationen durchgeführt, die analog zur Infarktoperation durchgeführt wurden. Anstatt der Ligatur der LAD wurde der geöffnete Thorax dabei jedoch ohne Induktionen eines Infarktes nach 10 min wieder verschlossen. Die Infarkt-Operationen wurden freundlicherweise von Dr. med. Zhaoping Ding durchgeführt.

3.3 Transduktion von T β 4 mittels eines AAV9

Um eine herzspezifische Überexpression des Proteins T β 4 zu erreichen, wurde eine Transduktion mit einem spezifisch designten Adeno-assoziierten Virus des Serotyps 9 (AAV9) vorgenommen. Dieses AAV9 erlaubt über die Einbringung eines Transferplasmids die zellspezifische Überexpression von T β 4 in Kardiomyozyten, was daraufhin sezerniert wird. Die Transduktion der Kardiomyozyten kann mithilfe des Reporterproteins Luziferase, welches ebenfalls über das Transferplasmid exprimiert wird, nachverfolgt werden. Das eingesetzte AAV9 (*VB210608-1174bjk*, nachfolgend AAV9-T β 4 genannt) exprimiert über das in die Zellen eingebrachte Transferplasmid murines T β 4, welches dem physiologischen T β 4 entspricht, unter dem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor von kardialem Troponin T (*cardiac Troponin T*, cTnT). Hinter einer nachfolgenden IRES-Sequenz (*internal ribosomal entry site*) wird das Reporterprotein Luziferase zur Kontrolle der Transduktion exprimiert (Abbildung 2). Bei erfolgreicher Transduktion der Zellen und der damit verbundenen Expression von Luziferase kann die Luziferaseaktivität über Biolumineszenz nachgewiesen werden (siehe 3.10.2). Als Versuchskontrolle diente ein ebenfalls spezifische designtes AAV9 (*VB210608-1175vhb*, nachfolgend AAV9-Kontrolle genannt), in welchem die zusätzliche T β 4-Sequenz fehlte, sodass keine T β 4-Überexpression stattfinden konnte (Abbildung 2). Auch über das Kontroll-AAV9 wird Luziferase in den Kardiomyozyten als Reporterprotein exprimiert. Beide AAV9 wurden über das Unternehmen VectorBuilder (VectorBuilder Inc., Chicago, USA) entworfen und bezogen.

Für die Anwendung der AAV9 *in vivo* wurde den Tieren 1×10^{12} gc (*genome copies*) in 200 µl PBS intravenös in die Schwanzvene injiziert.

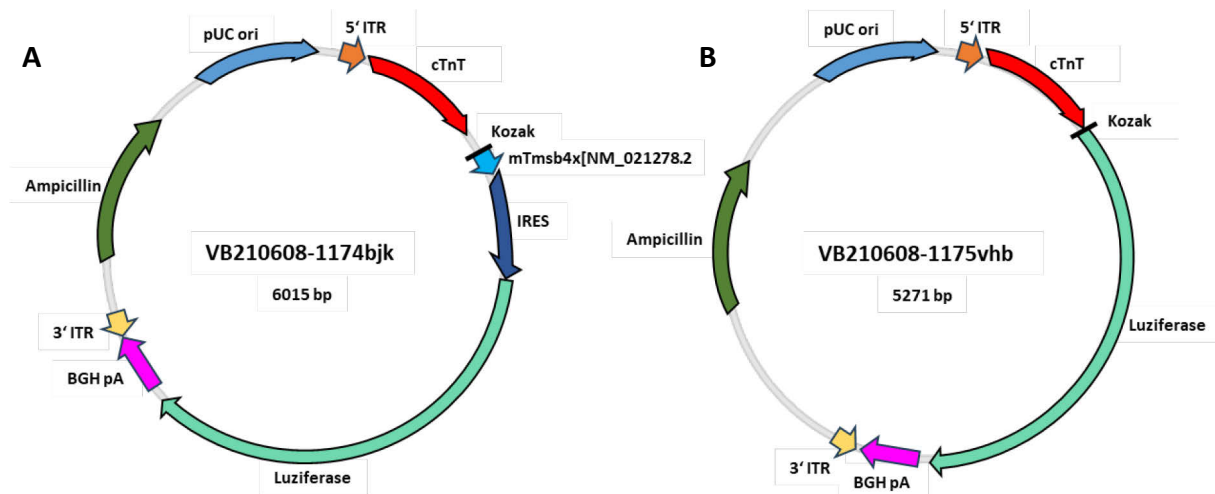


Abbildung 2: Vektorkarten der verwendeten AAV9-Transferplasmide. A: Plasmid VB210608-1174bjk (AAV9-T β 4) zur Überexpression von T β 4. Expression von murinem T β 4 unter dem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor von cTnT mit nachfolgender Luciferasesequenz als Reporter gen. **B:** Kontrollplasmid VB210608-1175vhb (AAV9-Kontrolle) ohne T β 4-Sequenz. Das Kontrollplasmid enthält ebenfalls Luciferase unter dem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor cTnT. Beide AAV9 wurden über VectorBuilder Inc. entworfen und bezogen.

Für eine histologische Analyse des infarzierten Herzens nach T β 4-Überexpression wurden $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Mäusen das AAV9-T β 4 ($n = 3$) und AAV9-Kontrolle ($n = 2$) eine Woche vor Induktion des Infarktes intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Herzen wurden 21 Tage nach Infarkt entnommen, mit PFA präfixiert (siehe 3.9.1) und mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert (siehe 3.9.3). Um den Einfluss einer T β 4-Überexpression auf die Genexpression von EpiSCs zu untersuchen, wurden die EpiSCs der mit AAV9-T β 4 ($n = 3$) und AAV9-Kontrolle ($n = 3$) transfizierten Tiere an Tag 5 und 14 nach Infarkt isoliert und mittels scRNAseq analysiert. Um gleichzeitig ein Lineage Tracing der EpiSCs vornehmen zu können, wurden hierfür ebenfalls Reportermäuse verwendet ($Wt1^{CreERT2}$ -UPRT-Linie).

3.4 *In vivo*-Biolumineszenzmessung

Um festzustellen, ob die Transduktion der Kardiomyozyten mithilfe des AAV9-T β 4 und AAV9-Kontrolle erfolgreich war und somit das Transferplasmid für eine herzspezifische T β 4-Überexpression in die Kardiomyozyten eingebracht wurde, wurde eine *in vivo*-Biolumineszenzmessung zum Nachweis des Reporterproteins Luciferase

durchgeführt. Hierfür wurden C57BL6/J Wildtypmäusen das AAV9-T β 4 (n = 3) und AAV9-Kontrolle (n = 3) sowie PBS als Negativkontrolle (n = 2) intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die Biolumineszenzmessungen wurden vor der AAV9-Injektion (Tag 0), 7, 14, 21 und 28 Tage nach der Injektion im IVIS Lumina II In Vivo Imaging System (PerkinElmer Inc., Waltham, USA) in jeweils den gleichen Tieren über 28 Tage durchgeführt. Dafür wurden die Tiere circa 15 min vor der Messung mit 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (10 μ g/ μ l) narkotisiert und der Brustkorb wurde rasiert. 8 Minuten nach der i.p. Injektion des Substrats der Luziferase, D-Luciferin (Thermo Scientific™ Pierce™, 150 mg/kg in PBS), wurden die Mäuse mit der ventralen Seite nach oben liegend im IVIS positioniert und die Gliedmaßen für eine sichere Position fixiert. Die Biolumineszenz wurde anhand der durchschnittlichen Photonen-Emission über 1 min gemessen.

3.5 Quantitative Bestimmung von T β 4 in Serum und Herzgewebe

Um festzustellen, in welchem Maße mithilfe des AAV9-T β 4 eine Überexpression von T β 4 in Kardiomyozyten stattfindet, wurde die Proteinkonzentration von T β 4 im Herzen und im Blutserum der infizierten Mäuse aus Versuchsteil 3.4 28 Tage nach Injektion der beiden designten AAV9 bzw. PBS gemessen. Zur Bestimmung der Serumkonzentration von T β 4 wurde den Tieren retrobulbär Blut entnommen, welches direkt im Anschluss für 10 min bei 2000 g bei 4°C zentrifugiert wurde und anschließend das Serum abpipettiert wurde. Zur Bestimmung der Konzentration von T β 4 im Herzgewebe wurden den Tieren die Herzen entnommen, die daraufhin in kaltem PBS gewaschen wurden. Anschließend wurde aus 30 mg Herzgewebe das Gesamtprotein isoliert, indem das Gewebe zunächst in jeweils 600 μ l RLT-Puffer (Qiagen, Hilden) mit einer Schere in Stücke geschnitten und zweimal 2 min bei 50 Hz mit einer Metallkugel von 5 mm Durchmesser in einem 2 ml-Tube im TissueLyser LT (Qiagen, Hilden) lysiert wurde. Nachfolgend wurde das Zelllysat in ein neues 2 ml-Tube überführt und das Gesamtprotein mittels des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kits (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von T β 4 in Serum und Herzgewebe wurde ein ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) nach den Vorgaben des Herstellers jeweils in Dubletten der Proben durchgeführt (*Human Thymosin Beta-4 (TMSB4X) ELISA Kit*, abbexa, Cambridge, England). Die optische Dichte (OD) der zugrunde liegenden enzymatischen

Farbreaktion von gebundenem T β 4 an die mit Antigen-beschichtete 96-Well Platte wurde im Platten-Lesegerät spektrophotometrisch bei 450 nm gemessen. Über einen Standard konnte die Konzentration an T β 4 in Serum und Gesamtprotein des Herzgewebes quantitativ bestimmt werden.

3.6 S1P-Anreicherung

Für die histologische Analyse des Einflusses von S1P auf EpiSCs wurde endogenes S1P in Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}-Tieren angereichert. Hierfür wurden die Tiere mit dem S1P-Lyase-Inhibitor 4-Deoxypyridoxin (DOP, Sigma Aldrich, Taufkirchen) behandelt, sodass der Abbau des endogenen S1P gehemmt wird. Das DOP wurde den Tieren über das Trinkwasser (30 mg/L) verabreicht. Um die Vitamin B6-antagonisierende Wirkung des DOP zu verstärken, wurde den Tieren Futter ohne Vitamin B6 gegeben (Itromin GmbH & Co. KG, Lage). Die Behandlung über das Trinkwasser und Futter begann eine Woche vor Induktion des Herzinfarktes und wurde bis zur Tötung der Tiere 21 Tage nach Infarkt fortgeführt.

3.7 Zellisolation

Zur Isolation von Zellen aus dem infarzierten und gesunden Mäuseherzen wurde die von unserer Arbeitsgruppe optimierte Langendorff-Methodik verwendet. Diese ermöglicht die simultane Isolation von aktivierten Fibroblasten und epikardialen stromalen Zellen aus dem gleichen Herzen¹²⁵. Hierfür wurde der Maus 10 min vor der Tötung durch zervikale Dislokation 1.5 U/g Heparin i.p. injiziert und der Brustkorb geöffnet. Anschließend wurde das Herz entnommen und in eine Schale mit kaltem PBS zur Präparation überführt. Dabei wurden anhängendes Fettgewebe, Thymus und Reste der Lunge entfernt. Mithilfe zweier Feinpinzetten wurde das Herz über die Aorta kanüliert und retrograd bei 37°C mit konstantem Fluss von 2 ml/min mit vorgewärmten PBS über die Koronarien frei von Blut gespült. Darauf folgte eine Perfusion über 8 min mit ebenfalls vorgewärmter Kollagenase-Lösung (1000 U/ml, Worthington Biochemical Corp., Lakewood, USA), um das Gewebe enzymatisch zu verdauen. Zur simultanen Isolation von EpiSCs wurde das Herz zusätzlich in ein mit der Kollagenaselösung befülltes 5 ml-Tube platziert, welches über eine Vorrichtung mit 80 rpm geschüttelt wurde, um die EpiSCs an der Herzoberfläche durch die entstehenden Scherkräfte separat abzulösen. Die durchgelaufene Kollagenaselösung mit den enthaltenen

EpiSCs wurde während der gesamten Perfusion aufgefangen. Nach Ende des Verdaus wurde das Herz von der Kanüle abgenommen und die Herzohren entfernt. Das verdaute Herz mit den aktivierten Fibroblasten wurde mit einem Skalpell homogenisiert und in Zellkulturmedium aufgenommen. Durch vorsichtiges Pipettieren wurde eine Zellsuspension hergestellt, die über ein 100 µm Nylonsieb (BD Biosciences, San Jose, USA) gefiltert wurde. Nach anschließender Zentrifugation bei 55 g für 5 min bei 15°C, bei der die Kardiomyozyten ein Pellet bilden, wurde der Überstand erneut gefiltert, über ein 40 µm Nylonsieb (BD Biosciences, San José, USA) gegeben und für 7 min bei 300 g zentrifugiert. Ebenso wurde die Zellsuspension mit den enthaltenen EpiSCs zentrifugiert. Der Überstand von beiden Ansätzen wurde verworfen und das Pellet jeweils für die nachfolgenden Analysen in Puffer für die Durchflusszytometrie aufgenommen.

Da in nicht-infarzierten Herzen kein mehrschichtiges Epikard vorhanden ist, wurde für die Zellisolation von CF aus gesunden Herzen das kanülierte Herz nicht zusätzlich in Kollagenaselösung geschüttelt, sodass nur eine Zellsuspension mit dem verdauten Herzgewebe entstand. Die isolierten Zellen wurden entsprechend ihrer Verwendung weiter aufgereinigt.

3.8 Zellsortierung

Die mittels Langendorff-Methodik isolierten Zellen wurden entweder über durchflusszytometrische Zellsortierung für die scRNAseq oder über magnetische Zellsortierung für Versuche in Zellkultur weiter aufgereinigt, um reine Zellpopulationen, bestehend aus CFs, aCFs, EpiSCs oder ICs, zu erhalten.

3.8.1 Magnetische Zellsortierung

Für Versuche in Zellkultur mit EpiSCs, aCFs und CFs wurden die Zellen nach der Zellisolation (siehe 3.3) in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde mittels Mojosort Nanobeads (Biolegend, San Diego, USA) entsprechend des Herstellerprotokolls eine magnetische Depletion von Immunzellen (CD45⁺) und Endothelzellen (CD31⁺) durchgeführt. Die erhaltene Zellfraktion aus CD31⁻/CD45⁻ - Zellen wurde im Anschluss bei 300 g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen fünfmal mit PBS gewaschen,

um Zelldebris zu entfernen. Das Medium wurde täglich gewechselt. Sobald die Zellen subkonfluent gewachsen waren, wurden sie mit Trypsin abgelöst und für die Versuche verwendet.

3.8.2 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Für die scRNAseq wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Bei der durchflusszytometrischen Sortierung werden Fluorophor-gekoppelte Antikörper genutzt, um Zellpopulationen zu markieren und sie über das Fluoreszenzsignal identifizieren zu können. Die Zellen befinden sich dabei einzeln in einem linearen Probenstrom und werden an einem monochromatischen Laserstrahl vorbei geleitet. Über die Detektion des Streu- und Fluoreszenzlichts, das von den Zellen ausgeht, können sie hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Expression der untersuchten Antigene, an die die eingesetzten Antikörper binden, identifiziert und sortiert werden. Für die scRNAseq wurden die isolierten Primärzellen mithilfe der Durchflusszytometrie in CF-, aCF-, EpiSC- und Immunzell-Populationen aufgereinigt und anschließend ihre Zellzahl und -vitalität bestimmt (BD Rhapsody Single-Cell Analysis System, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Dafür wurden die Primärzellen nach der EpiSC- und Fibroblastenisolation in 400 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit Antikörpern gegen Marker von Immunzellen (CD45), Endothelzellen (CD31) und mit einem Lebendtodfarbstoff (Fixable Viability Dye eFluor 780) gefärbt (siehe Tabelle 2.3). Fibroblasten und EpiSCs wurden als eFluor780⁺/CD31⁻/CD45⁻-Zellen sortiert. Immunzellen wurden als eFluor780⁺/CD31⁻/CD45⁺-Zellen sortiert.

3.9 Histologie

Für die histologischen Analysen wurden Schnitte der infarzierten und gesunden Herzen angefertigt. Je nach Versuch und Antikörper wurden die Herzen entweder in Kryomedium oder in Paraffin eingebettet und anschließend geschnitten und mit Immunfluoreszenz oder Immunhistochemie gefärbt. Bei Versuchen mit den Reportermausen, welche TdTomato zum Lineage Tracing der EpiSCs und aCFs exprimieren, wurden die Herzen entweder in Paraffin eingebettet oder mit PFA präfixiert und in Kryomedium eingebettet. Dadurch soll eine Diffusion des zytosolischen Markerproteins TdTomato durch das Anschneiden der Zellen vermieden werden.

3.9.1 Kryoschnitte

Zur Anfertigung von Kryoschnitten wurden den Mäusen zunächst die Herzen entnommen und in kaltem PBS gewaschen. Nachdem die Herzen frei von Lunge und überschüssigem Fett präpariert wurden, wurde im oberen Bereich des linken und rechten Ventrikels jeweils eine kleine Öffnung in die Herzwand geschnitten, sodass über eine Kanüle KP-Cryo Compound (Klinipath, Duiven, Niederlande) in die Ventrikel gespritzt werden konnte, bevor das Herz komplett in dem KP-Cryo Medium eingebettet wurde. Nach dem Einfrieren in -30°C bis -40°C kaltem Isopentan für 10 min wurden die Herzen bei -80°C gelagert. Bei präfixierten Herzen wurden die entnommenen Organe über die Aorta erst mit 10 ml kalten PBS gespült and anschließend mit 3 ml PFA (4 %) perfundiert. Anschließend wurden die Herzen zur Entwässerung über Nacht in 20 % Sucrose-Lösung (10 g Sucrose in 50 ml PBS, steril filtriert) gelegt und danach wie beschrieben in KP-Cryo Medium eingebettet. Das Schneiden der Herzen in 10 μm dicke Kryoschnitte erfolgte mit einem Kryostaten (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) bei -21°C . Die fertigen Schnitte wurden auf Objektträgern trockengeföhnt und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

3.9.2 Paraffinschnitte

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Herzen ebenfalls zunächst frei von anderem Gewebe präpariert. Anschließend wurden die Herzen über Nacht in PFA (4 %) gelegt, am nächsten Tag entwässert und in 37°C warmen, flüssigen Paraffin eingebettet. Zur Aushärtung des Paraffins wurden die eingebetteten Herzen auf eine Kälteplatte platziert. Das Schneiden der so entstandenen Paraffinblöcke mit eingebetteten Herzen erfolgte mit dem Mikrotom (Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) in 5 mm dicke Paraffinschnitte, die auf SuperfrostTM Plus Adhäsionsobjektträger (Epredia, Braunschweig, Deutschland) gezogen wurden.

3.9.3 Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbungen von Kryoschnitten wurden die Herzschnitte zunächst mit einem Fettstift zur Abgrenzung umrandet (ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen, Advanced Cell Diagnostics, Newark, USA) und für 15 min mit 4 % PFA bei RT

zur Fixierung inkubiert. Bei Verwendung von präfixierten Kryoschnitten wurde dieser Fixierungsschritt ausgelassen und die Schnitte stattdessen mit Waschpuffer zur Rehydrierung der Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 min unter Schütteln wurden die Schnitte mit Blocking-Puffer zum Blockieren aller unspezifischen Antigenbindungsstellen für 1 h bei RT inkubiert. Wurde ein Primärantikörper, hergestellt in Maus, verwendet, enthielt der Blocking-Puffer zusätzlich Maus-IgG im Verhältnis 1:50. Der Zusatz von Saponin in PBS während des gesamten Färbeprotokolls sorgt für eine Permeabilisierung der Zellen, sodass auch intrazelluläre Antigene für die eingesetzten Antikörper zugänglich werden. Nach Entfernen des Blocking Puffers folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer individuellen Verdünnung (siehe Tabelle 1) in Waschpuffer mit zusätzlich 1 % NGS für 1,5 h bei RT oder bei 4°C über Nacht. Danach wurden die Schnitte dreimal mit Waschpuffer für jeweils 5 min unter Schütteln gewaschen. Es folgten 2 h Inkubation bei RT mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 4), die an das gewünschte Fluorophor gekoppelt und gegen die Wirtsspezies des verwendeten Primärantikörper gerichtet waren. Nach zweimaligem Waschen mit Waschpuffer und finalem Waschen mit PBS für jeweils 5 min unter Schütteln wurden die Schnitte mit ProLong Gold Antifade Mounting Medium mit DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingedeckelt, wodurch gleichzeitig die Zellkerne angefärbt wurden. Nach dem Trocknen des Eindeckelmediums wurden Aufnahmen der Schnitte mit einem BX61 Fluoreszenzmikroskop (Kamera: F-View, Olympus, Hamburg, Deutschland) unter Verwendung von 4x-, 10x-, 20x- und 40x-fach Objektiven durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ/Fiji¹²⁶ prozessiert.

3.9.4 Immunhistochemiefärbung

Zur Färbung der Paraffinschnitte wurde das ImmPRESS® Duet Double Staining Polymer Kit (Vector Laboratories, Newark, USA) verwendet, welches auf einer chromogenen Detektion der Antikörper-Antigen-Bindung basiert. Hierbei wird, wie bei der Immunfluoreszenzfärbung, ein spezifischer primärer Antikörper verwendet. Die sekundären Antikörper sind jedoch an Enzyme gekoppelt, in diesem Fall Meerrettichperoxidase (HRP) und Alkalische Phosphatase (AP), die nach Zugabe von Substraten ein farbiges Präzipitat abspalten, welches detektiert werden kann.

Für die histologische Analyse der Paraffinschnitte wurden zunächst eine Deparaffinisierung und eine Antigen-Demaskierung durchgeführt. Zur Entfernung des Paraffins durchliefen die Schnitte nach einer Stunde Inkubation bei 60°C eine Xylol/Ethanol-Reihe (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Xylol/Ethanolreihe zur Deparaffinisierung der in Paraffin eingebetteten Herzschnitte. Die Verdünnung von Ethanol erfolgte mit bidestilliertem Wasser.

Schritt	Bestandteil	Inkubationszeit
1.	Xylol 100 %	2x 3 min
2.	Xylol/100% Ethanol 1:1	3 min
3.	100% Ethanol	2x 3 min
4.	95 % Ethanol	3 min
5.	70 % Ethanol	3 min
6.	50 % Ethanol	3 min
7.	Kaltes Leitungswasser	Lagerung bis zur Färbung

Anschließend wurde eine Antigen-Demaskierung durch Abkochen der Schnitte für 15 min bei 98°C in Antigen-Demaskierungspuffer (Tris-basiert, Vector Laboratories, Newark, USA) durchgeführt. Dieser Schritt ist notwendig, da durch die Paraffinfixierung Methylen-Verbindungen entstehen, die Proteine kreuzvernetzen und so Antigenbindungsstellen verbergen können. Durch die Hitze-induzierte Antigen-Demaskierung in dem Tris-basierten Puffer werden die Methylenbrücken gebrochen und Antigenbindungsstellen wieder freigegeben. Nach der Antigen-Demaskierung wurde die Färbung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden gegen ACTN2 zur Detektion der Kardiomyozyten und gegen RFP (TdTomato) zur Detektion der Postn⁺-Zellen und deren Nachkommen eingesetzt (siehe **Tabelle 3**). Als Sekundärantikörper wurden die aus dem Kit stammenden HRP-gekoppelten Antikörper gegen Maus-IgG, welcher eine braune Farbe generiert, und ein AP-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG, welcher eine magenta Farbe generiert, verwendet. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit VectaMount® Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories, Newark, USA) eingedeckelt und Aufnahmen mit einem Durchlichtmikroskop (Kamera: UC30, Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ/Fiji¹²⁶ prozessiert.

3.9.5 RNA-in situ-Hybridisierung

Die Detektion der *in situ*-Lokalisation der mRNA-Expression ausgewählter Markergene erfolgte mittels RNA-*in situ*-Hybridisierung unter Verwendung des Kits RNAscope 2.5 HD Detection Kit Assay - RED (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA) mit Transkript-spezifischen Hybridisierungssonden. Hierfür wurden Kryoschnitte mit 10 µm Schichtdicke von Herzen aus C57BL6/J-Tieren 5 Tage nach Infarkt oder Sham-Operation verwendet. Die Schnitte wurden für 15 min mit 4 % PFA fixiert und nach Angaben des Herstellerprotokolls vorbereitet und gefärbt. Die Inkubationszeit des RNAscope® 2.5 AMP 5 – RED wurde auf 120 min erhöht, um das Signal zu verstärken. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) gefärbt, indem die Schnitte für 10 s in eine 1:1 Lösung Hämatoxylin/Wasser getaucht wurden. Die Schnitte wurden mit VectaMount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories, Newark, USA) eingedeckelt. Zur Analyse des SONDENSIGNALS wurden Aufnahmen der hybridisierten Herzschnitte mit einem Durchlichtmikroskop (Kamera: UC30, Olympus, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ/Fiji¹²⁶ prozessiert.

3.10 Massenspektrometrie

Zur Analyse von Spingolipiden und weiteren Lipiden in EpiSCs nach Myokardinfarkt wurde eine Lipidomics-Analyse mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS, *liquid chromatography/tandem mass-spectrometry*) durchgeführt. Hierfür wurden $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ - Mäusen 5 Tage nach Infarkt die Herzen entnommen und wie beschrieben EpiSCs und aCFs mit der Langendorff-Methodik isoliert und durchflusszytometrisch sortiert. Dabei wurden Immunzellen (CD45⁺) und Endothelzellen (CD31⁺) aussortiert. Die EpiSCs wurden zusätzlich in TdTomato⁺- und TdTomato⁻-Fraktionen sortiert, um spezifisch Rückschlüsse auf WT-1-exprimierende EpiSCs ziehen zu können.

Für die LC-MS/MS-Messung wurden die Lipide direkt im Anschluss an die durchflusszytometrische Sortierung isoliert, indem zu den Proben jeweils 1 ml Methanol, 200 µl Salzsäure (6 mol/L) und 2 ml Chloroform gegeben wurden. Nach der Zentrifugation der Proben wurde die Chloroform-Phase abgenommen und erneut 2 ml Chloroform hinzugefügt. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die Chloroform-Phase abgenommen und in ein neues Tube überführt. Das Chloroform wurde mittels

Vakuum-Trocknung in einem Vakuumkonzentrator entfernt. Die Proben wurden anschließend in 100 µl Methanol/Chloroform-Gemisch (80:20 v/v) gelöst und die Lipide mittels LC-MS/MS gemessen. Die LC-MS/MS-Messung und -Auswertung wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Bodo Levkau (Institut für Molekulare Medizin III, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

3.11 Einzelzell-RNA-Sequenzierung

Mithilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen (scRNAseq) kann die Genexpression jeder einzelnen eingesetzten Zelle einer Zellsuspension analysiert werden. Dafür erfolgt eine mikrofluide Aufteilung der Zellen in Einzelzellsuspensionen und eine *next-generation sequencing* (NGS) cDNA-Bibliothek angefertigt wird. Dafür werden auf einem Chip kleine Reaktionsvesikel aus Öl, sogenannte Gel-Beads in Emulsion (GEM), gebildet, welche jeweils eine Einzelzelle, Reagenzien zur reversen Transkription und Gel-Beads mit barcodierten Oligonukleotiden enthalten. Innerhalb des GEMs findet daraufhin die reverse Transkription statt, sodass in einem GEM die cDNAs einer einzelnen Zelle mit jeweils dem gleichen Barcode entstehen. Über diesen Barcode können die Sequenzen einer bestimmten Zelle nachverfolgt werden. Eine zweite Sequenz, die sogenannten *Unique Molecular Identifier* (UMI), markiert die cDNAs, die von dem gleichen RNA-Molekül abstammen. Durch die Amplifizierung der gesamten markierten cDNA entsteht eine NGS-Bibliothek, die anschließend sequenziert wird.

Mithilfe der scRNAseq wurde die Genexpression von EpiSCs, aCFs und ICs an Tag 5 und 21 nach Infarkt analysiert. Außerdem wurde in Reporter-mäusen zur Nachverfolgung der EpiSCs die Genexpression von EpiSCs, aber auch aCFs und ICs, nach T β 4-Überexpression bzw. unter Kontrollbedingungen an Tag 5 und 14 nach Infarkt untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Auswertung der Daten der EpiSC-Analysen gelegt.

3.11.1 Sequenzierung und Datenverarbeitung

Die mittels Langendorff-Technik isolierten und durchflusszytometrisch sortierten Zellen wurden direkt im Anschluss für die scRNAseq genutzt. Hierfür wurden die Zellsuspensionen für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Puffer resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von circa 1000 Zellen/µl erreicht wurde. Da diese Zellkonzentration mit der Gesamtzahl

der isolierten EpiSCs aus einem Herzen, insbesondere zu den späteren Zeitpunkten nach Infarkt, nicht immer erreicht werden konnte, wurden die EpiSCs für die Zeitpunkte 14 und 21 Tage nach Infarktaus drei entnommenen Herzen gepoolt und teils auch niedrigere Zellkonzentrationen verwendet. Die Zellzahl und -vitalität wurde im Zuge einer Qualitätskontrolle vor der Sequenzierung bestimmt (BD Rhapsody, BD Biosciences). Für die Sequenzierung wurde das 10X Genomics Chromium System (10X Genomics Inc., Pleasanton, USA) genutzt. Abhängig von der erreichten Zellkonzentration wurden 800 - 20.000 Zellen eingesetzt, um die Einzelzell-Genbibliotheken mithilfe des Chromium Single Cell 3' Reagent Kit v2 (10X Genomics Inc., Pleasanton, USA) zu generieren. Die Sequenzierung erfolgte mit dem HiSeq 3000 System (Illumina, San Diego, USA) nach Herstellerprotokoll mit einer mittleren Sequenzierungstiefe von circa 70.000 Reads/Zelle für CF und aCF beziehungsweise 90.000 Reads/Zelle für EpiSCs, um eine vergleichbare Sequenzierungssättigung von etwa 70 % zu erreichen. Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit der 10X Genomics CellRanger Software (v. 7.0.1). Über die CellRanger *mkfastq*-Pipeline erfolgte das Demultiplexen der von dem Illumina-Sequenzierer generierten BCL-Dateien und die Prozessierung zu FastQ-Dateien. Mithilfe der CellRanger *count*-Pipeline wurden die Reads an dem mm10 Genom ausgerichtet und UMIs gezählt, um darüber eine Feature-Barcode-Matrix zu generieren. Für Lineage Tracing Versuche wurde eine spezifische Referenz bestehend aus dem mm10 Genom und der TdTomato-Gensequenz beziehungsweise der UPRT-Sequenz über die CellRanger *mkref* Pipeline generiert. Die Sequenzierung, Datenverarbeitung und die bioinformatische Analyse wurde von Dr. rer. nat. Tobias Lautwein (Genomics & Transcriptomics Labor (GTL), Biomedizinisches Forschungszentrum Düsseldorf) durchgeführt.

3.11.2 Filtern und Clustern der Datensätze

Für die weiteren bioinformatischen Analysen wurde das R Paket Seurat (v.3.0) genutzt¹²⁷. Um Cluster zu ermitteln und die Genexpression zu analysieren wurde die generierte Feature-Barcode-Matrix zunächst in das Programm geladen. Bei einer initialen Qualitätskontrolle wurden alle Zellen mit weniger als 200 detektierten Genen sowie Gene, die in weniger als drei Zellen exprimiert wurden, entfernt. Ebenso wurden tote oder beschädigte Zellen anhand einer überproportional hohen Kartierungsrate zum mitochondrialen Genom ausgeschlossen. Mithilfe der Funktion *SCTransform*

erfolgte die Normalisierung der Daten. Biologische Replikate wurden in ein Datenset integriert. Dimensionale Reduktion des Datensets wurde basierend auf identifizierten unterschiedlich exprimierten Genen und deren Einbettung in einen UMAP-Plot (Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction) mit der *Principal Component Analysis* (PCA) erreicht. Das Clustering der Zellen erfolgte über einen Graph-basierten Clustering-Ansatz des R-Pakets Seurat (v.3.0). Markergene, die ein Cluster definieren, und differenzielle Genexpression zwischen verschiedenen Clustern wurden mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test mit dem R-Paket Seurat berechnet. Mithilfe des Tools DoubletFinder (v.2.0.2) konnten Dubletten identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen werden¹²⁸. Zur Erstellung von Heatmaps wurde die Software Morpheus genutzt (<https://software.broad-institute.org/morpheus/>). Dotplots, Violinplots und UMAP-Graphen wurden mithilfe des R-Pakets Shiny (v.1.7.4) über eine interaktive Webanwendung erstellt¹²⁹. Über die Plattform *Gene ontology enrichment analysis and visualization* (GORilla)¹³⁰ erfolgte die Suche nach angereicherten GO-Annotationen anhand der signifikant angereicherten Transkripte für jedes Cluster.

3.11.3 Vergleich von Clusteranalysen mit unterschiedlichen Konditionen

Zum Vergleich der scRNAseq von unterschiedlichen Konditionen, das heißt zum einen der Vergleich verschiedener Zeitpunkte nach Infarkt und zum anderen der Vergleich nach Infarkt mit AAV9-T β 4-oder AAV9-Kontroll-Behandlung, wurden die individuellen Expressionswerte jedes Clusters zunächst entsprechend ihrer Populationsgröße gewichtet und gemittelt. Anhand dieser Mittelwerte wurden Foldchanges (*Average Log2 Foldchange*, AvgLog2FC) zwischen den beiden miteinander zu vergleichenden Konditionen ermittelt. Je höher der Wert des *Foldchanges* für ein Gen dabei war, desto höher war seine Expression zu einer der verglichenen Konditionen. Verglichen wurde die Genexpression der EpiSCs zu den Zeitpunkten 5 und 21 Tage nach Infarkt sowie die Genexpression der EpiSCs, aCFs und ICs nach der Behandlung mit AAV9-T β 4-oder AAV9-Kontrolle jeweils nach 5 und 14 Tagen nach Infarkt.

3.12 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme GraphPad Prism 7 und Microsoft Excel genutzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben und abgebildet. P-Werte von $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Die hierfür verwendeten Tests sind in den Abbildungsbeschriftungen der zugehörigen Versuche beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Heterogenität von EpiSCs

Eine hohe Heterogenität des Epikards an Tag 5 nach Infarkt wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits auf Einzelzell-Ebene beschrieben⁸⁹. In der scRNAseq von EpiSCs an Tag 5 nach Infarkt konnten dabei 11 transkriptionell unterschiedliche EpiSC-Cluster gefunden werden (zur Unterscheidung der scRNAseq-Analysen dieser Arbeit nachfolgend „Tag5-Cluster“ genannt). Zusammenfassend lassen sich diese Cluster wie folgt beschreiben: Tag5-Cluster 1, das größte Cluster, exprimierte klassische epikardiale Gene, darunter *Wt1*. In Tag5-Cluster 2 waren Gene vertreten, die für ECM-Proteine und kontraktile Proteine kodieren, wie *Spp1* oder *Acta2*. In Tag5-Cluster 3 waren sowohl mesenchymale Gene (*Gsn*), als auch ECM-kodierende Gene (*Smoc2*, *Sparcl1*) exprimiert. Tag5-Cluster 4 zeichnete sich ebenfalls durch die Expression mesenchymaler Gene aus (*Cd44*, *Ly6a*). Tag5-Cluster 5 und 6 exprimierten beide ECM-kodierende Gene, wie *Clec3b* beziehungsweise *Mfap4*. Tag5-Cluster 7 zeichnete sich durch die Expression epithelialer und epikardialer Gene aus (*Msln*, *Wt1*). In Tag5-Cluster 8 waren ebenfalls Gene hoch exprimiert, die für ECM-Proteine kodieren, (*Col5a3*, *Tnc*). Tag5-Cluster 9 zeichnete sich durch die Expression von Genen aus, die mit einer hohen Zellzyklusaktivität und Proliferation assoziiert werden (*Top2a*, *Pbk*). In Tag5-Cluster 10 und auch in Tag5-Cluster 6 waren Gene hoch exprimiert, die mit dem *Wnt*-Signalweg assoziiert werden (*Wif1*, *Dkk3* und *Sfrp2*). Tag5-Cluster 11 zeichnete sich durch die Expression von Genen aus, die mit der zellulären Antwort auf Interferon verbunden werden (*Ifit3*, *Cxcl10*). In den Tag5-Clustern 3, 5, 6, 9 und 10 waren zudem Gene exprimiert, die auch in aktivierten und nicht-aktivierten Fibroblasten exprimiert werden, sodass hier ein Fibroblasten-ähnlicher Phänotyp vermutet wurde⁸⁹.

Nachfolgend wurde die Heterogenität des Epikards hinsichtlich der Lokalisation der Cluster innerhalb des Epikards, auf Genexpressionsebene zu späteren Zeitpunkten nach Infarkt als auch auf Proteinebene über die Zeit nach Infarkt analysiert.

4.1.1 Lokalisation der EpiSC-Cluster nach Infarkt

Aufbauend auf den Ergebnissen der scRNAseq 5 Tage nach Infarkt wurde untersucht, ob sich die 11 EpiSC-Cluster, die in der Analyse gefunden wurden, nicht nur

hinsichtlich ihres transkriptionellen Profils, sondern auch in ihrer Lokalisation innerhalb des Epikards unterscheiden. Um die Lokalisation dieser Cluster analysieren zu können, wurden zunächst Gene ausgewählt, die individuell in den Clustern exprimiert wurden. Zu den Kriterien, anhand derer diese Cluster-Markergene ausgesucht wurden, zählten neben ihrer signifikanten Expression in dem jeweiligen Cluster außerdem ihre Expression in einem Großteil der Zellen des Clusters (Tabelle 7).

Tabelle 7: Ausgewählte Gene für die individuellen Cluster der scRNAseq 5 Tage nach Infarkt. Ausschlaggebend für die Auswahl war der Anteil der Zellen in dem jeweiligen Cluster, die das Gen exprimierten (% Expression) sowie die Signifikanz der Expression in dem jeweiligen Cluster (p-Wert).

Cluster	Markergen	% Expression	p-Wert
1	<i>Gatm</i>	70,5	0
1	<i>Wt1</i>	91,8	0
2	-	-	-
3	<i>Pcsk6</i>	63,9	0
4	<i>Cd44</i>	84,5	0
5	-	-	-
6	<i>Sfrp2</i>	89,5	1,82E-97
7	<i>Wt1</i>	95	3,30E-215
8	<i>Tgfb2</i>	82,3	5,34E-85
8	<i>Wt1</i>	74,8	1,04E-47
9	<i>Top2a</i>	90,5	2,37E-215
10	<i>Dkk3</i>	77,4	3,58E-86
11	<i>Ifit3</i>	99,5	9,27E-158
11	<i>Cxcl10</i>	61,7	2,17E-139

Insgesamt wurden für 9 von 11 Clustern Markergene identifiziert. Für Tag5-Cluster 2 und 5 konnte kein spezifischer Marker gefunden werden. Folgende Markergene wurden ausgewählt: *Gatm* (Glycine amidinotransferase, mitochondrial) für Tag5-Cluster 1, *Pcsk6* (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6) für Tag5-Cluster 3, *Cd44* (Cd44 Antigen) für Tag5-Cluster 4, *Sfrp2* (Secreted frizzled-related protein 2) für Tag5-Cluster 6, *Wt1* (Wilms tumor protein 1) für Tag5-Cluster 7, 1 und 8, *Tgfb2* (Transforming growth factor beta-2) für Tag5-Cluster 8, *Top2a* (DNA topoisomerase 2-

alpha) für Tag5-Cluster 9, *Dkk3* (Dickkopf-related protein 3) für Tag5-Cluster 10 und für Tag5-Cluster 11 *Ifit3* (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3) und *Cxcl10* (C-X-C motif chemokine 10). Abbildung 3 zeigt in Violinplots die Expressionsstärken der ausgewählten Cluster-Markergene in allen EpiSC-Clustern. Die Expression der ausgewählten Markergene für die jeweiligen Cluster wurden nachfolgend genutzt, um über RNA-*in situ*-Hybridisierung die Lokalisation der Cluster im Epikard zu analysieren.

Um die spezifische Lokalisation der EpiSC-Cluster 5 Tage nach Infarkt zu analysieren, wurde eine RNA-*in situ*-Hybridisierung durchgeführt. Hierfür wurden Transkriptspezifische Hybridisierungssonden der zuvor ausgewählten Cluster-Markergene verwendet. Die RNA-*in situ*-Hybridisierung der Cluster-Markergene 5 Tage nach Infarkt wurde in Mikroskopaufnahmen von Ausschnitten der Epikardschicht (Abbildung 4A) und in Gesamtübersichten von den Herzquerschnitten analysiert (Abbildung 4B). *Msln* (Tag5-Cluster 7) war ausschließlich in den äußersten Zellen des Epikards exprimiert, was sich mit dem epithelialen Charakter dieses Clusters deckt⁸⁹. Ebenso wurde der klassische EpiSC-Marker *Wt1* (Tag5-Cluster 7, 1 und 8) und die Clustermarker *Cd44* (Tag5-Cluster 4) und *Tgfb2* (Tag5-Cluster 8) in den äußeren Zellen der Epikardschicht exprimiert. *Cd44* wurde außerdem im Randbereich des Infarktes von aCF exprimiert. Die Clustermarker *Gatm* (Tag5-Cluster 1), *Pcsk6* (Tag5-Cluster 3), *Sfrp2* (Tag5-Cluster 6), *Top2a* (Tag5-Cluster 9, 2 und 1) und *Dkk3* (Tag5-Cluster 10) markierten Zellen, die im gesamten Epikard homogen verteilt waren. *Pcsk6*, *Sfrp2*, *Top2a* und *Dkk3* waren zudem auch in aCFs im Randbereich des Infarkts exprimiert. Auffällig war die Expression der Clustermarker *Cxcl10* und *Ifit3* für Tag5-Cluster 11, die heterogen im Epikard detektiert werden konnten und dabei einzelne „Expressionsherde“ bildete. Zudem konnte ihre Expression in gleichem Muster auch im gesamten Myokard detektiert werden.

Zusammengefasst waren Clustermarker für Cluster, welche klassische EpiSC-Gene exprimierten, in den äußeren Zellen des Epikards zu finden. Clustermarker für Cluster, in denen auch Fibroblasten-assoziierte Gene exprimiert wurden, markierten dagegen Zellen, die sich heterogen im Epikard verteilten, sowie auch im Myokard zu finden waren.

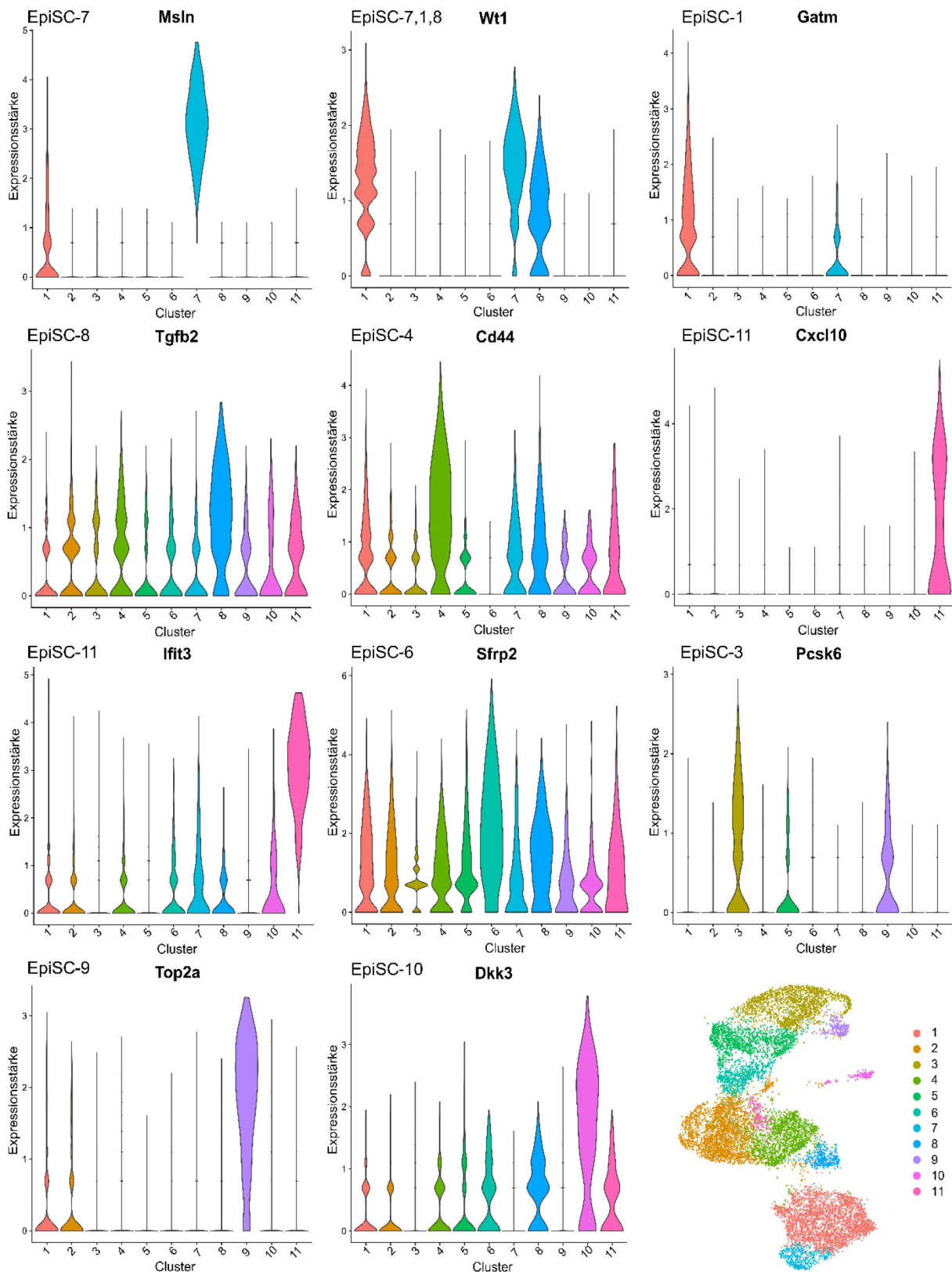


Abbildung 3: Violinplots der Expressionsstärken der ausgewählten Markergene in den EpiSC-Clustern 5 Tage nach Infarkt. Die Cluster-Markergene wurden entsprechend ihrer individuellen Expression in dem jeweiligen Cluster ausgewählt. Unten rechts: UMAP-Plot der EpiSC-Cluster. Die Abbildung basiert zum Teil auf Hesse & Owenier *et al.* 2021⁸⁹ (Creative Commons Attribution License; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

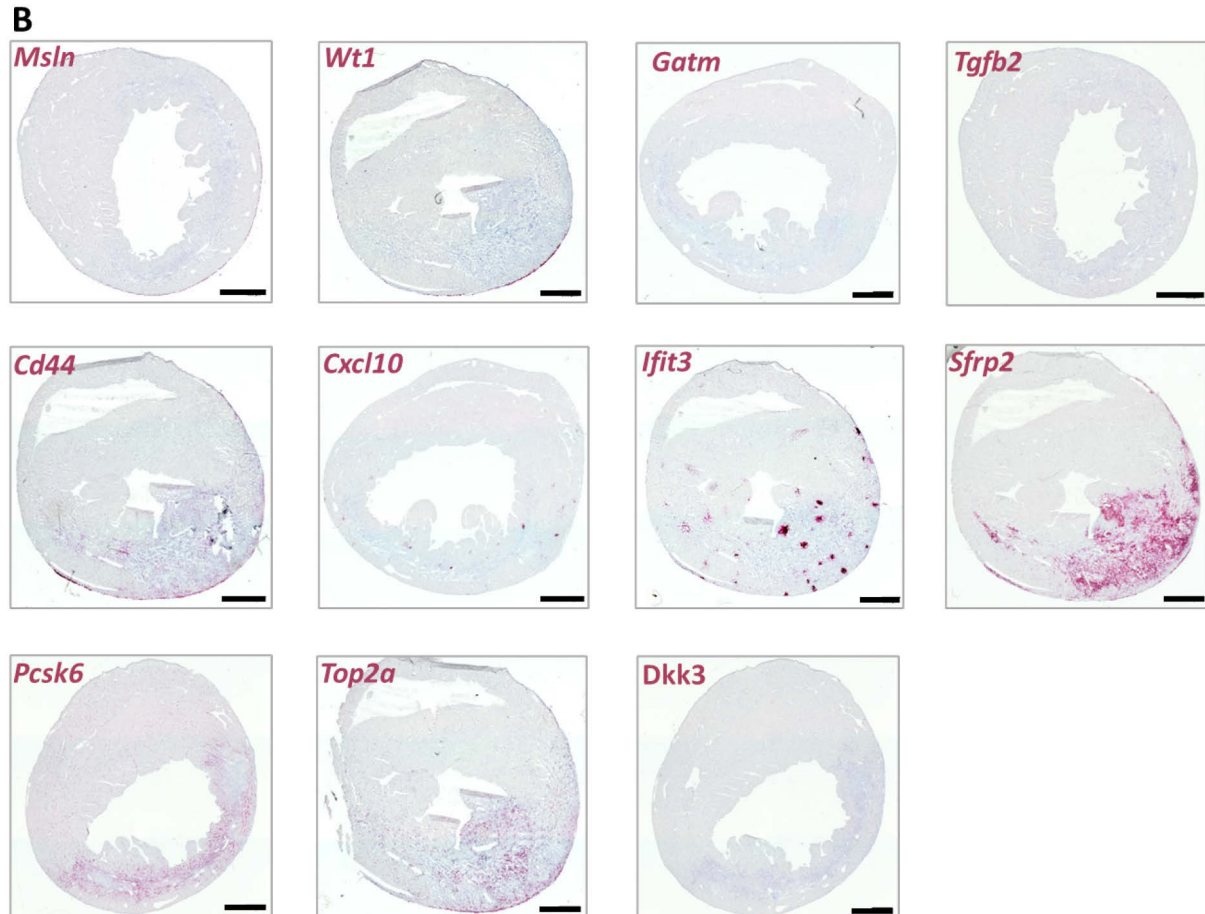
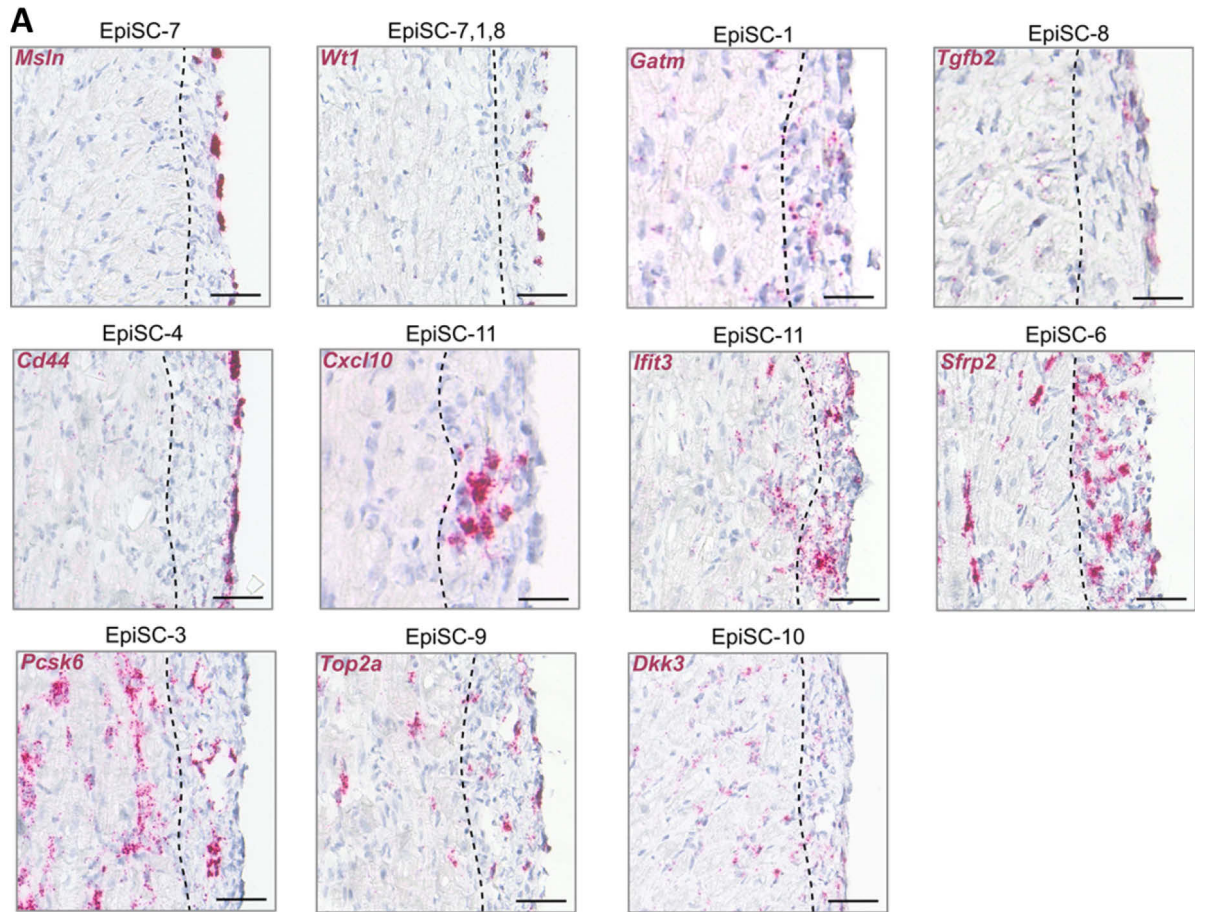


Abbildung 4: RNA-*in situ*-Hybridisierung der Transkripte der ausgewählten Cluster-Markergene für die Analyse der Lokalisation der EpiSC-Cluster 5 Tage nach Infarkt. Für die RNA-*in situ*-Hybridisierung wurden Kryoschnitte (10 µm Schichtdicke) des Herzens 5 Tage nach Infarkt verwendet. Rot: Gentranskripte der EpiSC-Cluster-Markergene; Blau: mit Hämatoxylin gefärbte Nuklei. Gezeigt sind repräsentative Bilder (n = 4). **A:** Ausschnitte des Epikards über dem Infarktbereich. Die Linie markiert die Grenze zwischen Myokard und Epikard nach Zellmorphologie. Skalierung: 50 µm. **B:** Gesamtquerschnitte der Herzen. Skalierung: 1 mm. Die Abbildung basiert zum Teil auf Hesse & Owenier et al. 2021⁸⁹ (Creative Commons Attribution License; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.1.2 Vergleich von EpiSCs an Tag 5 und 21 nach Infarkt

Mithilfe der kombinierten Clusteranalyse wurde die Genexpression von EpiSCs an Tag 5 und 21 nach Infarkt verglichen, um Veränderungen der EpiSCs und ihrer Funktionalität über die Zeit nach Infarkt zu untersuchen. Die Zellisolate von beiden Zeitpunkten wurden hierfür mit der 10X Genomics Chromium Plattform auf Einzelzell-Ebene sequenziert. Die Zellpräparation für die scRNAseq der EpiSCs an Tag 5 wurde von Dr. rer. nat. Christoph Owenier (ehem. Institut für Molekulare Kardiologie, Uniklinik Düsseldorf) durchgeführt und von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht⁸⁹. Hierbei handelte es sich um den gleichen Datensatz, auf dem auch die Lokalisationsstudien basierten (siehe 4.1.1). Analog zu der scRNAseq der EpiSCs 5 Tage nach Infarkt wurde im Rahmen dieser Arbeit die Analyse der EpiSCs 21 Tage nach Infarkt durchgeführt. Für die beiden Zeitpunkte 5 und 21 Tage nach Infarkt wurden die EpiSCs aus jeweils drei Mäuseherzen isoliert. Da die EpiSC-Zellzahl an späteren Zeitpunkten nach Infarkt deutlich abnimmt¹²⁵, wurden die Zellen der Herzen 21 Tage nach Infarkt für die scRNAseq gepoolt, um die erforderliche Mindestzellkonzentration zu erreichen. Die Datensätze der beiden Zeitpunkte wurden anschließend zusammen bioinformatisch analysiert, um Unterschiede feststellen und die Expressionsstärken der Gene an beiden Zeitpunkten vergleichen zu können.

4.1.2.1 Einordnung der Cluster

Insgesamt konnten an Tag 5 nach Infarkt 13.272 EpiSCs und von Tag 21 nach Infarkt 1.714 EpiSCs analysiert werden. In der gemeinsamen Analyse der Zellen beider Zeitpunkte konnten dabei 16 transkriptionell unterschiedliche EpiSC-Populationen identifiziert werden (

Abbildung 5A). In Abbildung 5B ist die Größe der EpiSC-Cluster des kombinierten Datensatzes 5 und 21 Tage nach Infarkt in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl (%) abgebildet. Abbildung 5C stellt die relativen Anteile der Zellen der Analyse 5 bzw. 21 Tage nach Infarkt in den Clustern der kombinierten Clusteranalyse beider Zeitpunkte dar.

Das größte Cluster des kombinierten Datensatzes bildete Cluster 0, das 17,78 % der Gesamtzellzahl ausmachte (Abbildung 5B). Dabei machten die Zellen 5 Tage nach Infarkt einen mehr als doppelt so großen relativen Anteil in Cluster 0 aus, als Zellen 21 Tage nach Infarkt (Abbildung 5C). Cluster 1-4 hatten etwa den gleichen Anteil an der Gesamtzellzahl. Cluster 1 machte jedoch einen mehr als doppelt so großen Anteil des Datensatzes von Tag 21 als von Tag 5 nach Infarkt aus. In Cluster 2 dagegen war das relative Verhältnis ausgeglichen. In Cluster 3 und 4 überwog deutlich der relative Anteil der Zellen aus dem Datensatz 5 Tage nach Infarkt. Die Cluster 5 und 6 hatten einen ähnlichen Anteil an der Gesamtzellzahl (Abbildung 5B), wobei in Cluster 5 der relative Anteil an Zellen 21 Tage nach Infarkt und in Cluster 6 der relative Anteil an Zellen 5 Tage nach Infarkt überwog (Abbildung 5C). Cluster 7-15 machten jeweils weniger als 5 % der Gesamtzellzahl aus (Abbildung 5B). Auffällig war Cluster 12 (1,72 % der Gesamtzellzahl), welches ausschließlich aus Zellen 5 Tage nach Infarkt bestand. Dem entsprechend konnte von Cluster 12 im Folgenden kein Vergleich der beiden Zeitpunkte vorgenommen werden (siehe 4.1.2.3).

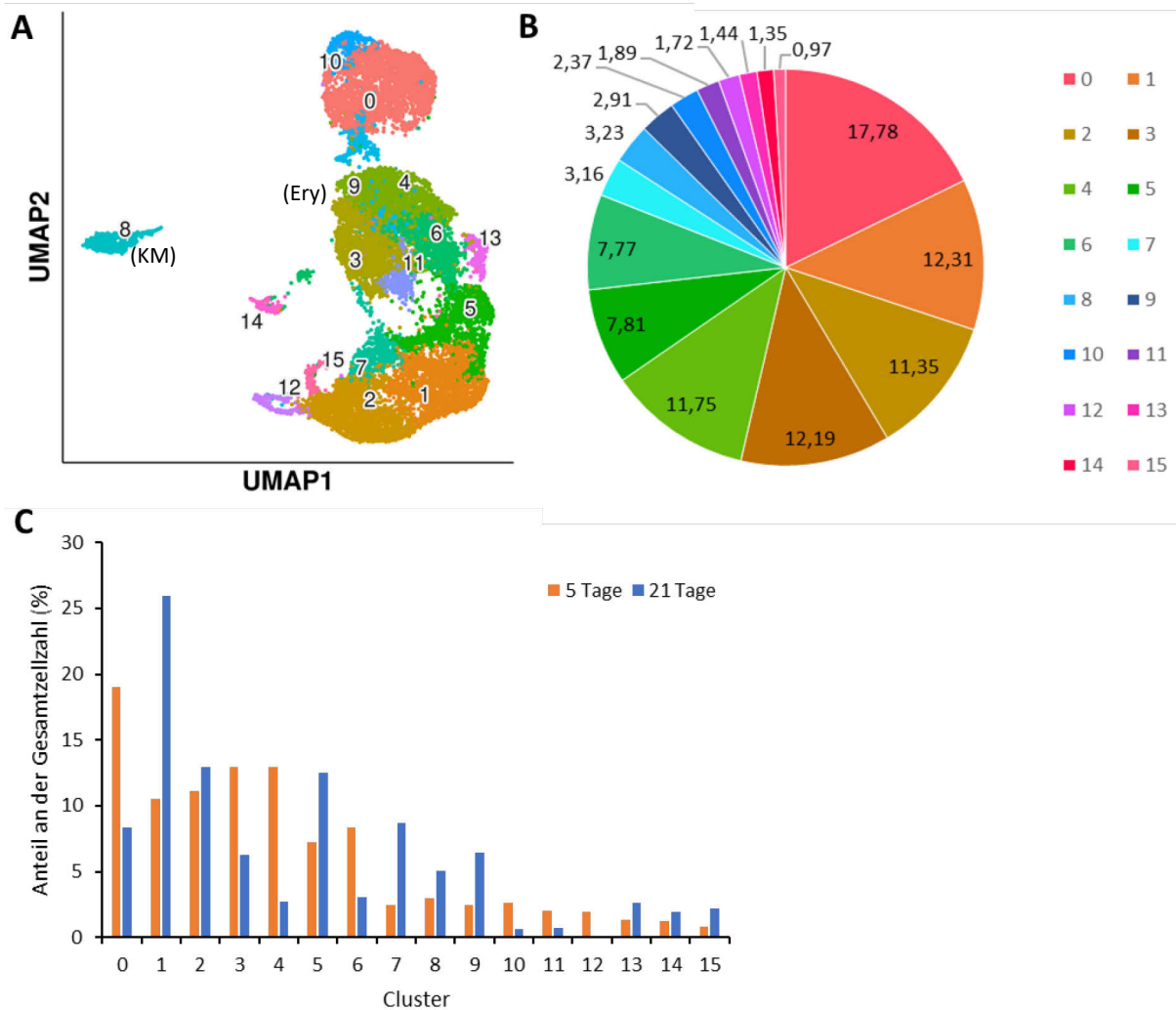


Abbildung 5: Kombinierte Clusteranalyse der EpiSC-Datensätze von der scRNAseq 5 und 21 Tage nach Infarkt. **A:** UMAP-Plot der kombinierten EpiSC-Datensätze zur Illustration der identifizierten EpiSC-Cluster. Die Clusternummerierung erfolgte fortlaufend. Von der weiteren Analyse ausgeschlossene Cluster: Cluster 8 (Kardiomyozyten (KM)), Cluster 9 (Erythrozyten (Ery)). **B:** Größe der EpiSC-Cluster der kombinierten Datensätze 5 und 21 Tage nach Infarkt in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl der kombinierten Datensätze (%). **C:** Relative Anteile der Zellen innerhalb der Cluster an der Gesamtzellzahl des Tag 5 bzw. Tag 21 - Datensatzes.

4.1.2.2 Charakterisierung der Cluster

Um die EpiSC-Cluster der gemeinsamen Datensatzanalyse der EpiSCs 5 und 21 Tage nach Infarkt hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung zu charakterisieren, wurden die Top 10 der Markergene der einzelnen Cluster untersucht, also der Gene, die in einem Cluster im Vergleich zu den anderen Clustern signifikant erhöht exprimiert waren. Da von dieser Analyse bekannt war, dass einige der EpiSCs 5 Tage nach Infarkt auch Fibroblasten-assoziierte Gene exprimierten, wurden die Cluster der kombinierten

Analyse hinsichtlich einer möglichen Einteilung in Fibroblasten- und EpiSC-Populationen nach Farbehi *et al.*¹³¹ geprüft. Bei dieser Einteilung wurden stromale Zellen aus infarzierten Herzen, basierend auf scRNAseq-Ergebnissen, Subtypen zugeordnet. Zudem wurde mithilfe der Plattform GOrilla¹³⁰ geprüft, ob die Markergene der einzelnen Cluster signifikante Anreicherungen an GO-Annotationen zeigten. Eine Übersicht der Top 10-Markergene jedes Clusters und die Top 3 der angereicherten GO-Annotationen, die den signifikant exprimierten Genen der jeweiligen Cluster zugeordnet werden konnte, ist in Abbildung 6A und B dargestellt.

Cluster 0 zeichnete sich durch die Expression sowohl epikardialer als auch epithelialer Gene aus. Unter den Top 10-Markergenen befanden sich die Epikard-spezifischen Transkripte *Saa3*, *Clu*, *Dmkn* sowie der klassische EpiSC-Marker *Wt1*¹³². Ebenfalls unter den Top 10-Markergenen waren die Epithel-assoziierten Gene *Nkain4* und *Lgals7* zu finden. Die Markergene des Clusters wurden den beiden angereicherten GO-Annotationen „*cell adhesion*“ und „*regulation of multicellular organismal process*“ zugeordnet. Auch in der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt konnte ein Cluster mit diesen Markergenen identifiziert werden, welches ebenfalls das größte Cluster der Analyse war (Tag5-Cluster 1).

Cluster 1 kennzeichnete die unter die Top 10 fallenden Markergene *ApoE*, *Inmt* und *Cfh*. Diese zeichnen typischerweise F-Trans (*Fibroblast - transitory*) aus, eine transitorische Fibroblastenpopulation, welche keine Aktivierungsmarker exprimiert¹³¹. Ebenfalls wurde unter den Top 10 *Gsn* exprimiert, welches die Modulation von Aktin-Filamenten in Zellen reguliert¹³³. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Treffer „*response to dietary excess*“, „*regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism*“ und „*regulation of viral process*“. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt konnte ein Cluster mit einigen dieser Markergenen identifiziert werden, welches jedoch ein Cluster mittlerer Größe darstellte (Tag5-Cluster 5).

Cluster 2 zeichnete sich durch die Expression von *Gsn* und Kollagenketten aus. Basierend auf weiteren erhöht exprimierten Genen war dieses Cluster am ehesten den F-SL (*Fibroblast - Sca-1 low*¹³¹) zuzuordnen. Zudem wurden unter den Top 10-Markergenen *Smoc2* und *Sparcl1*, beides Mitglieder der *secreted protein acidic and rich in cysteine* (SPARC)-Familie, identifiziert, die beide für Matrixproteine kodieren¹³⁴. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen ergab unter anderem „*extracellular*

structure organization“ und *„extracellular matrix organization*“. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt befand sich ein Cluster mit hoher Übereinstimmung der Markergene (Tag5-Cluster 3).

Cluster 3 zeichnete sich durch die Expression von *Cd44* aus, einem mesenchymalen Marker. Neben *Cd44* befindet sich *Tnc* unter den Top 10-Markergenen, das für ein matrizelluläres Protein kodiert¹³⁵. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte unter anderem den Treffer *„collagen fibril organization*“. Die scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt ergab gleich 2 Cluster, in denen diese Markergene stark angereichert waren (Tag5-Cluster 4 und 8).

Cluster 4 prägte die Expression von Chemokinen wie *Cxcl5*, *Ccl9* und *Ccl7*, die zu den Top 10-Markergenen gehörten. Zu den weiteren signifikanten Markergenen, aber nicht unter den Top 10, zählten Proliferationsmarker, wie *Top2a*. Hierzu passten auch die gefundenen angereicherten GO-Annotationen *„cell cycle*“ und *„cell cycle process*“. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt waren in Tag5-Cluster 11 ebenfalls Transkripte von Chemokinen stark angereichert. Dies stellte jedoch das kleinste Cluster der Analyse dar.

Cluster 5 zeichnete sich durch ECM-kodierende Transkripte, darunter *Eln*, *Postn* oder *Col3a1*, aus. Zudem zählten zu den Top 10 auch die Gene *Sfrp1* und *Sfrp2*, welche mit dem Wnt-Signalweg assoziiert werden¹³⁶. Die Top 3 angereicherten GO-Annotationen dieses Clusters waren *„collagen fibril organization*“, *„supramolecular fiber organization*“ und *„extracellular structure organization*“. Zum Teil Übereinstimmungen zeigte das Tag5-Cluster 6 der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt.

In Cluster 6 befanden sich unter den Top 10-Markergenen die Myofibroblastenmarker *Acta2*, *Cthrc1* und *Postn*. *Tnc* und Gene für Kollagenketten waren unter den weiteren erhöht exprimierten Transkripten. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen führte zu den Treffern *„anatomical structure development*“ und *„tissue development*“. Vor allem *Acta2* war in der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt in Tag5-Cluster 2 angereichert, dem zweitgrößten Cluster.

Cluster 7 prägte die Expression von Transkripten, die spezifisch für nicht-aktivierte Fibroblasten des Typs F-SH (*Fibroblast - Sca-1 high*¹³¹) waren. In den Top 10-Markergenen waren gleich mehrere für diese Fibroblasten typische Transkripte erhöht exprimiert, darunter *Pi16*, *Tmtm100* und *Gfpt2*. Das namensgebende Transkript *Ly6a*

(Sca-1) befand sich ebenfalls unter den erhöht exprimierten Transkripten. Zudem wurden die angereicherten GO-Annotationen „*nucleotide-sugar metabolic process*“ und „*lipid metabolic process*“ gefunden. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt befand sich kein übereinstimmendes Cluster, lediglich in Tag5-Cluster 3 war auch das Transkript *Pi16* angereichert.

Cluster 8 zeichnete sich vorrangig durch Kardiomyozyten-spezifische Transkripte wie *Tnnt2*, *Mb* oder *Actc1* aus, was darauf hindeutet, dass es sich bei den enthaltenen Zellen um Kardiomyozyten handelte. Daher wurde dieses nicht-stromale Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

In Cluster 9 fielen Transkripte unter die Top 10-Markergene Gene, die Erythrozyten auszeichnen, wie *Hbb-bs*. Daher wurde auch dieses Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Cluster 10 zeichnete sich durch die Expression von epithelialen Transkripten, wie *Msln*, *Krt19* oder *Dmkn*, aus. Auch der epikardiale Marker *Wt1* konnte signifikant detektiert werden. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte Treffer zu „*cell-cell adhesion*“, „*cell adhesion*“ und „*biological adhesion*“. Ein epitheliales Cluster konnte mit Tag5-Cluster 7 auch in der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt identifiziert werden.

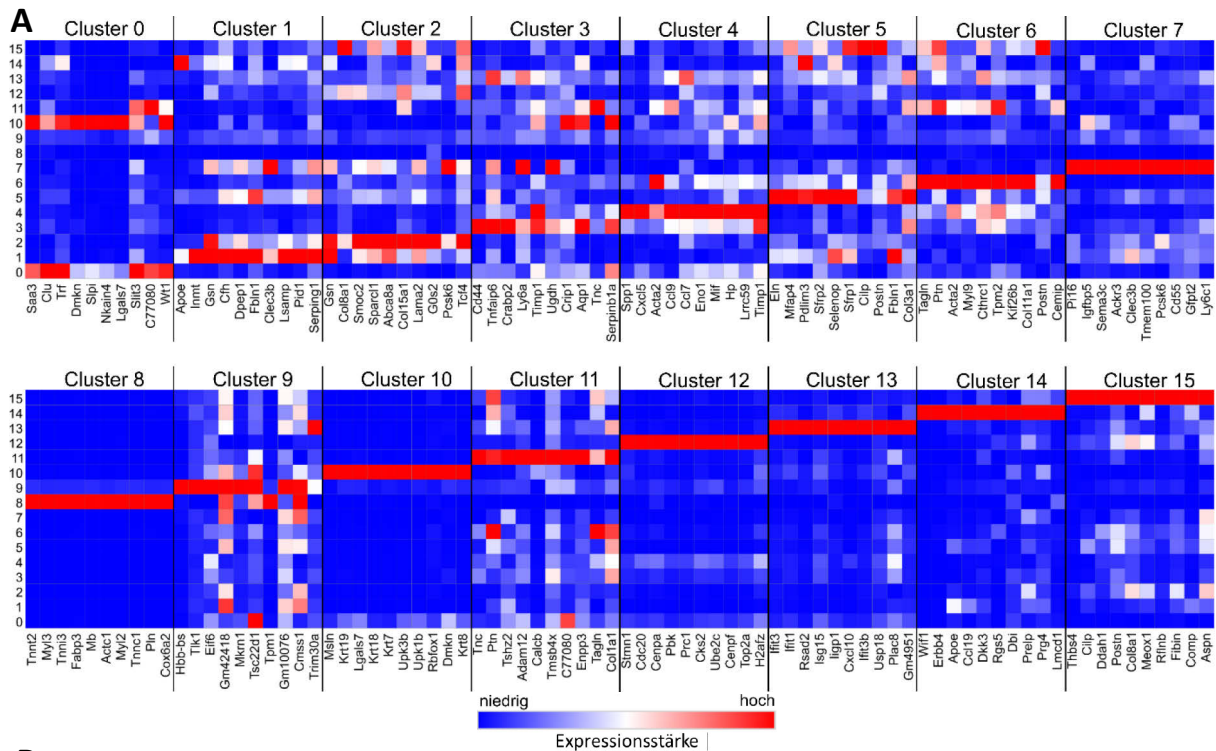
Cluster 11 prägten die Matrix-kodierenden Transkripten wie *Tnc* oder *Col1a1* unter den Top 10. Auch *Tmsbx4* und *Wt1* befanden sich unter den erhöht exprimierten Markergenen. Dem Cluster wurden die angereicherten GO-Annotationen „*multicellular organismal process*“, „*anatomical structure development*“ und „*developmental process*“ zugeordnet. Ein Cluster mit ähnlichen Markergenen wurde auch in der der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt identifiziert (Tag5-Cluster 8).

Cluster 12 zeichnete sich durch *Top2a* unter den Top 10-Markergene aus, was auf eine Zuordnung zu den F-Cyc (*Fibroblast - cycling*), einer proliferierenden Fibroblastenpopulation¹³¹, schließen ließ. Auch weitere mit F-Cyc-assoziierte Transkripte werden unter den Top 10 exprimiert (*Stmnt1*, *Cenpa*, *H2afz*¹³¹). Dem entsprechend waren Zellzyklus-bezogene GO-Annotationen angereichert („*mitotic cell cycle process*“, „*cell cycle*“ und „*cell cycle process*“). Dieses Cluster enthielt ausschließlich Zellen der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt. Aufgrund der Markerübereinstimmung handelt es sich wahrscheinlich um Tag5-Cluster 9.

In Cluster 13 befanden sich unter den Top 10-Markergenen *Ifit3*, *Ifit1* und *Isg15*, die mit der zellulären Antwort auf Interferon assoziiert werden (F-IFNS, *fibroblast - interferon stimulated*¹³¹). Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Treffer „*response to other organism*“, „*response to external biotic stimulus*“ und „*response to biotic stimulus*“. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt waren in Tag5-Cluster 11 ebenfalls Interferon-assoziierte Transkripte angereichert.

Cluster 14 zeichnete sich durch die Markergene *Wif1* und *Dkk3* unter den Top 10 aus, die eine antagonistische Funktion im Wnt-Signalweg übernehmen¹³⁷ und mit F-WntX (*Fibroblast - Wnt expressing*) assoziiert werden¹³¹. Für dieses Cluster wurden die GO-Annotationen „*G protein-coupled receptor signaling pathway*“, „*regulation of signal transduction*“ und „*regulation of response to stimulus*“ gefunden. In der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt waren in Tag5-Cluster 10 ebenfalls ähnliche Markergene des Wnt-Signalwegs angereichert.

Cluster 15 zeichnete sich durch Markergene unter den Top 10 aus, die mit aktivierten Fibroblasten assoziiert werden, darunter *Cilp*, *Postn* und *Meox1*. Auch nach der Zuordnung nach Farbehi *et al.* zählte dieses Cluster zu den F-Act (*Fibroblast: activated*). Bei der Suche nach angereicherten GO-Annotationen wurden die Treffer „*tissue development*“, „*biological adhesion*“ und „*cell adhesion*“ gefunden. Ein ähnliches Cluster konnte in der scRNAseq von Tag 5 nach Infarkt nicht identifiziert werden.



B

EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert	EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert
0	cell adhesion	1.00E+00	8	muscle contraction	5.4E-11
	regulation of multicellular organismal process	1.00E+00		muscle system process	2.7E-11
	response to dietary excess	2.21E-1		cardiac muscle contraction	3.43E-10
1	regulation of symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	1.39E-1	9	mRNA processing	1.00E+00
	regulation of viral process	9.27E-2		cell-cell adhesion	2.11E-2
2	extracellular structure organization	1.22E-2	10	cell adhesion	1.17E-1
	extracellular matrix organization	2.18E-2		biological adhesion	8.00E-02
	bleb assembly	1.00E+00		multicellular organismal process	2.4E-2
3	cellular response to acid chemical	9.45E-2	11	anatomical structure development	1.22E-2
	collagen fibril organization	1.23E-1		developmental process	2.36E-2
	cellular response to light stimulus	8.55E-2		mitotic cell cycle process	8.33E-25
4	cell cycle	4.05E-5	12	cell cycle	7.07E-24
	cell cycle process	1.26E-4		cell cycle process	8.31E-22
5	nucleoside diphosphate phosphorylation	1.7E-4	13	response to other organism	2.48E-18
	collagen fibril organization	4.04E-1		response to external biotic stimulus	5.00E-18
	supramolecular fiber organization	2.75E-1		response to biotic stimulus	3.33E-18
6	extracellular structure organization	1.88E-1	14	G protein-coupled receptor signaling pathway	1.07E-1
	anatomical structure development	9.14E-3		regulation of signal transduction	7.22E-2
7	tissue development	1.4E-2	15	regulation of response to stimulus	6.55E-2
	biomineral tissue development	1.2E-2		tissue development	1.00E+00
7	nucleotide-sugar metabolic process	1.94E-1	15	biological adhesion	1.00E+00
	lipid metabolic process	3.4E-1		cell adhesion	1.00E+00

Abbildung 6: Clustercharakterisierung der kombinierten EpiSC-Datensätze der scRNAseq-Analysen 5 und 21 Tage nach Infarkt. A: Heatmap der Top 10 signifikant exprimierten mRNA-Transkripte innerhalb des individuellen EpiSC-Clusters im Vergleich zu den anderen Clustern. **B:** Angereicherte GO-Annotationen (Top 3 nach Signifikanz, ermittelt über den FDR q-Wert) aller Markergene für jedes Cluster. Die Suche nach GO-Annotationen erfolgte über die Plattform GOrilla¹³⁰.

Zur vereinfachten Darstellung wurden, basierend auf der Einteilung der Cluster nach Hesse & Owenier *et al.*⁸⁹, die Cluster in Gruppen unterteilt. Nachfolgend wurden

Cluster 10 und 0, die klassische epikardiale und epitheliale Transkripte exprimieren, als „Gruppe I“ bezeichnet. Die EpiSC-Cluster 3-6, 11, 13 und 15 wurden als „Gruppe II“ zusammengefasst, da sie unter anderem alle aCF- oder Myofibroblasten-assoziierte Transkripte exprimieren. EpiSC-Cluster 1, 2, 7 und 14, die auch Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten exprimieren, wurden als „Gruppe III“ zusammengefasst.

4.1.2.3 Vergleich der Genexpression an Tag 5 und 21 nach Infarkt

Um Unterschiede in der Genexpression von EpiSCs an Tag 5 zu Tag 21 nach Infarkt feststellen zu können, wurde das transkriptionelle Profil der EpiSCs von den beiden Zeitpunkten verglichen. Cluster, bestehend aus nicht stromalen Zellen (Kardiomyozyten, Cluster 8; und Erythrozyten, Cluster 9), wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (siehe Appendix, Tabelle 8). Innerhalb der Cluster konnten im Vergleich der Zellen der beiden Zeitpunkte Transkripte identifiziert werden, die signifikante Unterschiede der mittleren Genexpressionsstärke aufzeigten. Da Cluster 12 nur EpiSCs von Tag 5 nach Infarkt beinhaltete, konnte für dieses Cluster kein Vergleich zu Tag 21 nach Infarkt vorgenommen werden.

Zum Vergleich des funktionellen Profils der EpiSCs wurden Transkripte von parakrinen Faktoren, Chemokinen, Fibrose-assoziierten Genen und Kollagen-assoziierten Genen analysiert (Abbildung 7A-D).

Die Untersuchung der parakrinen Faktoren zeigte, dass ein Großteil der Transkripte an Tag 21 nach Infarkt höher exprimiert war (Abbildung 7A). Vor allem proangiogene parakrine Faktoren, wie *Angpt1*¹³⁸, *Ang*¹³⁹, *Adamts1*¹⁴⁰ oder *Vegf*⁶³, waren 21 Tage nach Infarkt stärker exprimiert. Die parakrinen Faktoren *Nrg1* und *Mydgf* waren hingegen in den Clustern mit Expressionsunterschieden hauptsächlich an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert. Sie werden mit der Proliferation¹⁴¹ beziehungsweise dem Überleben¹⁴² von Kardiomyozyten und der Herzheilung assoziiert.

Die meisten untersuchten Chemokine waren an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert (Abbildung 7B). Auffällig war, dass *Ccl2* und *Cxcl5* in den *Wt1*-exprimierenden Clustern (Cluster 0, 10 und 11) an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert waren. Beide spielen bei der Inflammation eine Rolle: CCL2 reguliert die Rekrutierung von Monozyten und Makrophagen¹⁴³, wohingegen CXCL5 die Makrophagenpolarisierung fördert und Neutrophile rekrutiert¹⁴⁴. *Cxcl12* war in Clustern der Gruppe II, die

Merkmale von aktivierten Fibroblasten aufwiesen, an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert. *Ccn2* und *Cxcl1* dagegen waren in dem Großteil der Cluster an Tag 21 nach Infarkt höher exprimiert. CCN2 übernimmt eine wichtige Rolle in der Wiederherstellung des Bindegewebes, indem es die Fibroblastendifferenzierung steuert, und hat daher profibrotische Eigenschaften¹⁴⁵. CXCL1 verringert dagegen kardiale Fibrose und ist in der Herzheilung und Angiogenese beteiligt^{146,147}.

Die Analyse der Fibrose-assoziierten Transkripte zeigte, dass die Transkripte *Eln* und *Cilp*, die beide für ECM-Proteine kodierenden, vor allem von Gruppe I und II-Clustern an Tag 21 nach Infarkt stärker exprimiert wurden. Von Gruppe III-Clustern wurden sie jedoch an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert (Abbildung 7C). Hervorzuheben ist auch die Expression der Transkripte der SPARC-Familie: Das Transkript *Sparc* wurde durchgehend an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert, wohingegen *Sparc11* und *Smoc2* von einem Großteil der Cluster an Tag 21 nach Infarkt stärker exprimiert waren. Das ebenfalls für ECM-Proteine kodierende Transkript *Postn* war an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert (Abbildung 7C). Dies deckt sich mit der Annahme, dass *Postn* nach Infarkt in geschädigtem Gewebe hochreguliert wird und damit zur Gewebewiederherstellung oder auch Fibrose beiträgt¹⁴⁵. *Postn* bindet direkt an die Matrixproteine Kollagen Typ 1, Fibronectin und Tenascin-C (TNC), deren Transkripte *Col1a1*, *Col1a2*, *und *Tnc* ebenfalls an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert waren (Abbildung 7C und D). TNC wiederum wird von der Matrix-Metalloproteinase MMP-2 gespalten¹⁴⁵, deren Transkript *Mmp2* von Gruppe I und II-Clustern an Tag 21 nach Infarkt stärker exprimiert war. Die Transkripte der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren *Timp1* und *Timp2* waren antagonistisch exprimiert. Während *Timp1* in allen Clustern an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert war, war *Timp2* ebenfalls ausschließlich an Tag 21 nach Infarkt höher exprimiert (Abbildung 7C). Zusätzlich zu der inhibitorischen Funktion ist TIMP1 mit einer erhöhten Resistenz von Kardiomyozyten gegen Apoptose assoziiert¹⁴⁸.*

Die Transkripte der fibrillären Kollagene Typ 1 und 3 (*Col1a1*, *Col1a2* und *Col3a1*) waren in einem Großteil der Cluster an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert (Abbildung 7D). Ihre Sekretion ist maßgeblich für die Narbenbildung nach Infarkt aber auch für kardiale Fibrose verantwortlich¹⁴⁹. Im Gegensatz dazu wurde das Transkript des Kollagens Typ 6 (*Col6a1*) nur an Tag 21 nach Infarkt stärker exprimiert. Die Vernetzung (*Crosslinking*) sezernierter Kollagene erfolgt durch Mitglieder der Lysosyl-Oxidase- und Transglutaminase-Familie^{149,150}. Die zu dieser Familie gehörenden

Transkripte (*Lox*, *Lox1*, *Lox2*, *Lox3*) wurden fast ausschließlich an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert (Abbildung 7D). Auffällig war auch *Acta2*, welches bei der Gewebeheilung von Myofibroblasten exprimiert wird¹⁵¹, und in fast allen Clustern an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert war (Abbildung 7D).

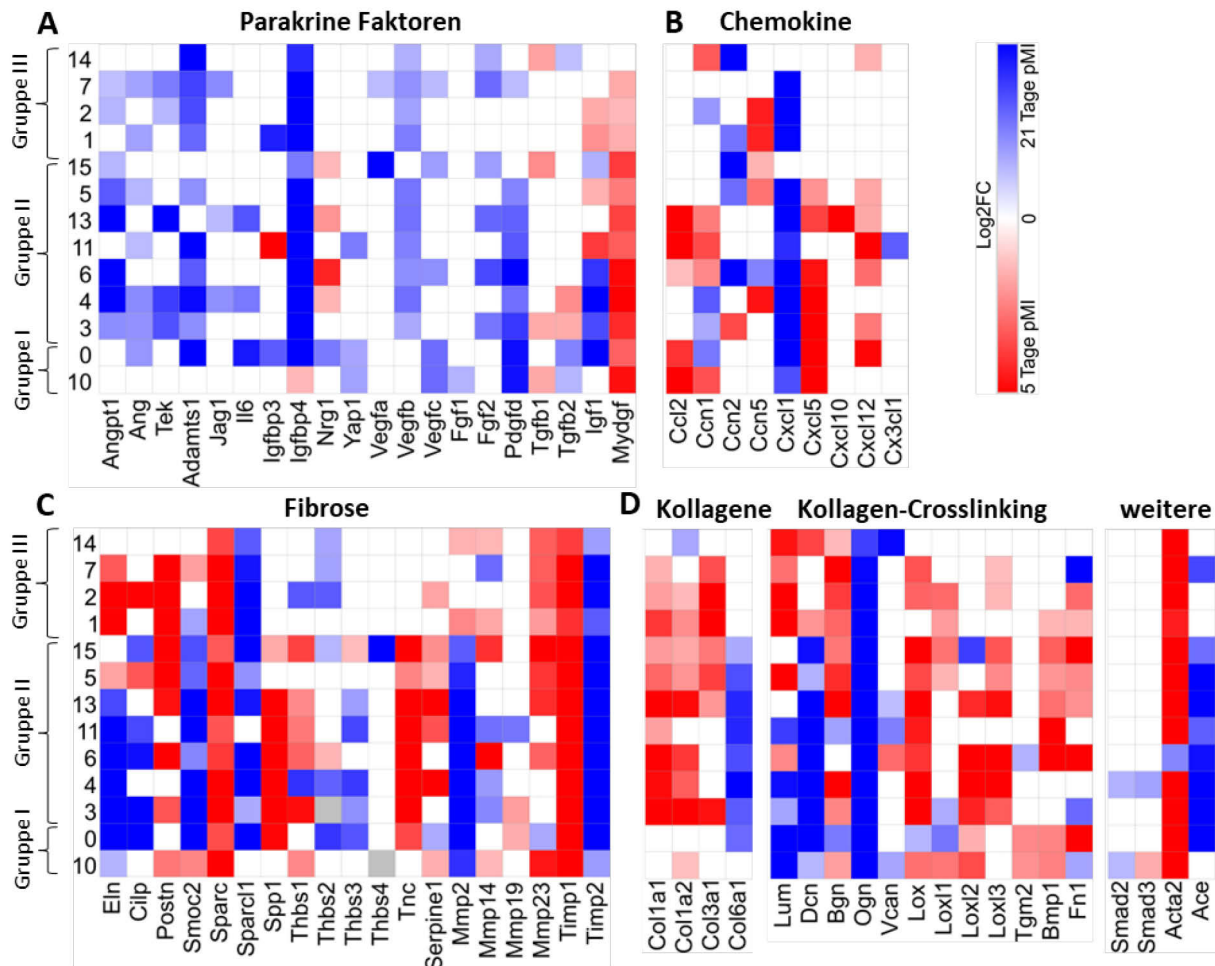


Abbildung 7: Vergleich der Genexpression von EpiSCs 5 und 21 Tage nach Infarkt. Gezeigt sind Heatmaps der mittleren Log₂ Fold Changes (Log₂FC) von signifikant veränderten Transkripten zwischen den beiden untersuchten Zeitpunkten für jedes EpiSC-Cluster. Untersucht wurden ausgewählte Transkripte von **A:** Parakrinen Faktoren, **B:** Chemokinen, **C:** Fibrose-assoziierten Genen, **D:** Kollagenen, Kollagen-Crosslinking und weiteren Kollagen-assoziierten Genen. Rot: Höhere Genexpression an Tag 5 nach Infarkt, blau: Höhere Genexpression an Tag 21 nach Infarkt, weiß: Kein signifikanter Unterschied. pMI: post Myokardinfarkt. Gruppe I: EpiSC-Cluster, in denen klassische epikardiale und epitheliale Transkripte angereichert waren. Gruppe II: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem aCF- oder Myofibroblasten-assoziierte Transkripte angereichert waren. Gruppe III: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten angereichert waren.

4.1.3 Expression von WT-1 im Epikard zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt

Zur weiteren Charakterisierung des Epikards auf Proteinebene, dabei vor allem der WT-1⁺-EpiSCs, wurden WT-1⁺-Zellen über drei Wochen nach Infarkt verfolgt. Hierfür wurde die WT-1-Expression mit *Wt1^{CreERT2}Rosa^{TdTomato}*-Mäusen nachverfolgt, sodass WT-1-exprimierende Zellen und deren Nachkommen das Reporterprotein TdTomato exprimieren. Dabei wurden Veränderung der WT-1-Expression im Epikard nach Infarkt untersucht, um festzustellen, ob WT-1, ein Marker für aktiviertes Epikard, nicht nur an Tag 5 nach Infarkt, sondern auch zu weiteren Zeitpunkten nach Infarkt heterogen im Epikard exprimiert wird. In Immunfluoreszenzfärbungen von Herzschnitten wurde die TdTomato-Expression bis 21 Tage nach Infarkt nachverfolgt (Abbildung 8). Bereits einen Tag nach Infarkt war TdTomato im Epikard und auch vereinzelt im Myokard detektierbar, was für eine unmittelbare Aktivierung des Epikards nach Infarkt spricht. Die TdTomato-Expression im Epikard erreichte an Tag 7 nach Infarkt ihren Höhepunkt, an dem der Großteil der epikardialen Zellen TdTomato exprimiert. An Tag 14 nach Infarkt nahm die TdTomato-Expression im Epikard ab und war an Tag 21 nach Infarkt nur noch in wenigen epikardialen Zellen detektierbar. Interessanterweise nahmen TdTomato⁺-exprimierende Zellen im Myokard im Verlauf der Zeit zu.

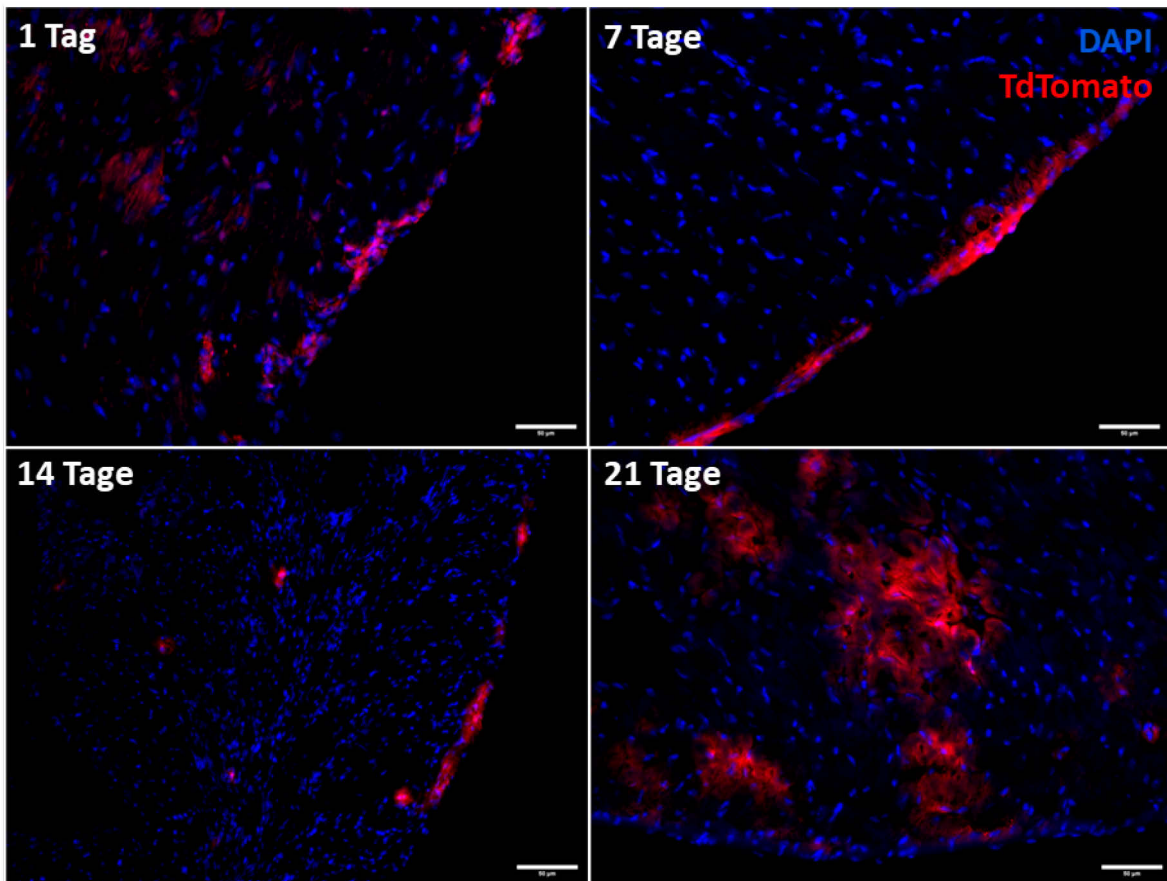


Abbildung 8: Nachverfolgung der WT-1-Expression über TdTomato in $Wt1^{CreERT2}Rosa^{TdTomato}$ -Mäusen nach MI über die Zeit. Immunfluoreszenzfärbung des Epikards Kryo-eingebetteter Herzen 1, 7, 14 und 21 Tage nach Myokardinfarkt. Die Aufnahmen zeigen repräsentative Ausschnitte des linken Ventrikels mit Infarktbereich und darüberliegendem Epikard. Rot: TdTomato (WT-1-Nachverfolgung), blau: DAPI (Zellkerne). Schichtdicke 10 µm, Skalierung: 50 µm. 1 Tag nach Infarkt: n = 1 Herz; 7-21 Tage nach Infarkt: n = 2 Herzen.

4.2 Einfluss von S1P auf die Herzheilung

Um den Einfluss von S1P auf die Herzheilung zu untersuchen, wurde zunächst die Expression von relevanten Genen des S1P-Metabolismus in dem bereits vorhandenen scRNAseq-Datensatz der EpiSCs 5 Tage nach Infarkt⁸⁹ überprüft. Hierbei zeigte sich, dass gleich mehrere Gene des S1P-Metabolismus in *Wt1*-exprimierenden Clustern (Cluster 1, 7 und 8) hoch exprimiert waren (Abbildung 9). Hierzu gehörte *Sptlc2*, welches für Serin-C-Palmitoyltransferase kodiert und in allen drei *Wt1*-exprimierenden Clustern hoch exprimiert war. *S1pr3*, ein Rezeptor für S1P, war vor allem in Cluster 8 stark exprimiert. In Cluster 1 und 7 dagegen war *Sgpp1*, welches für S1P-Phosphatase 1 kodiert, stark exprimiert. Ebenfalls in Cluster 7 waren *Smpd1*, vor allem aber *Smpd3*, hoch exprimiert (Abbildung 9). Sie kodieren für Sphingomyelin-Phosphodiesterasen,

welche eine Schlüsselreaktion in der Biosynthese von Sphingosin katalysieren. Weitere Gene des S1P-Metabolismus waren in allen EpiSC-Clustern stark exprimiert (Abbildung 9). Dazu zählten *Plpp1* und *Plpp3*, welche für Phospholipid-Phosphatasen kodieren. Phospholipid-Phosphatasen hydrolysieren extrazelluläres S1P und konvertieren es in intrazelluläres S1P¹⁵². Auch *Asah1*, das für saure Ceramidase kodiert, war in allen EpiSC-Clustern stark exprimiert (Abbildung 9).

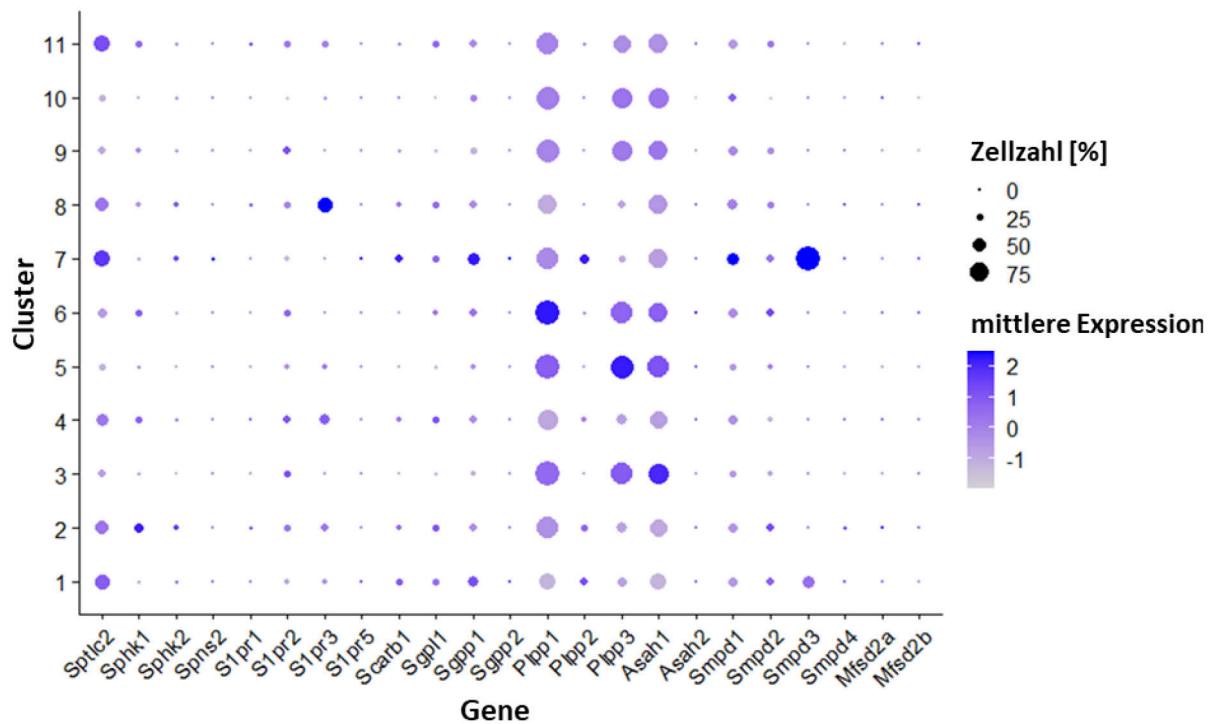


Abbildung 9: Expression relevanter Gene des S1P-Metabolismus in EpiSCs 5 Tage nach Infarkt. Gezeigt ist die Zellanzahl (%) und die mittlere Expression als Dotplot. Die scRNAseq zur Bestimmung der Genexpression erfolgte von EpiSCs aus Wildtypmäusen 5 Tage nach Infarkt (n = 3). Die Daten stammen aus dem Datensatz, welcher bereits für die Lokalisationsstudie und die Genexpressionsanalyse von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt verwendet und von Dr. rer. nat. Christoph Owenier und Dr. rer. nat. Julia Hesse generiert wurden (Hesse & Owenier *et al.* 2021⁸⁹ (Creative Commons Attribution License; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)).

Die Beobachtung, dass relevante Gene des S1P-Metabolismus in EpiSCs nach Infarkt exprimiert wurden, führte zu der Frage, ob besonders EpiSCs eine wichtige Rolle in der S1P-induzierten Herzheilung spielen könnten. Vor allem die hohe Anreicherung von Transkripten des S1P-Metabolismus in *Wt1*-exprimierenden Clustern ließ vermuten, dass S1P die Herzheilung über WT-1-exprimierende Zellen fördern könnte und dass der Einfluss von S1P zu einer Differenzierung von EpiSCs in Kardiomyozyten führen könnte. Um diese Hypothese, basierend auf den Ergebnissen der

Genexpressionsanalyse von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt, weitergehend zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt die Lipidkonzentrationen verschiedener Sphingolipide in EpiSCs nach Infarkt analysiert. Zum Vergleich wurden die Lipidkonzentrationen ebenfalls in aCFs nach Infarkt gemessen, um einen weiteren stromalen Zelltyp zu analysieren.

4.2.1 Lipidomics-Analyse von EpiSCs und aCFs nach Infarkt

Zur Analyse von Spingolipiden in EpiSCs und aCFs 5 Tage nach Infarkt wurde eine Lipidomics-Analyse mittels LC-MS/MS-Messung durchgeführt. Hierfür wurden $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Mäusen 5 Tage nach Infarkt die Herzen entnommen und EpiSCs und aCFs mit der Langendorff-Methodik isoliert. In der nachfolgenden durchflusszytometrischen Sortierung wurden die Zellen auf eFluor780⁺/CD31⁻/CD45⁻-Zellen sortiert, um Endothel- und Immunzellen auszuschließen. Die EpiSCs wurden zusätzlich in TdTomato⁺- und TdTomato⁻-Fraktionen sortiert, um spezifische Rückschlüsse auf WT-1-exprimierende EpiSCs ziehen zu können. Die Durchführung und Auswertung der LC-MS/MS-Messung erfolgte freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Bodo Levkau (Institut für Molekulare Medizin III, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

In der Lipidomics-Analyse wurden Lipidkonzentrationen von ausgewählten Lipiden des S1P-Metablismus (S1P-Vorstufen), Lysophosphatidylcholine, Sphingomyeline, Phosphatidylcholine und Ceramide untersucht. Hierbei konnten die in Abbildung 10 gezeigten Lipide in EpiSCs und aCFs in variablen Lipidkonzentrationen gemessen werden.

Zusätzlich wurden die Lipidkonzentrationen der beiden stromalen Zelltypen EpiSCs und aCFs miteinander verglichen. Die Analyse der Lipidkonzentrationen von S1P und seinen Vorstufen Sphingosin und Sphinganin ergab dabei ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Bei Sphingosin war mit einem p-Wert von 0,082 jedoch eine Tendenz zu einer gesteigerten Lipidkonzentration in EpiSCs im Vergleich zu aCFs zu erkennen ($4,8 \mu\text{M} \pm 1,41$ (EpiSCs) zu $1,62 \mu\text{M} \pm 0,21$ (aCFs)) (Abbildung 10A). Die Untersuchung der Lipidkonzentrationen von Lyso-Phosphatidylcholinen und Sphingomyelinen ergab im Vergleich der EpiSCs und aCFs ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 10B und C). Bei der Untersuchung der Lipidkonzentrationen der Ceramide konnte eine signifikant gesteigerte

Lipidkonzentration von C16 Ceramid (Cer 16:0) in EpiSCs im Vergleich zu den aCFs detektiert werden ($53,04 \mu\text{M} \pm 5,31$ (EpiSCs) zu $25,98 \mu\text{M} \pm 3,55$ (aCFs), $p = 0,006$) (Abbildung 10D). Die Lipidkonzentrationen der Phosphatidylcholine waren nicht signifikant unterschiedlich, doch auch hier gab es eine Tendenz zur signifikant erhöhten Lipidkonzentration in EpiSCs bei Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1) ($5403,07 \mu\text{M} \pm 2118,26$ (EpiSCs) zu $1078,94 \mu\text{M} \pm 466,62$ (aCFs), $p = 0,096$) (Abbildung 10E). Im Vergleich der Lipidkonzentrationen von TdTomato⁺- und TdTomato⁻-EpiSCs konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

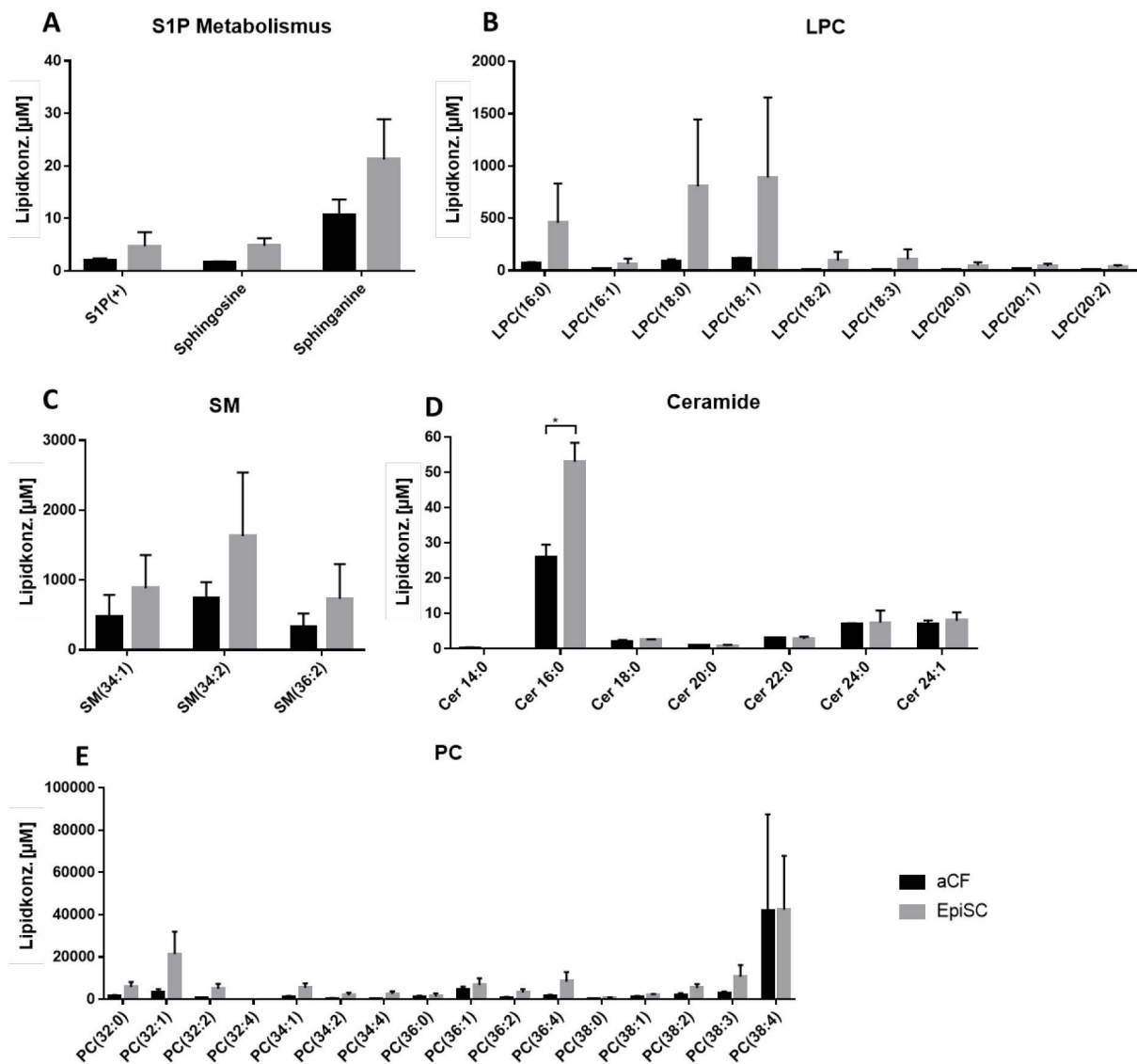


Abbildung 10: Spingolipidkonzentrationen in EpiSCs und aCFs nach Infarkt. Zur Bestimmung der Lipidkonzentrationen wurde eine Lipidomics-Analyse (LC-MS/MS) von aCFs und EpiSCs aus $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Mäusen 5 Tage nach Infarkt, isoliert mittels Langendorff-Methode, durchgeführt. **A:** Ausgewählte Lipide des S1P-Metabolismus (S1P-Vorstufen). **B:** Lysophosphatidylcholine (LPC). **C:** Spingomyeline (SM). **D:** Ceramide (Cer). **E:** Phosphatidylcholine (PC). EpiSCs und aCFs jeweils $n = 3$ Zellpräparationen. Dargestellt sind die

Mittelwerte mit Standardabweichung. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaartem *t*-Test.

4.2.2 Lineage-Tracing der EpiSCs nach S1P-Anreicherung nach Infarkt

Um zu untersuchen, ob S1P zu einer Differenzierung von EpiSCs in Kardiomyozyten führt und so die Herzheilung fördert, wurde ein Lineage Tracing von WT-1⁺-Zellen nach Infarkt unter S1P-Anreicherung durchgeführt. Hierbei wurde endogenes S1P in Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}-Tieren angereichert, indem die Tiere mit dem S1P-Lyase-Inhibitor DOP behandelt wurden, sodass der Abbau des endogenen S1P gehemmt wurde. Die histologische Analyse einer möglichen Differenzierung der WT-1⁺-EpiSCs in Kardiomyozyten wurde an Herzschnitten 21 Tage nach Infarkt mittels IHC-Färbung gegen Kardiomyozyten (ACTN2) und WT-1⁺-EpiSCs (TdTomato) durchgeführt.

Anhand der Aufnahmen der Schnitte konnte eine Ko-Expression von ACTN2 und TdTomato in einzelnen Zellen identifiziert werden, was auf eine Differenzierung von WT-1⁺-EpiSCs in Kardiomyozyten hindeuten könnte (Abbildung 11). Die Auswertung der mittleren ventrikulären Schnitte ergab eine durchschnittliche Anzahl an ACTN2⁺TdTomato⁺-Zellen von 17,69 Zellen ± 2,832 pro mm² Myokardfläche. Die ACTN2⁺TdTomato⁺-Zellen konnten vor allem im Randbereich des Infarktes im linken Ventrikel identifiziert werden (Abbildung 11).

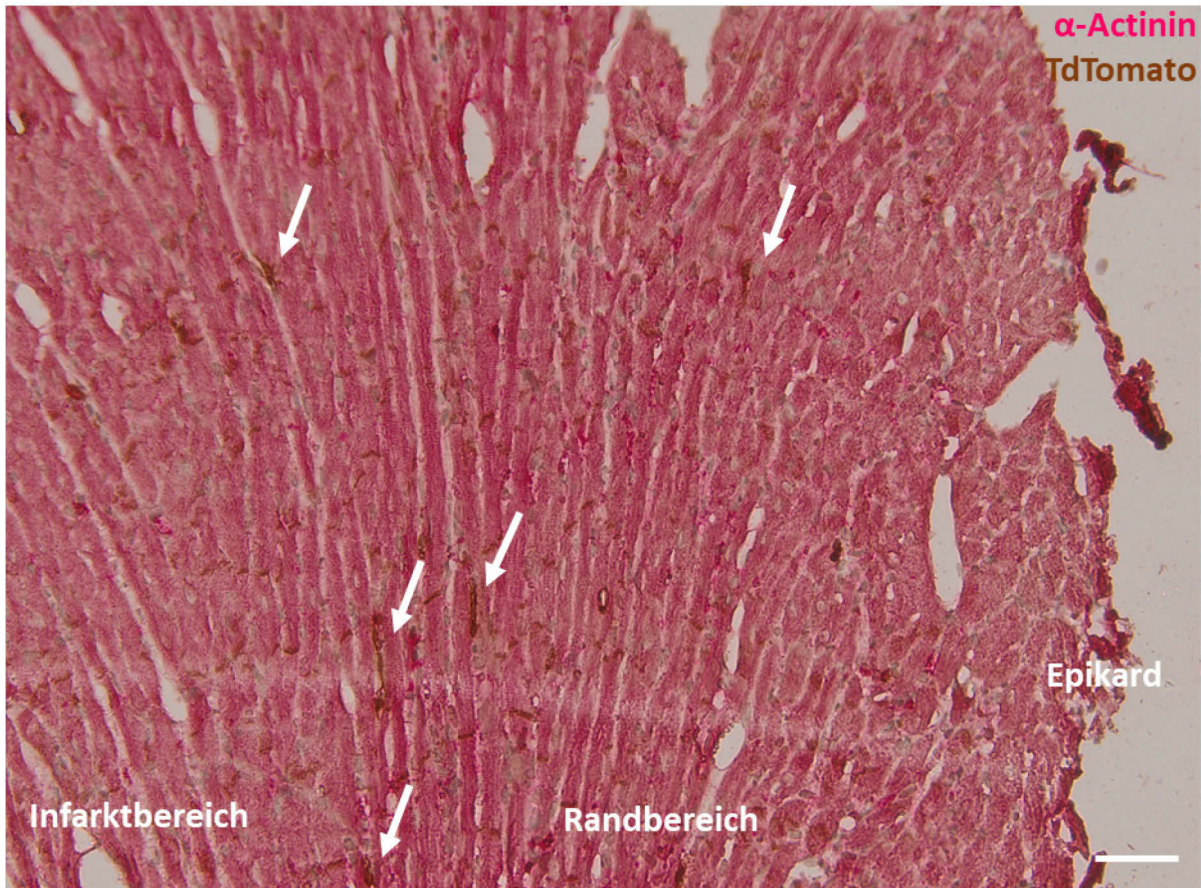


Abbildung 11: Einfluss einer S1P-Anreicherung auf WT-1⁺-EpiSCs in der Infarkttheilung. Die histologische Analyse Paraffin-eingebetteter Herzen von $Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}$ -Tieren 21 Tage nach Infarkt erfolgte mittels IHC-Färbung der mittleren ventrikulären Schnitte. Die S1P-Anreicherung wurde ab einer Woche vor Infarktinduktion mittels einer DOP-Behandlung über das Trinkwasser (30 mg/L) erreicht. Zusätzlich wurde den Tieren Futter ohne Vitamin B6 gegeben. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild der IHC-Färbung mit Epikard, Infarktbereich und Randbereich von $n = 2$ Herzen. Rosa: ACTN2 (Kardiomyozyten), braun: TdTomato (WT-1⁺-Lineage Tracing), blau: Nuklei, mit Hämatoxylin gefärbt. Weiße Pfeile: TdTomato⁺ACTN⁺-Zellen. Skalierung: 50 μ m.

4.3 Einfluss von T β 4 auf die Herzheilung

Zur Untersuchung des Einflusses von T β 4 auf die Herzheilung durch EpiSCs wurde die Protein- und Genexpression von EpiSCs nach Infarkt analysiert. Hierfür wurde T β 4 in Kardiomyozyten überexprimiert, um eine herzspezifische T β 4-Überexpression zu erreichen und so den von Smart *et al.* beschriebenen Effekt, die Reaktivierung der WT-1-Expression in EpiSCs und ihre Differenzierung in Kardiomyozyten⁷⁷, zu verstärken. Dafür wurde eine Transduktion mit dem dafür designten viralem Vektor AAV9-T β 4 vorgenommen, um über die Einbringung eines entsprechenden Transferplasmids die kardiomyozytenspezifische Überexpression von T β 4 zu

erreichen. Als Kontrolle diente der Vektor AAV9-Kontrolle, bei dem keine T β 4-Überexpression stattfand.

4.3.1 Charakterisierung der T β 4-Überexpression mit AAV9

Die Vektoren AAV9-T β 4 und -Kontrolle und ihre Herzspezifität wurden zunächst charakterisiert. Im Zuge dessen wurde eine Biolumineszenzmessung in Wildtypmäusen durchgeführt, denen zuvor entweder das AAV9-T β 4, AAV9-Kontrolle oder PBS intravenös injiziert wurde. Aufnahmen der narkotisierten Mäuse zeigten Biolumineszenzsignale sowohl nach Injektion des AAV9-T β 4 als auch des AAV9-Kontrolle konzentriert im Thorax, was auf eine herzspezifische Lokalisation des Signalursprungs hindeutet (Abbildung 12A). Nach PBS-Injektion war kein Signal sichtbar. Das Signal mit AAV9-T β 4 und AAV9-Kontrolle war an Tag 7 nach Injektion in der Herzregion sichtbar und blieb über den Analysezeitraum bis Tag 28 konstant. Dies spiegelte sich auch in der gemessenen Luziferaseaktivität (durchschnittliche Photonen-Emission über 1 min) wider. Nach Injektion mit AAV9-T β 4 lag die Luziferaseaktivität 7 Tage nach Injektion bei einer durchschnittlichen Photonenemission über 1 min von $4,59 \times 10^7$ p/s/cm²/sr ($\pm 1,31 \times 10^7$) (Abbildung 12B). Auch die Luziferaseaktivität nach Injektion mit AAV9-Kontrolle war 7 Tage nach Injektion detektierbar, wenn auch geringer als beim AAV9-T β 4, und lag bei einer durchschnittlichen Photonenemission über 1 min von $5,35 \times 10^6$ p/s/cm²/sr ($\pm 1,60 \times 10^6$). In der Kontrolle mit PBS war kein Biolumineszenzsignal detektierbar (Abbildung 12B). Die Biolumineszenzmessung belegten die Herzspezifität von AAV9-T β 4 und -Kontrolle.

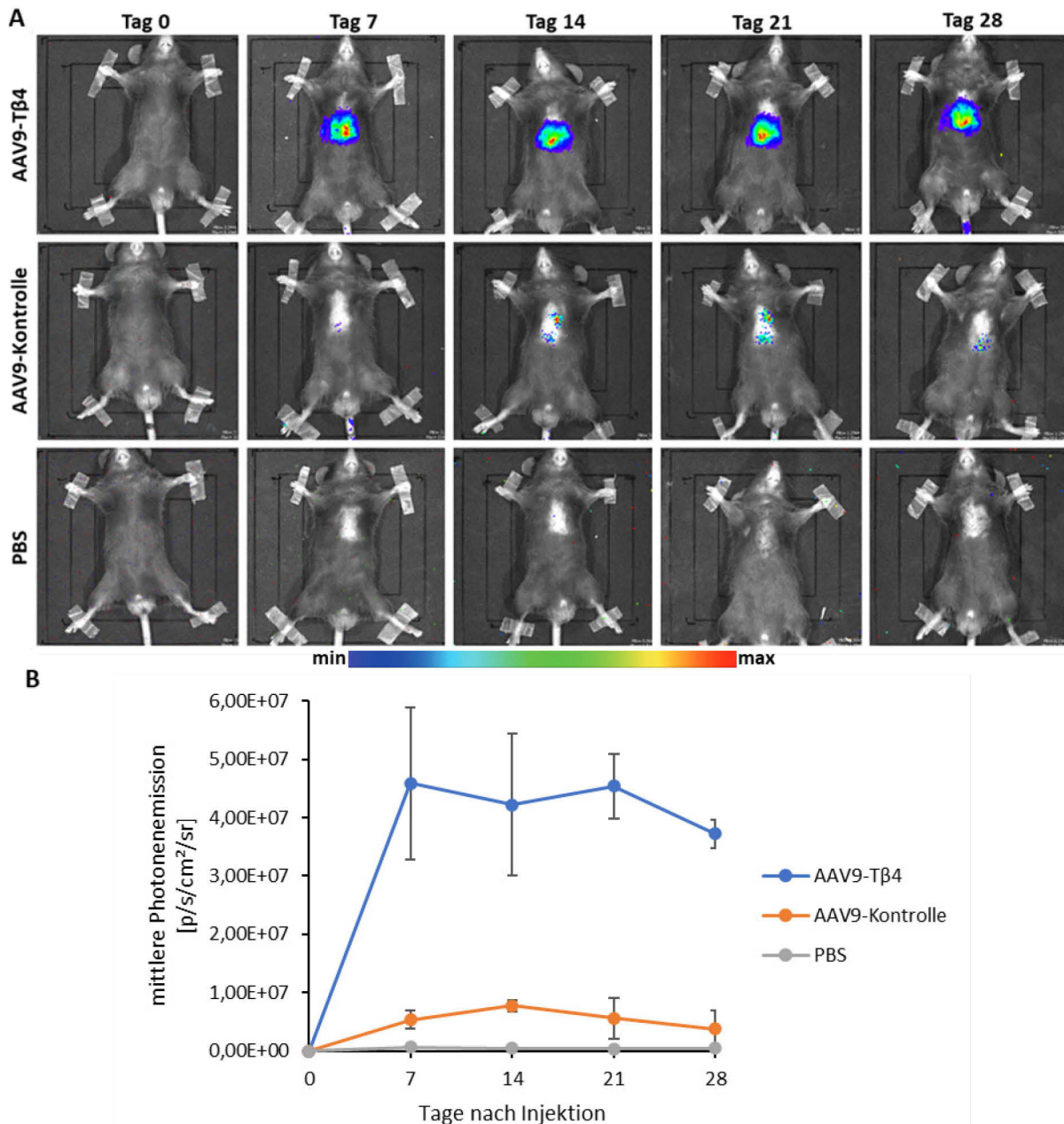


Abbildung 12: Biolumineszenzmessung von C57BL6-Mäusen nach i.v. Injektion des AAV9-Tβ4, AAV9-Kontrolle und PBS. AAV9-Tβ4: Vektor mit einer zusätzlichen Tβ4-Sequenz unter dem cTnT-Promotor für eine kardiomyozytenspezifische Überexpression von Tβ4. AAV9-Kontrolle: Identischer Kontrollvektor ohne zusätzliche Tβ4-Sequenz. Beide AAV9 enthalten eine Luziferasesequenz zur Nachverfolgung. Die Messung erfolgte 8 min nach D-Luciferin-Gabe (150 mg/kg). **A:** Repräsentative Aufnahmen des Biolumineszenzsignals. **B:** Quantifizierte Luziferase-Aktivität (durchschnittliche Photonen-Emission über 1 min) an Tag 0, 7, 14, 21, 28 nach Injektion. AAV9-Tβ4 und AAV9-Kontrolle: n = 3, PBS: n = 2. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

Um das Ausmaß der Überexpression des Tβ4-Proteins auch im Herzen zu analysieren, wurde die Tβ4-Konzentration im Gesamtherzprotein sowie im Blutserum der Tiere 28 Tage nach Injektion von AAV9-Tβ4, AAV9-Kontrolle oder PBS mittels

ELISA gemessen. Die Konzentration an T β 4 stieg nach Behandlung mit AAV9-T β 4 signifikant auf $1697 \pm 559,7$ ng/ml an im Vergleich zur Injektion von PBS ($1206 \pm 179,7$ ng/ml, $p = 0,0286$) und AAV9-Kontrolle ($1195 \pm 349,1$ ng/ml, $p = 0,015$) (Abbildung 13A). Auch die Menge an T β 4 im Gesamtherzprotein stieg nach Behandlung mit AAV9-T β 4 signifikant auf $44,75 \pm 5,916$ μ g an im Vergleich zur T β 4-Konzentration nach Injektion von PBS ($29,98 \pm 9,163$ μ g, $p = 0,0302$) und AAV9-Kontrolle ($35,18 \pm 6,205$ μ g, $p = 0,0372$) (Abbildung 13B). Sowohl im Serumprotein als auch im Herzprotein unterschied sich die T β 4-Konzentration nach Injektion mit PBS und AAV9-Kontrolle nicht signifikant.

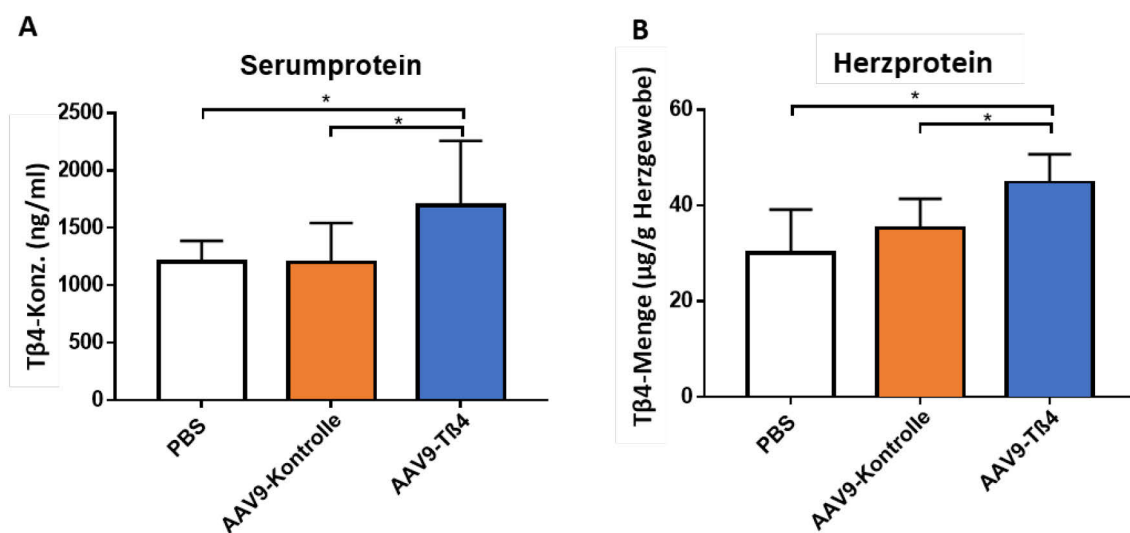


Abbildung 13: Bestimmung der T β 4-Konzentration in Wildtypmäusen 4 Wochen nach i.v.-Injektion von AAV9-T β 4- bzw. AAV9-Kontrolle oder PBS mittels ELISA. A: Serumkonzentration von T β 4 (ng/ml). **B:** T β 4-Menge im Gesamtherzprotein (μ g T β 4 pro g Herzgewebe). AAV9-T β 4 und AAV9-Kontrolle: $n = 3$, PBS: $n = 2$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde über einen ungepaarten t -Test ermittelt, $*p \leq 0,05$.

Insgesamt zeigte die Charakterisierung der AAV9-Vektoren die Herzspezifität der Expression der mittels der Transferplasmide eingebrachten Gensequenzen und im Fall des AAV9-T β 4 auf herzspezifische Überexpression von T β 4. Aufgrund dessen wurden die beiden AAV9-Vektoren für die weiteren *in vivo* Versuche eingesetzt.

4.3.2 Auswirkungen der T β 4-Überexpression auf WT-1-exprimierende Zellen

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die AAV9-T β 4-vermittelte T β 4-Überexpression auf epikardiale WT-1⁺-Zellen und deren mögliche Differenzierung in andere Zelltypen hat, wurden an *Wt1^{CreERT2}Rosa^{TdTomato}*-Herzen 21 Tage nach Infarkt Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen ACTN2 und cTnT (Kardiomyozyten), CD31 (Endothelzellen), CD45 (Immunzellen), α -SMA (glatte Muskulaturzellen), VIM (Fibroblasten) und POSTN (aktivierte Fibroblasten) durchgeführt. Durch die Verwendung der Mauslinie *Wt1^{CreERT2}Rosa^{TdTomato}* konnten WT-1⁺-Zellen über die Expression von TdTomato nachverfolgt werden. Wie die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten, konnte keine Ko-Färbung von TdTomato mit ACTN2, cTnT, VIM, α -SMA, CD31, POSTN und CD45 und damit keine Differenzierung von WT-1⁺-Zellen in Kardiomyozyten, Fibroblasten und glatte Muskulaturzellen festgestellt werden (Abbildung 14A). Dagegen waren Zellen mit einer Ko-Färbung von TdTomato und CD31 sichtbar (Abbildung 14A). Dies kann zum einen auf die Differenzierung von WT-1⁺-EpiSCs in Endothelzellen hindeuten, zum anderen ist aber auch bekannt, dass nach Infarkt WT-1 auch in Endothelzellen exprimiert wird¹⁵³.

Zur Quantifizierung der TdTomato-exprimierende Zellen wurden TdTomato⁺-Zellen im Myokard anhand von Immunfluoreszenzbildern von Herzquerschnitten der jeweils gleichen Ebene der Herzen gezählt. Zur Verstärkung des TdTomato-Signals wurden TdTomato⁺-Zellen mit RFP-Antikörpern gefärbt. Dabei konnten nach AAV9-T β 4-Injektion 450,77 (\pm 176,82) RFP⁺-Zellen und nach AAV9-Kontrolle-Injektion 134 (\pm 83,44) RFP⁺-Zellen gezählt werden (Abbildung 14B). Eine statistische Auswertung war aufgrund der begrenzten Probenanzahl nicht möglich, jedoch war ein Trend zu einer erhöhten Anzahl an TdTomato⁺-Zellen nach AAV9-T β 4-Injektion zu erkennen.

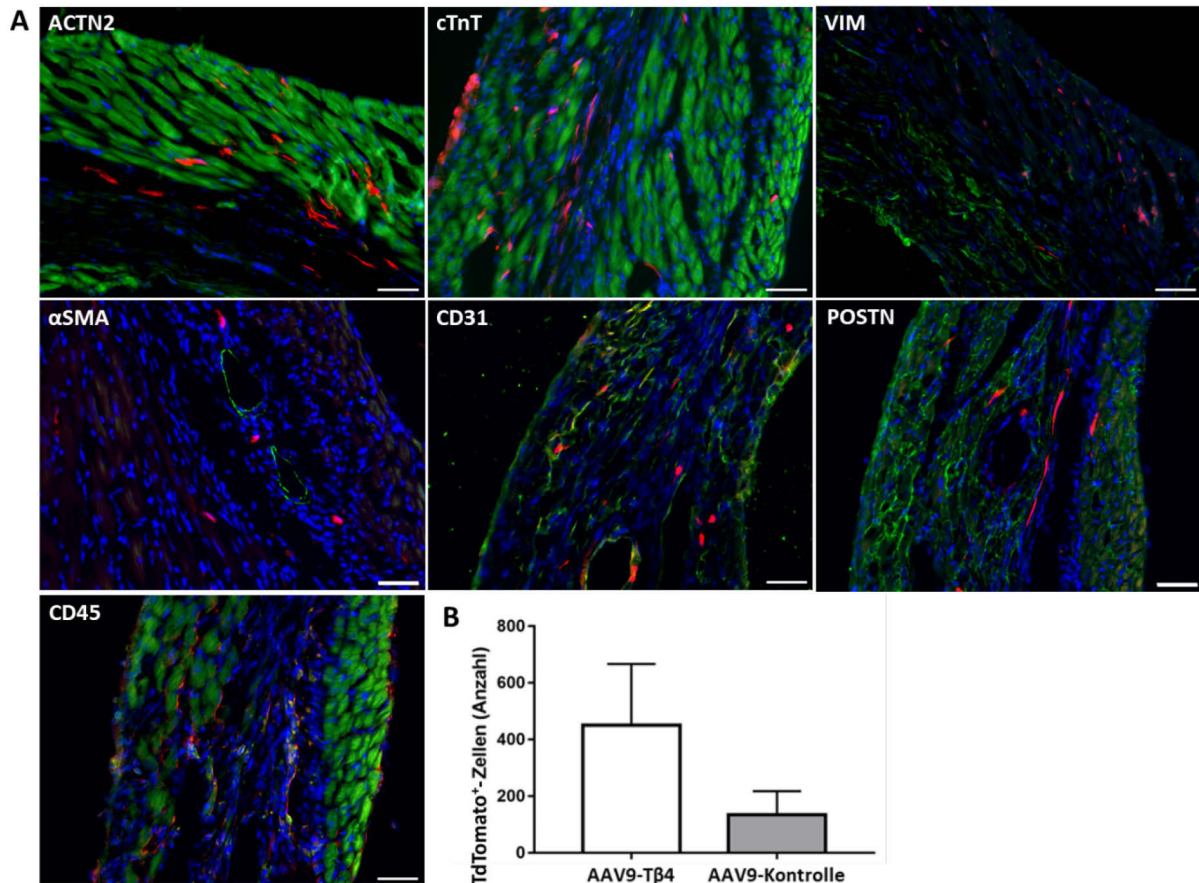


Abbildung 14: Auswirkungen einer Tβ4-Überexpression auf die Differenzierung von EpiSCs nach Infarkt. Histologische Analyse 21 Tage nach Infarkt von $Wt1^{CreERT2}Rosa^{TdTomato}$ -Tieren nach Tβ4-Überexpression mittels AAV9-Tβ4. Die i.v. AAV9-Injektion erfolgte eine Woche vor Infarkt. **A:** Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung (n = 3 Herzen): Rot: RFP (TdTomato), Blau: DAPI (Zellkerne), Grün: ACTN2 (Kardiomyozyten), cTnT (Kardiomyozyten), VIM (Fibroblasten), αSMA (Glatte Muskulaturzellen), CD31 (Endothelzellen), POSTN (aktivierte Fibroblasten), CD45 (Immunzellen). Skalierung: 50 μm. **B:** Anzahl an TdTomato⁺-Zellen im Herzquerschnitt im Myokard nach Injektion von AAV9-Tβ4 (n = 3) im Vergleich zu AAV9-Kontrolle (n = 2). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

4.3.3 Genexpressionsanalyse von EpiSCs bei Tβ4-Überexpression 5 Tage nach Infarkt

Um den Effekt von Tβ4 auf die Infarktheilung und den Einfluss von Tβ4 auf die EpiSCs zu untersuchen, wurde eine scRNAseq-Analyse der EpiSCs durchgeführt. Die Analyse der EpiSCs erfolgte 5 Tage nach Infarkt, um schon frühe Veränderungen in der Genexpression nach Infarkt feststellen zu können. Für die Tβ4-Überexpression wurde Tβ4 kardiomyozytenspezifisch mittels AAV9-Tβ4 überexprimiert. Das AAV9-Tβ4 wurde den Tieren eine Woche vor Induktion des Infarktes injiziert, um schon ab dem Zeitpunkt des Herzinfarktes eine Tβ4-Überexpression zu erreichen. In einer weiteren

scRNAseq-Analyse erfolgte als Kontrollbedingung im Vergleich zur T β 4-Überexpression eine Behandlung mit dem AAV9-Kontrolle, sodass keine T β 4-Überexpression stattfand. Für beide Analysen wurden EpiSCs 5 Tage nach Infarkt aus je drei Herzen isoliert. Die Sequenzierung der Zellisolate auf Einzelzellebene erfolgte mit der 10X Genomics Chromium Plattform. Die Datensätze der beiden Behandlungen mit und ohne T β 4-Überexpression wurden zusammen bioinformatisch analysiert, um Unterschiede feststellen zu können und die Expressionsstärken der Gene vergleichen zu können.

4.3.3.1 Einordnung der Cluster

Insgesamt wurden in der Analyse mit T β 4-Überexpression (AAV9-T β 4) 24.634 EpiSCs und in der Analyse unter Kontrollbedingungen (AAV9-Kontrolle) 10.720 EpiSCs erfasst. In der gemeinsamen Analyse der Zellen beider Bedingungen konnten dabei 17 transkriptionell unterschiedliche Populationen identifiziert werden, die fortlaufend nach ihrer Größe nummeriert wurden (Abbildung 15A). Abbildung 15B stellt die Größe der EpiSC-Cluster des kombinierten Datensatzes in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl (%) dar. In Abbildung 15C sind die relativen Anteile der Zellen von der Analyse mit T β 4-Überexpression bzw. ohne T β 4-Überexpression (Kontrolle) aufgeteilt auf die jeweilige Analyse in den Clustern abgebildet.

Die größte Subpopulation des kombinierten Datensatzes bildete Cluster 0, welches circa 22 % von der Gesamtpopulation ausmachte. Dabei überwog mit fast einem Viertel der relative Anteil der Zellen von der Analyse nach T β 4-Überexpression. In Cluster 1, welches 11,88 % von der Gesamtpopulation ausmachte, fiel dagegen ein deutlich größerer relativer Anteil der Zellen der Analyse unter Kontrollbedingungen. Cluster 2 machte 9,66 % von der Gesamtpopulation aus. Hier war das Verhältnis der relativen Anteile aus beiden Analysen etwa ausgeglichen. Cluster 3 und 4 machten mit circa 7 % gleiche Anteile an der Gesamtpopulation aus. In Cluster 3 überwog jedoch deutlich der relative Anteil an Zellen der Analyse mit T β 4-Überexpression, während in Cluster 4 das Verhältnis ähnlich war. Zu Cluster 5-8 zählten in etwa ähnlich viele Zellen. In den Clustern 4 - 6 überwog jedoch leicht der relative Anteil an Zellen der Analyse mit T β 4-Überexpression. Cluster 9-14 machten unter 5 % und Cluster 15 und 16 unter 1 % der Gesamtpopulation aus. In Cluster 10 überwog dabei deutlich der Anteil an Zellen der Analyse unter Kontrollbedingungen.

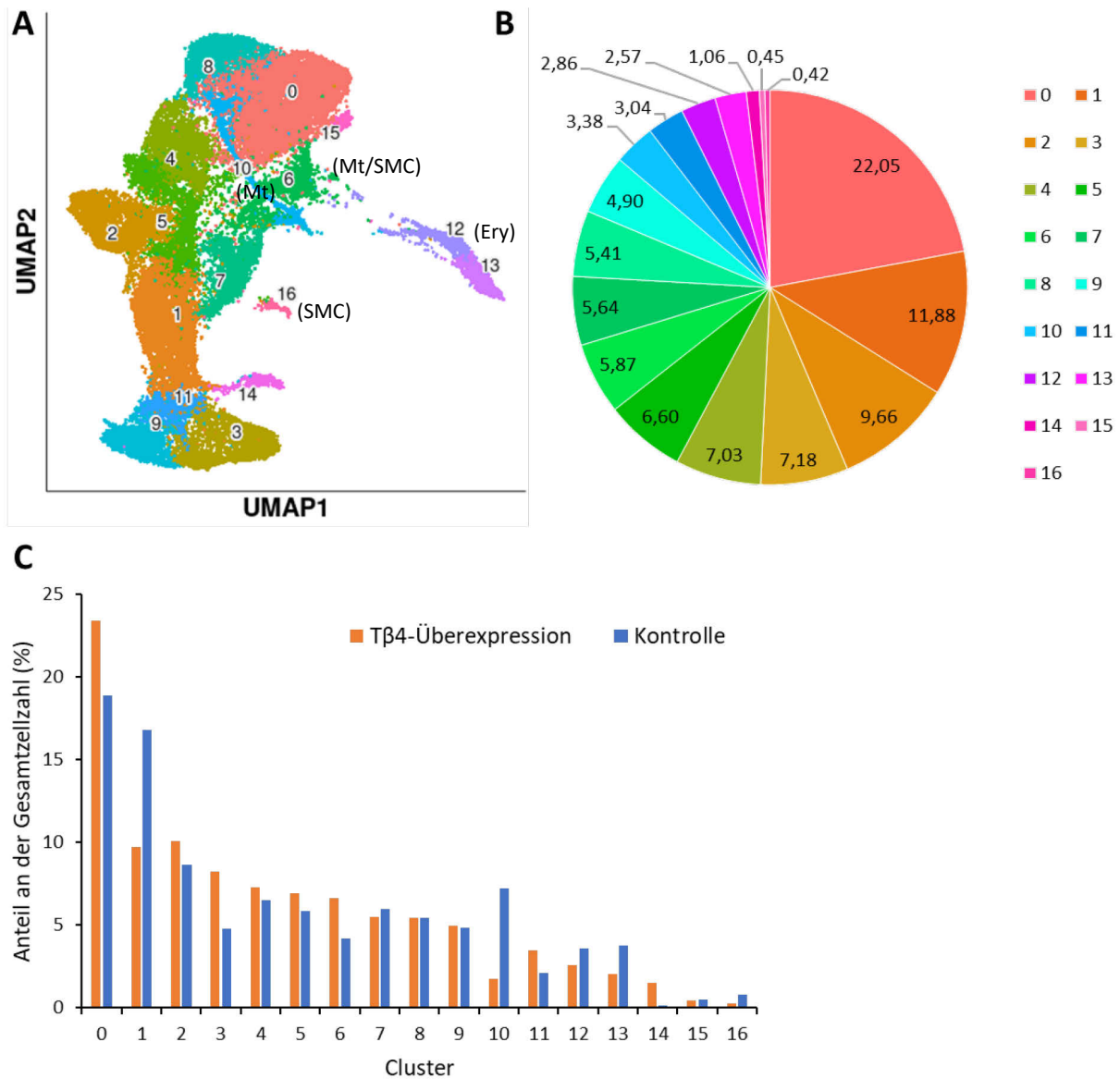


Abbildung 15: Kombinierte Clusteranalyse der EpiSC-Datensätze der scRNAseq 5 Tage nach Infarkt unter Tβ4-Überexpression und Kontrollbedingungen. A: UMAP-Plot der kombinierten EpiSC-Datensätze zur Illustration der identifizierten EpiSC-Cluster. Die Clusternummerierung erfolgte fortlaufend nach Clustergröße. Von der weiteren Analyse ausgeschlossene Cluster: Cluster 6: hoher Anteil an mitochondrialer RNA (Mt) und glatte Muskulaturzellen (SMC), Cluster 10: hoher Anteil an mitochondrialer RNA (Mt), Cluster 12 und 13 (Erythrozyten (Ery)), Cluster 16: glatte Muskulaturzellen (SMC). **B:** Größe der EpiSC-Cluster der kombinierten Datensätze aus der Tβ4-Überexpression und der Kontrollbedingung in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl der kombinierten Datensätze (%). **C:** Relative Anteile der Zellen innerhalb der Cluster an der Gesamtzellzahl des Datensatzes mit Tβ4-Überexpression und unter Kontrollbedingungen 5 nach Infarkt.

4.3.3.2 Charakterisierung der Cluster

Um die Cluster der gemeinsamen Datensatzanalyse der EpiSCs unter Tβ4-Überexpression und Kontrollbedingungen 5 Tage nach Infarkt hinsichtlich ihrer

biologischen Bedeutung zu charakterisieren, wurden die Top 10-Markergene der einzelnen Cluster untersucht. Zudem wurde eine mögliche Einteilung der Cluster in Fibroblasten- und EpiSC-Populationen nach Farbehi *et al.*¹³¹ geprüft. Ebenfalls wurde die Suche nach signifikant angereicherten GO-Annotationen mithilfe der Plattform GOrilla¹³⁰, wie bereits beschrieben, durchgeführt (siehe 4.1.2.2). Eine Übersicht der Top 10-Markergene jedes Clusters und die Top 3 der angereicherten GO-Annotationen, die den signifikant exprimierten Genen der jeweiligen Cluster zugeordnet werden konnten, ist in Abbildung 16A und B dargestellt.

Cluster 0 kennzeichnete die Epikard-spezifischen Transkripte *Saa3* und *Clu* unter den Top 10-Markergenen. Ebenfalls unter den signifikant erhöht exprimierten Transkripten des Clusters war das EpiSC-spezifische Transkript *Wt1* zu finden. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Top 3 Treffer „*movement of cell or subcellular component*“, „*biological regulation*“ und „*lymphocyte chemotaxis*“.

Cluster 1 zeichnete sich durch das aCF-spezifische Markergen *Postn* aus. Die Transkripte *Ptn*, *Ddah1* und *Sfrp2* unter den Top 10 deuten auf eine Ähnlichkeit zu Myofibroblasten¹³¹ hin. Unter den Top 3 der gefundenen angereicherten GO-Annotationen befanden sich die Treffer „*cellular response to radiation*“, „*non-canonical Wnt signaling pathway*“ und „*convergent extension*“.

In Cluster 2 befand sich unter den Top 10-Markergenen das Transkript für den mesenchymalen Marker *Cd44*. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Treffer „*vesicle organization*“, „*mucopolysaccharide metabolic process*“ und „*glycosaminoglycan metabolic process*“.

Cluster 3 zeichnete sich durch die Top 10-Markergene *Gsn*, einem Fibroblasten-assoziierten Gen, sowie *Sparcl1* und *Smoc2*, die beide für Matrixproteine kodieren¹³⁴. Als Top 3 angereicherten GO-Annotationen wurden dazu passend „*extracellular structure organization*“, „*extracellular matrix organization*“ sowie „*positive regulation of protein maturation*“ gefunden.

Cluster 4 kennzeichnete das Transkript *Top2a*, einem Proliferationsmarker, unter den Top 10-Markergenen. Dem Cluster wurden zudem weitere Transkripte zugeordnet, die F-Cyc kennzeichnen, einer proliferierenden Fibroblastenpopulation¹³¹. Dementsprechend befanden sich unter den Top 3 angereicherten Go-Annotationen „*cell cycle*“, „*cell cycle process*“ und „*mitotic cell cycle process*“.

Auch Cluster 5 konnte über die Transkripte *Cenpa*, *Acta2* und *H2afz* unter den Top 10-Markergenen den F-Cyc zugeordnet werden¹³¹. Unter den weiteren signifikant angereicherten Transkripten des Clusters befand sich ebenfalls *Top2a*. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Top 3 Treffer „*cell cycle*“, „*mitotic cell cycle process*“ und „*microtubule cytoskeleton organization*“.

In Cluster 6 befand sich unter den Top 10-Markergenen das mitochondriale Transkript *Cmss1*. Auch waren auch die Transkripte *Gm42418* und *Gm26917*, die mit der Kontamination durch ribosomale RNA assoziiert werden, unter den Top 10-Markergenen zu finden. Zudem waren Transkripte wie *Acta2* und *Tagln* erhöht exprimiert, welche glatte Muskulaturzellen charakterisieren. Dieses Cluster mit nicht-stromalen Zellen unterschiedlicher Herkunft wurde daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

In Cluster 7 befanden sich unter den Top 10-Markergenen die Transkripte *Tcn* und *Col11a1*, die für ECM-Proteine kodieren. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Treffer „*anatomical structure development*“, „*regulation of developmental process*“ und „*extracellular structure organization*“.

Cluster 8 kennzeichneten die Markergene *Msln* und *Krt19*, welche einen epithelialen Charakter des Clusters vermuten ließen. Auch *Wt1* befand sich unter den weiteren signifikant angereicherten Transkripten. Die Top 3 angereicherten GO-Annotationen waren „*iron ion transport*“, „*biological adhesion*“ und „*regulation of cell projection organization*“.

Cluster 9 zeichnete sich durch das Markergen *Gsn* aus. Auch die Markergene *Cfh* und *Apoe* waren unter den Top 10 zu finden, welche F-Trans auszeichnen. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen führte zu den Top 3 Treffer „*regulation of proteolysis*“, „*regulation of protein maturation*“ und „*regulation of protein processing*“.

Cluster 10 wurden überwiegend mitochondriale Transkripte zugeordnet, darunter *mt-Atp6* oder *mt-Co3*. Die Expression von mitochondrialen Genen deutet auf apoptotische oder beschädigte Zellen hin¹⁵⁴. Daher wurde dieses Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Cluster 11 zeichnete sich durch das Transkript *Apoe* unter Top 10-Markergenen und weiteren signifikanten Transkripten aus, die eine Zugehörigkeit der Zellen zu den F-Trans vermuten lassen (*Fgl2*, *Inmt*, *Cfh*). Die Suche nach angereicherten GO-

Annotationen lieferte die Top 3 Treffer „*extracellular structure organization*“, „*extracellular matrix organization*“ und „*regulation of protein maturation*“.

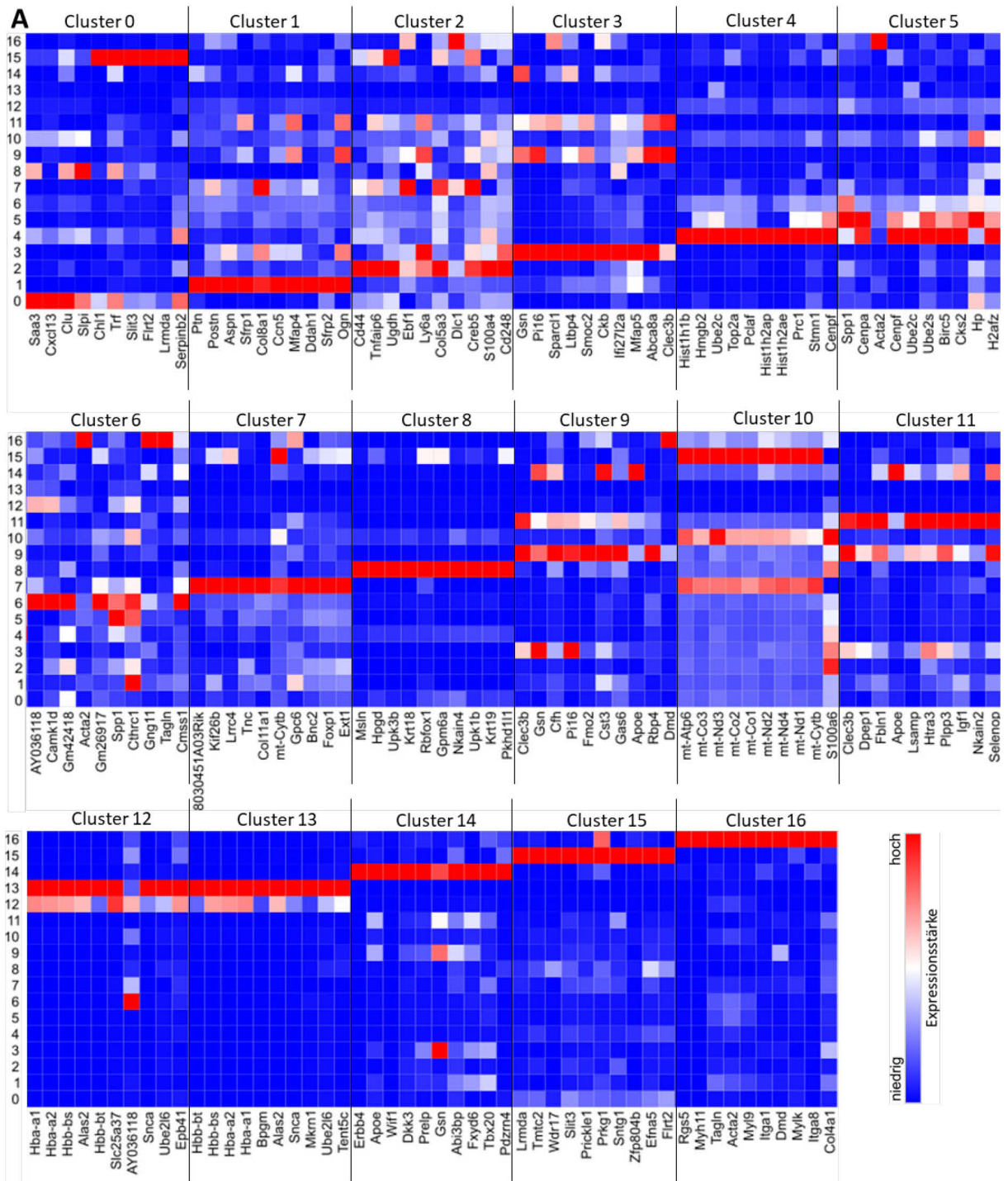
Cluster 12 prägten Erythrozyten-spezifische Markergene unter den Top 10, wie *Hba-a1* oder *Hbb-bs*. Daher wurde dieses nicht-stromale Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Auch Cluster 13 zeichnete sich durch Erythrozyten-spezifische Markergene unter den Top 10 aus, darunter *Hbb-bt* oder *Hbb-bs*. Daher wurde auch dieses Cluster von der weiteren Analyse exkludiert.

Cluster 14 zeichnete sich durch die Markergene *Wif1* und *Dkk3* unter den Top 10 aus, die mit F-WntX assoziiert werden¹³¹. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen führte zu den Top 3 Treffern „*regulation of cell proliferation*“, „*cellular developmental process*“ und „*regulation of multicellular organismal process*“.

In Cluster 15 befand sich unter den Top 10-Markergenen *Slit3*, welches die Fibroblasten-Aktivität und die Synthese von fibrillärem Kollagen reguliert¹⁵⁵. In diesem Cluster war auch *Wt1* signifikant angereichert. Die Top 3 angereicherten GO-Annotationen waren „*cellular developmental process*“, „*growth*“ und „*developmental growth*“.

Cluster 16 prägten Markergene unter den Top 10, die spezifisch für glatte Muskulaturzellen sind, wie *Tagln* oder *Acta2*. Daher wurde dieses nicht-stromale Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



B

EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert	EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert
0	movement of cell or subcellular component	1.58E-1	8	iron ion transport	1,00E+00
	biological regulation	2.04E-1		biological adhesion	1,00E+00
	lymphocyte chemotaxis	1.64E-1		regulation of cell projection organization	1,00E+00
1	cellular response to radiation	3.47E-1	9	regulation of proteolysis	1.52E-3
	non-canonical Wnt signaling pathway	3.34E-1		regulation of protein maturation	9.53E-2
	convergent extension	5.96E-1		regulation of protein processing	6.35E-2
2	vesicle organization	1,00E+00	10	amide biosynthetic process	2.75E-5
	mucopolysaccharide metabolic process	1,00E+00		cellular amide metabolic process	5.1E-5
	glycosaminoglycan metabolic process	8.26E-1		translation	3.92E-5
3	extracellular structure organization	1.64E-3	11	extracellular structure organization	2.51E-4
	extracellular matrix organization	2.81E-3		extracellular matrix organization	4.9E-4
	positive regulation of protein maturation	1,00E+00		regulation of protein maturation	2.62E-3
4	cell cycle	1.3E-20	12	-	-
	cell cycle process	3.34E-18	13	myeloid cell development	1.1E-1
	mitotic cell cycle process	1.23E-16		erythrocyte development	5.48E-2
5	cell cycle	3.34E-9	14	regulation of cell proliferation	6.06E-2
	mitotic cell cycle process	7.7E-7		cellular developmental process	2.5E-1
	microtubule cytoskeleton organization	3.94E-6		regulation of multicellular organismal process	2.02E-1
6	RNA metabolic process	2.42E-3	15	cellular developmental process	1.42E-1
	electron transport chain	7.17E-3		growth	1.51E-1
	RNA processing	4.78E-3		developmental growth	1.01E-1
7	anatomical structure development	3.25E-4	16	muscle system process	2.15E-3
	regulation of developmental process	2.08E-4		positive regulation of calcium ion transport	2.01E-3
	extracellular structure organization	2.89E-4		regulation of ion transport	3.1E-3

Abbildung 16: Clustercharakterisierung der kombinierten EpiSC-Datensätze der scRNAseq-Analysen 5 Tage nach Infarkt unter T β 4-Überexpression und Kontrollbedingungen. A: Heatmap der Top 10 signifikant erhöht exprimierten Gene innerhalb des individuellen EpiSC-Clusters im Vergleich zu den anderen Clustern. **B:** Angereicherte GO-Annotationen (Top 3 nach Signifikanz, ermittelt über den FDR q-Wert) aller Markergene für jedes Cluster. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen erfolgte über die Plattform GOrilla¹³⁰.

Zur vereinfachten Darstellung wurden die Cluster ebenfalls wieder in Gruppen unterteilt. Nachfolgend wurden Cluster 0, 4, 8 und 15, die klassische epikardiale und epitheliale Transkripte exprimierten, als „Gruppe I“ bezeichnet. Die EpiSC-Cluster 5, 2, 7 und 1 wurden als „Gruppe II“ zusammengefasst, da sie unter anderem alle aCF-assoziierte Transkripte exprimieren. EpiSC-Cluster 3, 9, 11 und 14, die auch Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten oder F-Trans exprimieren, wurden als „Gruppe III“ zusammengefasst.

4.3.3.3 Einfluss der T β 4-Überexpression auf die Genexpression von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt

Um den Einfluss der T β 4-Überexpression auf die Genexpression der EpiSCs an Tag 5 nach Infarkt feststellen zu können, wurde das transkriptionelle Profil der EpiSCs nach Behandlung der Tiere mit dem Vektor AAV9-T β 4 (T β 4-Überexpression) und AAV9-Kontrolle (ohne T β 4-Überexpression) verglichen. Cluster, bestehend aus nicht

stromalen Zellen (Mitochondriale und ribosomale Gene, glatte Muskulaturzellen, Cluster 6; Mitochondriale Gene, Cluster 10; Erythrozyten, Cluster 12 und 13; glatte Muskulaturzellen, Cluster 16) wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (siehe Appendix, Tabelle 12). Innerhalb der Cluster konnten Transkripte identifiziert werden, die signifikante Unterschiede der mittleren Genexpressionsstärke im Vergleich der Zellen der beiden Bedingungen nach Infarkt aufzeigten.

Zum Vergleich des funktionellen Profils der EpiSCs nach T β 4-Überexpression und unter Kontrollbedingungen wurde, wie bereits beschrieben, die Genexpression von parakrinen Faktoren, Chemokinen, Fibrose-assoziierten Genen, Kollagen-assoziierten Genen und kardiogenen Faktoren analysiert.

Die Analyse der parakrinen Faktoren zeigte, dass *Angpt1* und *Ang*, welche beide Angiogenese induzieren^{138,139}, unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert waren (Abbildung 17A). Dies war in Cluster 14, in welchem Gene des *Wnt*-Signalwegs signifikant angereichert waren, der Fall. Nach T β 4-Überexpression dagegen waren die Transkripte *Il6* und *Igfbp4* höher exprimiert. Während IL-6 eine fibrogene Wirkung hat¹⁴⁹, verstärkt IGFBP4 die Angiogenese und schützt vor frühem oxidativen Schaden nach Infarkt¹⁵⁶. *Igfbp4* war vor allem in Gruppe I und III-Clustern stärker exprimiert. Die Faktoren der VEGF-Familie waren in Clustern mit Unterschieden in der Genexpression unter Kontrollbedingungen höher exprimiert. Sie stimulieren sowohl Vaskulogenese, Angiogenese als auch Lymphangiogenese⁵³. *Pdgfd*, welches bei Überexpression nach Infarkt Fibrose fördert, war unter Kontrollbedingungen in dem Großteil der Cluster stärker exprimiert (Abbildung 17A).

Die Transkripte der Chemokinen waren größtenteils unter T β 4-Behandlung höher exprimiert (Abbildung 17B). Dazu zählten unter anderem *Cxcl1*, welches anti-fibrotisch¹⁴⁶ und pro-angiogen¹⁴⁷ wirkt, und *Cxcl12*, das unter anderem die Migration von Fibroblasten fördert und Fibroblasten-Vorläufer rekrutiert¹⁴⁹. *Cxcl5* war als einziges der untersuchten Chemokine in den meisten Clustern unter Kontrollbedingungen höher exprimiert (Abbildung 17B). CXCL5 beeinflusst die Neutrophilenrekrutierung und die Makrophagen-Polarisierung nach Infarkt¹⁴⁴.

Die Fibrose-fördernden Transkripte *Eln*, *Cilp* und *Postn* waren unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert, besonders in Gruppe II- und III-Clustern war (Abbildung 17C). Auch *Serpine1*, einem essentiellen Repressor von kardialer Fibrose, welches zudem die Fibrinolyse über eine Inhibierung der Plasminogen-Aktivierung reguliert^{157,158}, war in einem Großteil der Cluster ohne T β 4-Behandlung hoch exprimiert. Die Transkripte der

Mitglieder der SPARC-Familie waren dagegen nach T β 4-Überexpression stärker exprimiert, darunter *Smoc2*, *Sparc* und *Sparcl1*. Auch die Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen *Timp1* und *Timp2* waren nach T β 4-Überexpression in dem Großteil der Cluster erhöht exprimiert, wohingegen *Timp3* unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert war.

Die Untersuchung der Kollagene zeigte, dass diese vor allem in Gruppe I-Clustern nach T β 4-Überexpression erhöht exprimiert waren (Abbildung 17D). *Lum*, *Dcn* und *Bgn*, die mit Kollagen-Crosslinking assoziiert werden, waren ebenfalls nach T β 4-Überexpression, besonders in Gruppe III-Clustern, höher exprimiert. *Vcan*, *Lox* und *waren in Gruppe III-Clustern dagegen unter Kontrollbedingungen, vor allem in Gruppe III-Clustern, stärker exprimiert. Auffällig unter den untersuchten weiteren Kollagen-assoziierten Transkripten war *Acta2*, welches in dem Großteil der Cluster unter T β 4-Behandlung stärker exprimiert war (Abbildung 17D). α -SMA (*Acta2*) fördert die Myofibroblasten-Differenzierung und ECM-Remodellierung¹⁵¹.*

Die untersuchten kardiogenen Faktoren waren in den Clustern mit veränderter Genexpression zwischen den Bedingungen größtenteils unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert (Abbildung 17E). Vor allem *Slit3* war in den meisten Clustern in der Kontrolle stark erhöht. Lediglich *Ctnnb1* und *Hand2* zeigten jeweils in einem Cluster nach T β 4-Überexpression eine höhere Expression der Transkripte.

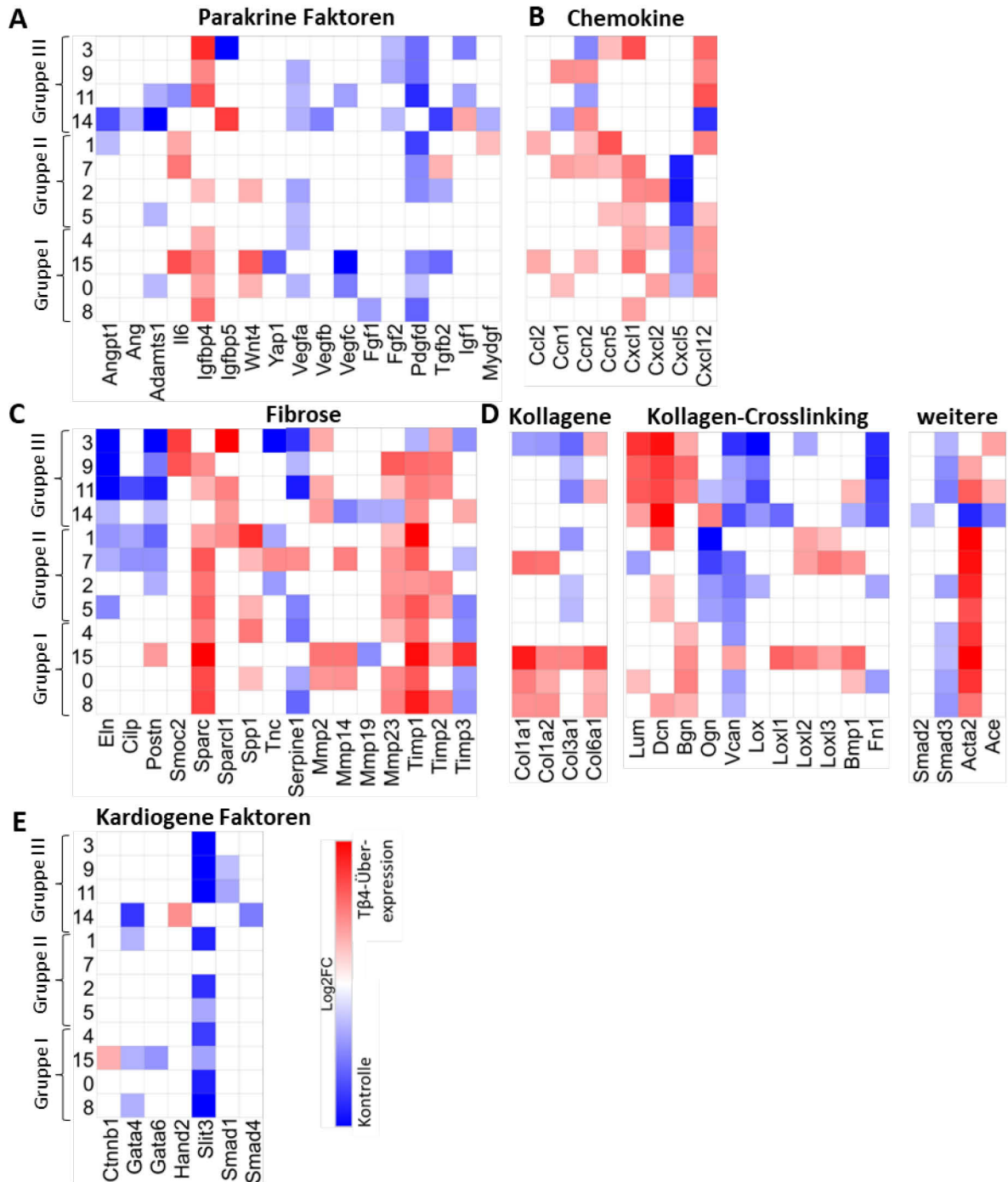


Abbildung 17: Vergleich der Genexpression von EpiSCs nach Tβ₄-Überexpression und unter Kontrollbedingungen 5 Tage nach Infarkt. Für eine Tβ₄-Überexpression wurden Wt1^{CreERT2}-UPRT-Tieren eine Woche vor Induktion des Infarktes das AAV9-Tβ₄ i.v. injiziert. Für die Kontrolle ohne Tβ₄-Überexpression wurden Wt1^{CreERT2}-UPRT-Tieren entsprechend das AAV9-Kontrolle verabreicht (je n = 3). Gezeigt sind Heatmaps der mittleren Log₂ Fold Changes (Log₂FC) von signifikant veränderten Transkripten im Vergleich von Zellen mit und ohne Tβ₄-Überexpression für jedes EpiSC-Cluster. Untersucht wurden ausgewählte Transkripte von **A:** Parakrinen Faktoren, **B:** Chemokinen, **C:** Fibrose-assoziierten Genen, **D:** Kollagenen, Kollagen-Crosslinking und weiteren Kollagen-assoziierten Genen, **E:** Kardiogene Faktoren. Rot: Höhere Genexpression nach Tβ₄-Überexpression, blau: Höhere Genexpression unter Kontrollbedingungen, weiß: Kein signifikanter Unterschied. Gruppe I: EpiSC-Cluster, in denen

klassische epikardiale und epitheliale Transkripte angereichert waren. Gruppe II: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem aCF-assoziierte Transkripte angereichert waren. Gruppe III: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten und F-Trans angereichert waren.

4.3.4 Genexpressionsanalyse von EpiSCs bei T β 4-Überexpression 14 Tage nach Infarkt

Um auch einen späteren Effekt von T β 4 nach Infarkt auf die Infarktheilung und eine Aktivierung der EpiSCs zu untersuchen, wurde die scRNAseq-Analyse der EpiSCs nach T β 4-Überexpression ebenfalls 14 Tage nach Infarkt durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt nach Infarkt konnten in Analysen der Forschungsgruppe Smart *et. al.* eine Reaktivierung von WT-1⁺-EpiSCs nach T β 4-Behandlung der Mäuse mit einhergehender Differenzierung in Kardiomyozyten beschrieben werden⁷⁷.

Für die scRNAseq-Analyse der EpiSCs 14 Tage nach Infarkt wurde, analog zu der Analyse 5 Tage nach Infarkt nach T β 4-Überexpression, T β 4 kardiomyozyten-spezifisch mittels AAV9-T β 4 überexprimiert und eine Kontrolle ohne Überexpression nach Injektion mit AAV9-Kontrolle durchgeführt. Für beide Analysen wurden EpiSCs 14 Tage nach Infarkt aus je drei Herzen isoliert und jeweils gepoolt, um die erforderliche Mindestzellkonzentration zu erreichen. Auch die Sequenzierung der Zellisolate auf Einzelzellebene erfolgte analog zur Analyse 5 Tage nach Infarkt mit der 10X Genomics Chromium Plattform. Die Datensätze der beiden Behandlungen mit und ohne T β 4-Überexpression wurden anschließend zusammen bioinformatisch analysiert, um Unterschiede feststellen zu können und die Expressionsstärken der Gene vergleichen zu können.

4.3.4.1 Einordnung der Cluster

Insgesamt wurden in der Analyse mit T β 4-Überexpression 4198 EpiSCs und in der Analyse unter Kontrollbedingungen 6189 EpiSCs erfasst. In der gemeinsamen Analyse der Zellen beider Zeitpunkte konnten dabei 16 transkriptionell unterschiedliche EpiSC-Populationen identifiziert werden, die fortlaufend nach ihrer Größe nummeriert wurden (Abbildung 18A). Abbildung 18B stellt die Größe der EpiSC-Cluster des kombinierten Datensatzes in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl (%) dar. In Abbildung 18C sind die relativen Anteile der Zellen von der Analyse mit

T β 4-Überexpression bzw. ohne T β 4-Überexpression (Kontrolle), aufgeteilt auf die jeweilige Analyse in den Clustern, abgebildet.

Das größte Cluster des kombinierten Datensatzes bildete Cluster 0, welches über 17 % an der Gesamtpopulation ausmachte. Dabei war der relative Anteil der Zellen der Analyse mit T β 4-Überexpression mehr als doppelt so groß als der relative Anteil der Zellen unter Kontrollbedingungen in Cluster 0. Die nächst-größeren Cluster waren mit einem Gesamtanteil von 15,05 % bzw. 13,7 % Cluster 1 und 2, bei denen der relative Anteil der Zellen aus beiden Analysen ausgeglichen war. Die Cluster 3 und 5 machten einen ähnlichen Anteil an der Gesamtpopulation aus. In Cluster 3 überwog jedoch deutlich der relative Anteil an Zellen der Analyse unter T β 4-Überexpression, während in Cluster 4 und 5 der relative Anteil der Zellen aus der Kontrolle geringfügig größer war. In Cluster 6 fielen 6,69 % der Gesamtzellzahl und die relativen Anteile der Zellen aus beiden Analysen war ausgeglichen. Cluster 7-13 machten unter 5 % und Cluster 14-16 unter 1 % der Gesamtzellzahl aus. Auffällig waren Cluster 7 und 8, bei denen der relative Anteil an Zellen unter Kontrollbedingungen deutlich überwog. Dagegen überwog in Cluster 9-12 der relative Anteil der Zellen der Analyse unter T β 4-Überexpression.

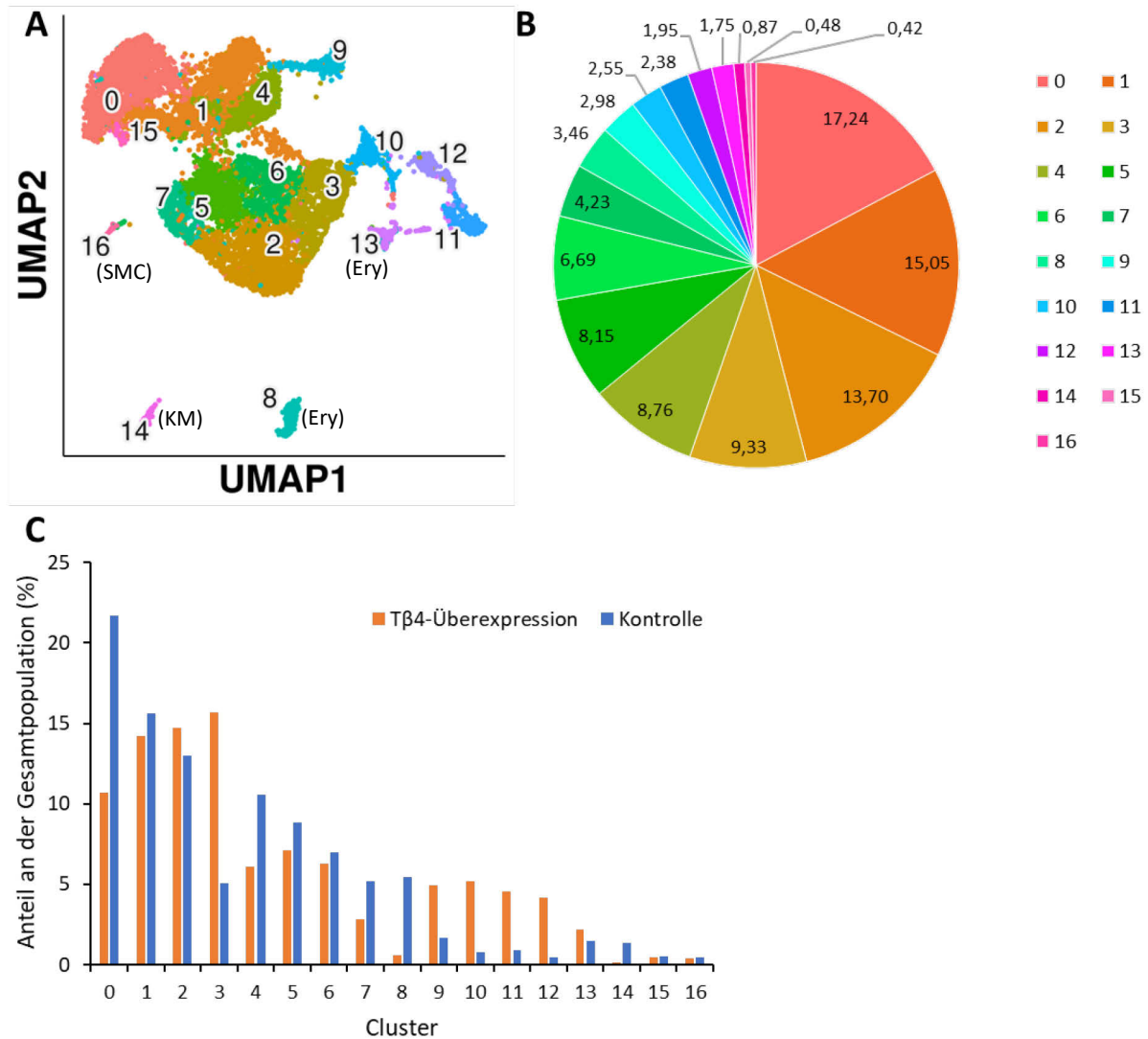


Abbildung 18: Kombinierte Clusteranalyse der EpiSC-Datensätze der scRNAseq 14 Tage nach Infarkt unter Tβ4-Überexpression und Kontrollbedingungen. **A:** UMAP-Plot der kombinierten EpiSC-Datensätze zur Illustration der identifizierten EpiSC-Cluster. Die Clusternummerierung erfolgte fortlaufend. Von der weiteren Analyse ausgeschlossene Cluster: Cluster 14: Kardiomyozyten (KM), Cluster 8 und 13: Erythrozyten (Ery), Cluster 16: glatte Muskulaturzellen (SMC). **B:** Größe der EpiSC-Cluster der kombinierten Datensätze aus der Tβ4-Überexpression und den Kontrollbedingungen in prozentualen Anteilen an der Gesamtzellzahl der kombinierten Datensätze (%). **C:** Relative Anteile der Zellen innerhalb der Cluster an der Gesamtzellzahl des Datensatzes mit Tβ4-Überexpression und unter Kontrollbedingungen 14 Tage nach Infarkt.

4.3.4.2 Charakterisierung der Cluster

Um die Cluster der gemeinsamen Datensatzanalyse der EpiSCs unter Tβ4-Überexpression und Kontrollbedingungen 14 Tage nach Infarkt hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung zu charakterisieren, wurden wieder die Top 10-Markergene

der einzelnen Cluster untersucht. Auch in dieser Analyse wurde eine mögliche Einteilung der Cluster in Fibroblasten- und EpiSC-Populationen nach Farbehi *et al.*¹³¹ geprüft. Ebenfalls wurde die Suche nach signifikant angereicherten GO-Annotationen mithilfe der Plattform GOrilla¹³⁰ durchgeführt. Eine Übersicht der Top 10 Markergene jedes Clusters und die Top 3 der angereicherten GO-Annotationen, die den signifikant exprimierten Genen der jeweiligen Cluster zugeordnet werden konnte, ist in Abbildung 19A und B dargestellt.

Cluster 0 zeichnete sich durch Markergene unter den Top 10 aus, die für Kollagene kodieren (wie *Col8a1*, *Col4a1*). Auch *Sparcl1* befand sich unter den Top 10 erhöht exprimierten Transkripten, das als Mitglied der (SPARC)-Familie für Matrixproteine kodiert¹³⁴. Bei der Suche nach angereicherten GO-Annotationen konnten die Top 3 Treffer „*extracellular matrix organization*“, „*extracellular structure organization*“ und „*regulation of multicellular organismal development*“ identifiziert werden.

In Cluster 1 befanden sich unter den Top 10-Markergenen *Inmt* und *Apoe* sowie *Cfh* und *Fgl2* unter den weiteren signifikant exprimierten Genen, was auf eine Zuordnung zu den F-Trans hindeuten könnte. Für dieses Cluster konnte nur die angereicherte GO-Annotation „*anatomical structure formation involved in morphogenesis*“ gefunden werden.

Cluster 2 zeichnete sich durch die Top 10-Markergene *Pi16* und *Cd248* aus, was auf eine Zuordnung zu F-SH hindeutet. Für die signifikant angereicherten Transkripte des Clusters konnten keine angereicherte GO-Annotationen gefunden werden.

In Cluster 3 zählten das Epikard-spezifische Gen *Clu* sowie das ECM-kodierende Gen *Col1a1* zu den Top 10-Markergenen. Zudem war das Gen *Wt1* erhöht exprimierten. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen ergab die Treffer „*regulation of cell growth*“, „*regulation of growth*“ und „*anatomical structure morphogenesis*“.

Cluster 4 kennzeichnete die Top 10-Markergene *Fgl2*, *Apoe* und *Cfh*, die sich den F-Trans zuordnen ließen. Die Top 3 angereicherten GO-Annotationen waren „*tube morphogenesis*“, „*regulation of actin filament-based process*“ und „*negative regulation of lipid localization*“.

Cluster 5 war geprägt von Top 10-Markergenen wie *Rpl30*, *Rpl37* oder *Rps21*, die für ribosomale Proteine kodieren. Passend dazu ergab die Suche nach angereicherten GO-Annotationen den Treffer „*translation*“. Zudem zählten zu den Top 3

angereicherten GO-Annotationen die Treffer „*cellular amide metabolic process*“ und „*macromolecule biosynthetic process*“.

Cluster 6 zeichnete sich durch das Markergen *Cxcl12* unter den Top 10 aus, welches für das Chemokin SDF-1 kodiert, das eine kritische Rolle in der kardiovaskulären Entwicklung und Angiogenese einnimmt¹⁵⁹. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen führte zu den Top 3 Treffern „*positive regulation of protein kinase B signalling*“, „*regulation of protein kinase B signalling*“ und „*regulation of T cell migration*“.

In Cluster 7 befanden sich unter den Top 10-Markergenen das Chemokin *Ccn2* sowie *Cyt11*, dem ebenfalls chemotaktische Eigenschaften zugesprochen werden¹⁶⁰. Die signifikante Expression von *Cyt11* sowie *Dkk3* deutete auf Charakteristika der F-WntX hin. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Top 3 Treffer „*response to UV-B*“, „*cellular response to UV*“ und „*cellular response to UV-B*“.

Cluster 8 prägten Erythrozyten-spezifische Markergene unter den Top 10, wie *Hbb-bs* oder *Hba-a1*. Daher wurde dieses nicht-stromale Cluster von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Cluster 9 zeichnete sich durch die Markergene *Cthrc1*, *Sfrp2* und *Ptn* unter den Top 10 aus, welche auch typischerweise von Myofibroblasten exprimiert werden¹³¹. Auch das aCF-spezifische Gen *Postn* befand sich unter den weiteren signifikant exprimierten Transkripten. Den Markergenen des Clusters konnten die angereicherten GO-Annotationen „*extracellular matrix organization*“, „*extracellular structure organization*“ und „*ossification involved in bone remodelling*“ zugeordnet werden.

In Cluster 10 befanden sich unter den Top 10 Markergenen *Postn*, Transkripte für Kollagenketten und *Tnc*, die für ECM-Proteine kodieren. *Wt1* zählte ebenfalls zu den signifikant exprimierten Genen des Clusters. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte entsprechend die Treffer „*collagen fibril organization*“, „*cell adhesion*“ und „*biological adhesion*“.

Cluster 11 zeichnete sich durch die Markergene *Msln*, *Krt19* und *Dmkn* aus, welche einen epithelialen Charakter des Clusters vermuten ließen. In dem Cluster waren ebenfalls Epikard-spezifische Gene wie *Wt1*, *Clu* und *Saa3* erhöht exprimierten. Zu den Top 3 angereicherten GO-Annotationen zählten „*hormone secretion*“, „*regulation of multicellular organismal process*“ und „*regulation of hormone levels*“.

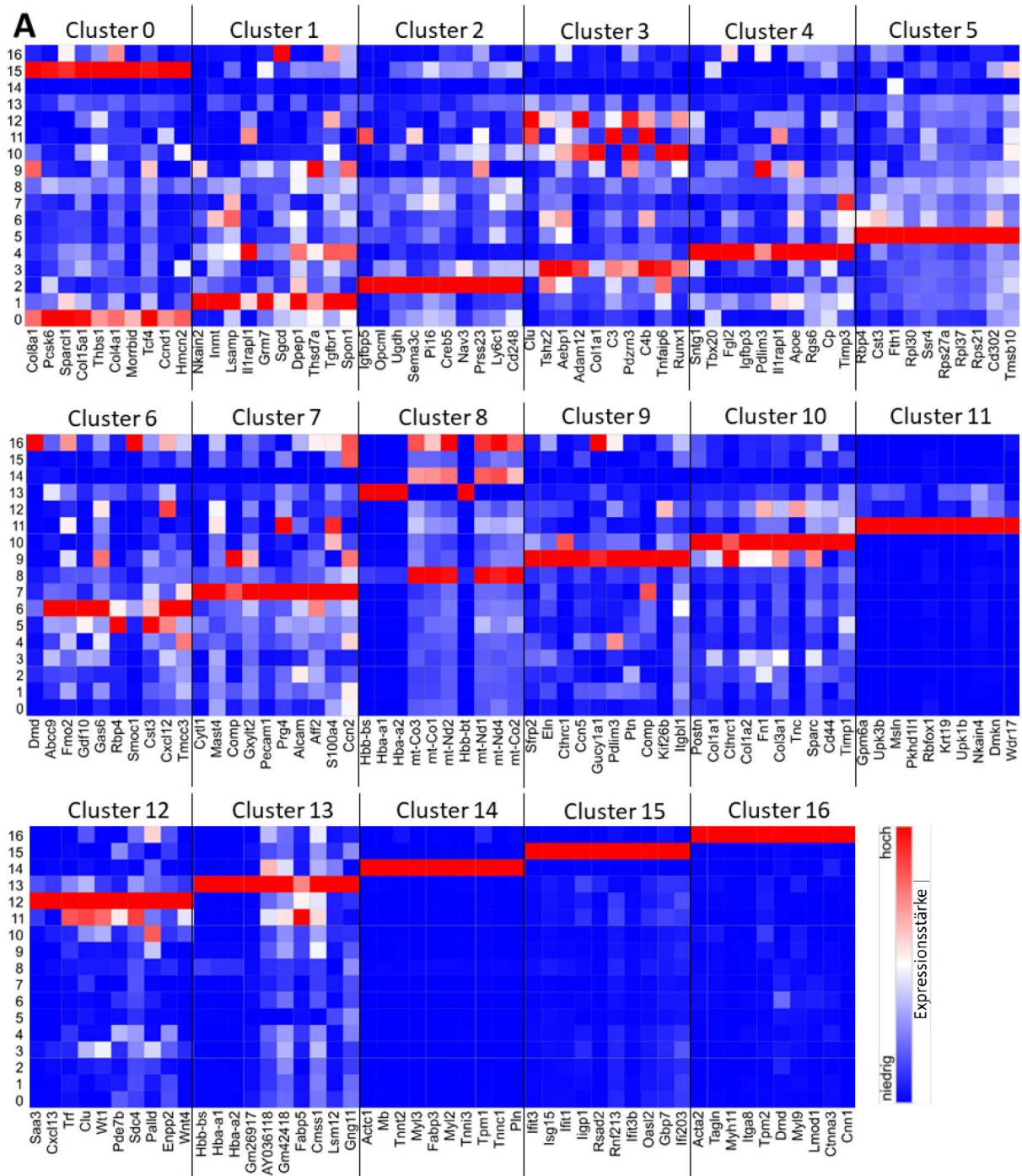
In Cluster 12 befanden sich unter den Top 10-Markergenen die Epikard-spezifischen Gene *Saa3*, *Clu* und *Wt1*. Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen führte zu den Treffern „*cell development*“, „*developmental process*“ und „*chemotaxis*“.

Cluster 13 zeichnete sich durch Erythrozyten-spezifische Gene, wie *Hbb-bs*, *Hba-a1* oder *Hba-a2*, aus und wurde daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

In Cluster 14 waren vorwiegend Kardiomyozyten-spezifische Gene erhöht exprimierten, sodass auch dieses Cluster von der weiteren Analyse exkludiert wurde. Hierzu zählten *Actc1*, *Mb* oder *Tnnt2*.

Cluster 15 zeichneten die Markergene *Ifit3*, *Ifit1* und *Ifit3b* unter den Top 10 aus, die mit der zellulären Antwort auf Interferon assoziiert werden (F-IFNS, *fibroblast - interferon stimulated*¹³¹). Die Suche nach angereicherten GO-Annotationen lieferte die Treffer „*response to other organism*“, „*response to external biotic stimulus*“ und „*response to biotic stimulus*“.

Cluster 16 kennzeichneten Markergene, die mit glatten Muskulaturzellen assoziiert werden, darunter *Acta2*, *Tagln* und *Myh11*. Daher wurde dieses Cluster aus nicht-stromalen Zellen von der weiteren Analyse ausgeschlossen.



B

EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert	EpiSC Cluster	GO Annotation (Top 3)	FDR q-Wert
0	extracellular matrix organization	2.42E-3	9	extracellular matrix organization	5.98E-1
	extracellular structure organization	3.13E-3		extracellular structure organization	5.65E-1
	regulation of multicellular organismal development	5.25E-2		ossification involved in bone remodeling	3.85E-1
1	anatomical structure formation involved in morphogenesis	1,00E+00	10	collagen fibril organization	2.57E-2
	-	-		cell adhesion	2.04E-2
2	regulation of cell growth	3.6E-2	11	biological adhesion	2.28E-2
	regulation of growth	2.66E-2		hormone secretion	7.03E-2
	anatomical structure morphogenesis	1.85E-2		regulation of multicellular organismal process	5.81E-2
3	tube morphogenesis	5.51E-1	12	regulation of hormone levels	4.47E-2
	regulation of actin filament-based process	4.93E-1		cell development	1.67E-2
	negative regulation of lipid localization	1,00E+00		developmental process	5.09E-2
4	cellular amide metabolic process	2.98E-1	13	chemotaxis	7.03E-2
	translation	1.76E-1		cell development	1.93E-1
	macromolecule biosynthetic process	1.58E-1		response to other organism	1.12E-1
5	positive regulation of protein kinase B signaling	4.33E-1	14	erythrocyte development	8.64E-2
	regulation of protein kinase B signaling	7.1E-1		generation of precursor metabolites and energy	5.72E-11
	regulation of T cell migration	6.26E-1		cardiac muscle contraction	2.22E-9
6	response to UV-B	1,00E+00	15	striated muscle contraction	8.89E-9
	cellular response to UV	1,00E+00		response to other organism	8.72E-13
	cellular response to UV-B	1,00E+00		response to external biotic stimulus	8.14E-13
7	in utero embryonic development	6.1E-1	16	response to biotic stimulus	5.43E-13
	chordate embryonic development	3.05E-1		muscle system process	1.35E-2
	myeloid cell development	2.03E-1		muscle contraction	1,00E-02
				system process	1.86E-2

Abbildung 19: Clustercharakterisierung der kombinierten EpiSC-Datensätze der scRNAseq-Analysen 14 Tage nach Infarkt unter T β 4-Überexpression und Kontrollbedingungen. A: Heatmap der Top 10 signifikant erhöht exprimierten Markergene innerhalb des individuellen EpiSC-Clusters im Vergleich zu den anderen Clustern. **B:** Angereicherte GO-Annotationen (Top 3 nach Signifikanz, ermittelt über den FDR q-Wert) aller Markergene für jedes Cluster. Die Suche nach GO-Annotationen erfolgte über die Plattform GOrilla¹³⁰.

Zur vereinfachten Darstellung wurden die Cluster ebenfalls wieder in Gruppen unterteilt. Nachfolgend wurden Cluster 11, 12 und 3, die klassische epikardiale und epitheliale Transkripte exprimierten, als „Gruppe I“ bezeichnet. Die EpiSC-Cluster 9, 10 und 15 wurden als „Gruppe II“ zusammengefasst, da sie unter anderem alle aCF-assoziierte Transkripte exprimieren. EpiSC-Cluster 0-7, die auch Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten oder F-Trans exprimieren, wurden als „Gruppe III“ zusammengefasst.

4.3.4.3 Einfluss der T β 4-Überexpression auf die Genexpression von EpiSCs 14 Tage nach Infarkt

Um den Einfluss der T β 4-Überexpression auf die Genexpression der EpiSCs an Tag 14 nach Infarkt feststellen zu können, wurde das transkriptionelle Profil der EpiSCs nach Behandlung der Tiere mit den Vektoren AAV9-T β 4 (T β 4-Überexpression) und AAV9-Kontrolle (ohne T β 4-Überexpression) verglichen. Cluster, bestehend aus nicht-stromalen Zellen (Erythrozyten, Cluster 8 und 13; Kardiomyozyten, Cluster 14, und

glatte Muskulaturzellen, Cluster 16) wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen (siehe Appendix, Tabelle 10). Innerhalb der Cluster konnten Transkripte identifiziert werden, die signifikante Unterschiede der mittleren Genexpressionsstärke im Vergleich der Zellen aus den beiden Bedingungen nach Infarkt aufzeigten.

Wie bei der Analyse an Tag 5 nach Infarkt wurden zu beiden Bedingungen die Genexpression von parakrinen Faktoren, Chemokinen, Fibrose-assoziierten Genen, Kollagen-assoziierten Genen und kardiogenen Faktoren analysiert.

Die Untersuchung der parakrinen Faktoren zeigte, dass vor allem die Transkripte von *Adamts1* und *Pdgfd* ohne T β 4-Überexpression, also nach Behandlung mit AAV9-Kontrolle, stärker exprimiert waren (Abbildung 20A). Die Expression von ADAMTS1 wird durch Hypoxie, vor allem in der frühen Genantwort, induziert¹⁶¹. PDGFD wird während der Herzheilung und der Gewebsremodellierung induziert, eine Überexpression ist jedoch mit Fibrose assoziiert¹⁶². Weitere Transkripte für parakrine Faktoren waren vorwiegend nach T β 4-Überexpression höher exprimiert, darunter auch *Igfbp4*, welches die durch VEGF-induzierte Angiogenese verstärkt und vor frühem oxidativen Zellschaden schützt¹⁵⁶. *Nrg1* war in Gruppe I und II nach T β 4-Stimulation stärker exprimiert (Abbildung 20A). Durch die Anregung von Kardiomyozyten-Proliferation, Angiogenese und ECM-Remodellierung spielt es eine wichtige Rolle in der Heilung nach Infarkt¹⁴¹. Des Weiteren waren die Transkripte *Vegfd*, *Tgfb2* und *Igf1* nach T β 4-Stimulation stärker exprimiert, die alle einen positiven Effekt auf die Herzheilung haben: VEGFD fördert die Angiogenese und induziert eine antioxidative Antwort nach Infarkt⁵³. TGFB2 fördert den Erhalt der extrazellulären Matrix und unterdrückt die Expression von Chemokinen (vor allem CCL2) und Zytokinen¹⁴³. IGF-1 hingegen hat atheroprotektive, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften¹⁶³.

Von den Chemokinen wurden die Transkripte von *Ccn5* und *Cxcl1* in vielen Clustern bei T β 4-Überexpression hoch exprimiert. Auch *Ccn1* und *Cxcl12* waren in den Clustern mit veränderter Genexpression hauptsächlich bei T β 4-Überexpression hoch exprimiert (Abbildung 20B). *Ccn2* dagegen war in dem Großteil der Cluster unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert.

Die Fibrose-assoziierten Transkripte waren vor allem bei T β 4-Überexpression höher exprimiert (Abbildung 20C). Deutlich höher exprimiert waren dabei unter anderem die ECM-kodierenden Transkripte von *Postn*, *Smoc2* und *Sparc*. Das neben *Smoc2* und *Sparc* ebenfalls zur SPARC-Familie gehörende *Sparcl1* war dagegen in der Kontrolle

stärker exprimiert. Auch *Mmp2*, *Mmp14* und *Mmp23* waren bei T β 4-Überexpression höher exprimiert. Die Matrix-Metalloproteinasen degradieren die extrazelluläre Matrix und werden nach Schädigung des Myokards überexprimiert¹⁶⁴. Die Transkripte der Matrix-Metalloproteinase-Inhibitoren, *Timp1* und *Timp2*, waren ebenfalls bei T β 4-Überexpression höher exprimiert. Das Transkript von *Timp3* hingegen war unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert.

Die Analyse der Kollagene zeigte, dass alle untersuchten Transkripte (*Col1a1*, *Col1a2*, *Col3a1*, *Col6a1*) bei T β 4-Überexpression höher exprimiert waren (Abbildung 20D). Ihre Sekretion ist maßgeblich für die Narbenbildung nach Infarkt aber auch für kardiale Fibrose verantwortlich¹⁴⁹. Ein Großteil der untersuchten Transkripte, die mit Kollagen-Crosslinking assoziiert werden, waren bei T β 4-Überexpression höher exprimiert, darunter *Lum*, *Bgn* oder *Lox1*. Das Transkript von *Vcan* dagegen war deutlich stärker unter Kontrollbedingungen exprimiert. VCAN interagiert mit Hyaluronsäure und seinem Rezeptor und fördert dadurch die Migration von Fibroblasten und Immunzellen¹⁶⁵.

Die kardiogenen Faktoren *Gata4* und *Gata6* waren unter T β 4-Überexpression höher exprimiert (Abbildung 20E). Ebenso waren *Id3* und Gene der *Hox*-Familie unter T β 4-Behandlung höher exprimiert. Die HOX-Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Differenzierung von kardialen Vorläuferzellen in der Herzentwicklung¹⁶⁶. Die Transkripte *Robo1*, *Mef2a* und *Mef2c* waren dagegen unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert.

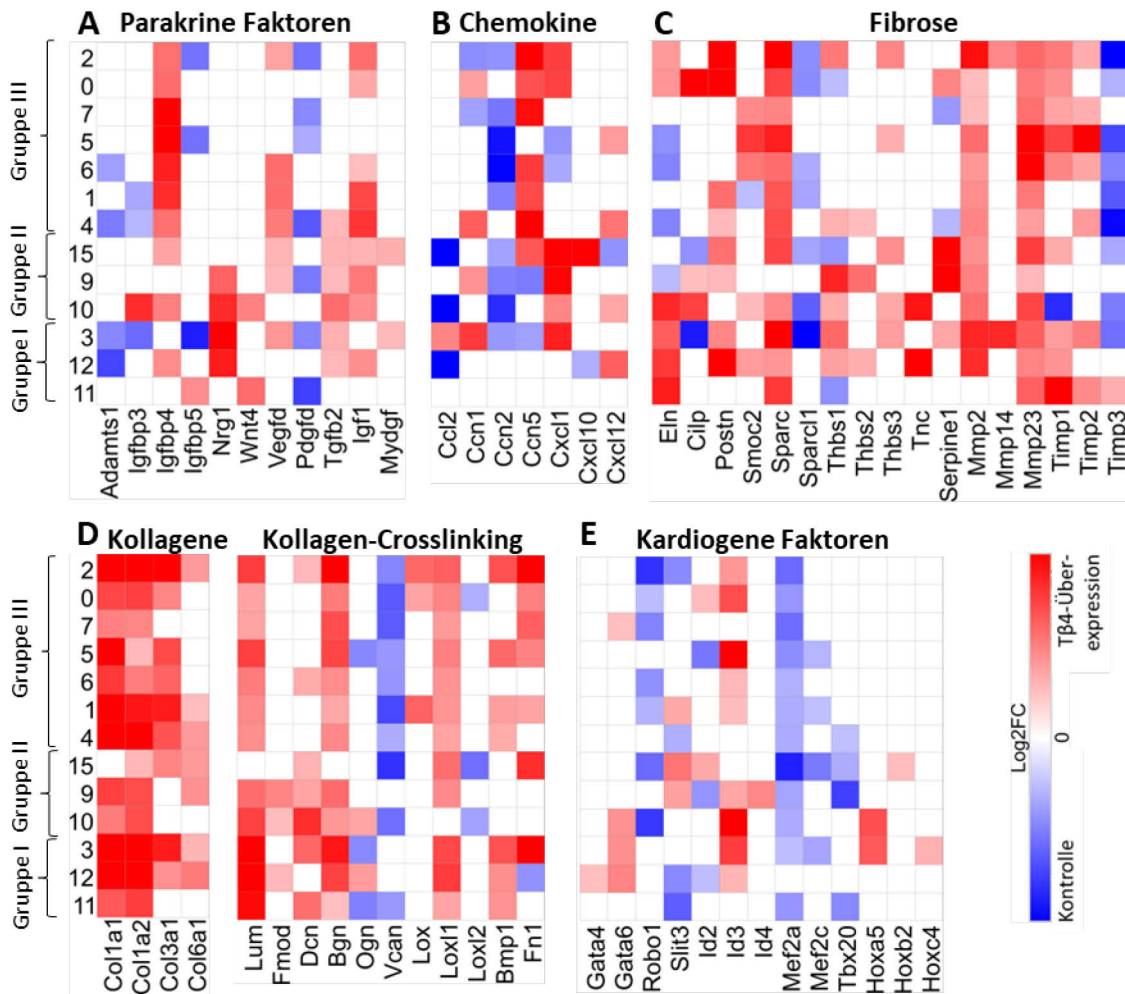


Abbildung 20: Vergleich der Genexpression von EpiSCs nach Tβ4-Überexpression und unter Kontrollbedingungen 14 Tage nach Infarkt. Für eine Tβ4-Überexpression wurden Wt1^{CreERT2}-UPRT-Tieren eine Woche vor Induktion des Infarktes das AAV9-Tβ4 i.v. injiziert. Für die Kontrolle ohne Tβ4-Überexpression wurden Wt1^{CreERT2}-UPRT-Tieren entsprechend das AAV9-Kontrolle verabreicht (je n = 3). Gezeigt sind Heatmaps der mittleren Log2 Fold Changes (Log2FC) von signifikant veränderten Transkripten im Vergleich der Zellen mit und ohne Tβ4-Überexpression für jedes EpiSC-Cluster. Untersucht wurden ausgewählte Transkripte von **A:** Parakrinen Faktoren, **B:** Chemokinen, **C:** Fibrose-assoziierten Genen, **D:** Kollagenen und Kollagen-Crosslinking-assoziierten Genen, **E:** Kardiogene Faktoren. Rot: Höhere Genexpression nach Tβ4-Überexpression, blau: Höhere Genexpression unter Kontrollbedingungen, weiß: Kein signifikanter Unterschied. Gruppe I: EpiSC-Cluster, in denen klassische epikardiale und epitheliale Transkripte angereichert waren. Gruppe II: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem aCF-assoziierte Transkripte angereichert waren. Gruppe III: EpiSC-Cluster, in denen unter anderem Transkripte von nicht-aktivierten Fibroblasten und F-Trans angereichert waren.

5 Diskussion

Der Myokardinfarkt ist die noch immer die häufigste Todesursache weltweit⁴. Ein vielversprechendes Ziel von Therapieansätzen stellt dabei die EpiSC-Zellpopulation dar. Auch wenn die regenerative Fähigkeit von EpiSCs im adulten Herzen, im Gegensatz zu EpiSCs in der Herzentwicklung, begrenzt ist, können sie sich dennoch nach Aktivierung in andere Herzzelltypen differenzieren⁵⁶. Die epikardiale Zellantwort auf einen Myokardinfarkt, darunter die Entstehung von EpiSCs durch EMT⁷⁰, die Fähigkeit der EpiSCs zur Differenzierung in andere Zelltypen⁵⁶ und die Sekretion parakriner Faktoren⁷⁸, könnten für Therapieansätzen genutzt werden. Über die Rolle des Epikards in der zellulären Antwort auf einen Herzinfarkt ist bis heute noch immer wenig bekannt⁷⁸. Ein besseres Verständnis der zellulären Antwort auf einen Herzinfarkt ist daher grundlegend in der Entwicklung neuartiger Therapieansätze für die Herzheilung. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Rolle der EpiSCs in der Herzheilung untersucht. Da S1P und T β 4 vielversprechende Faktoren in der Herzheilung darstellen, wurde zudem der Einfluss von S1P und T β 4 auf EpiSCs untersucht. Beide Faktoren haben einen positiven Effekt in der Herzheilung nach Infarkt, jedoch wurde die zelluläre Funktion der EpiSCs dabei bisher noch nicht tiefergehend untersucht.

5.1 Heterogenität des Epikards

Während die Heterogenität von Fibroblasten schon auf Genexpressionsebene analysiert wurde^{89,131,167,168}, wurden epikardiale Zellen in vorangegangenen scRNAseq-Analysen des infarzierten Herzens als eine einzige, untergeordnete Zellpopulation dargestellt¹³¹. Bollini *et al.* beschrieben bereits einen heterogenen molekularen Phänotyp reaktiver EpiSCs⁸⁸. Dabei berufen sie sich jedoch nur auf die Expression ausgewählter Vorläuferzell- und mesenchymalen Stammzellmarkern. Anhand der detaillierten Analyse des Genexpressionsprofils der EpiSCs 5 Tage nach Infarkt konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals das Ausmaß der epikardialen Heterogenität nach Infarkt aufzeigen⁸⁹.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die Lokalisation der EpiSC-Populationen innerhalb des Epikards beschrieben und die funktionellen Veränderungen des Epikards auch zu späten Zeitpunkten nach Infarkt untersucht.

5.1.1 Zusammenhang zwischen Lokalisation und Zellcharakterisierung

Basierend auf den Ergebnissen der scRNAseq 5 Tage nach Infarkt wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die 11 EpiSC-Cluster, die in der Analyse gefunden wurden, nicht nur hinsichtlich ihres transkriptionellen Profils, sondern auch in ihrer Lokalisation innerhalb des Epikards unterscheiden. Mithilfe der RNA-*in situ*-Hybridisierung von zuvor ausgewählten Cluster-Markergenen konnte die Lokalisation der RNA-Transkripte visualisiert werden. Die RNA-*in situ*-Hybridisierung zeigte, dass die Cluster-Markergene der identifizierten Cluster an unterschiedlicher Stelle im Epikard exprimiert wurden (Abbildung 4). Markergene für Cluster, die klassische EpiSC-Gene exprimierten, waren in den äußeren Zellen des Epikards zu finden und nahmen in Richtung inneres Epikard ab. Dagegen konnten Cluster-Markergene der Cluster, in denen auch Fibroblasten-assoziierte Gene exprimiert wurden, in Zellen identifiziert werden, die sich näher an der Grenze zum Myokard befanden (Abbildung 21). Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Fibroblasten-Phänotyp der EpiSCs zunimmt, je näher sich die Zellen am Myokard befinden (Abbildung 21). Denkbar wäre, dass die Fibroblasten-ähnlichen Populationen aus dem aktivierten Epikard stammen und sich bereits in CFs/aCFs differenziert haben. Die Differenzierung von EpiSCs in CFs/aCFs wurde von Zhou *et al.* bereits eine Woche nach Infarkt beschrieben⁷⁸. Ein weiteres Szenario wäre, dass die markierten Fibroblasten-ähnlichen Zellen im Epikard aus dem geschädigten Myokardium dorthin migriert sind. Dass die Cluster-Markergene teilweise zusätzlich auch von Zellen im Myokard exprimiert wurden, lässt darauf schließen, dass es EpiSC-Zellpopulationen gibt, die transkriptionelle Ähnlichkeiten zu CFs/aCFs im Myokard haben. Diese Ähnlichkeit in der Markerexpression von EpiSCs zu CFs und aCFs lässt sich auf ihre Abstammung in der Embryonalentwicklung zurückführen⁵⁶, in der die embryonalen epikardialen Zellen von dem Subepikard aus in das myokardiale Interstitium migrieren und sich dort vor allem in Fibroblasten differenzieren^{64,71}.

Insgesamt konnte mithilfe der RNA-*in situ*-Hybridisierung die räumliche Verteilung der EpiSC-Cluster an Tag 5 nach Infarkt definiert werden und dabei ein Gradient zwischen Lokalisation und transkriptionellem Charakter der Cluster festgestellt werden. Ob dieser Gradient auch mit Unterschieden in der Funktion oder dem Stadium der Differenzierung der EpiSC-Populationen einhergehen, muss jedoch in Zukunft noch weiter erforscht werden.

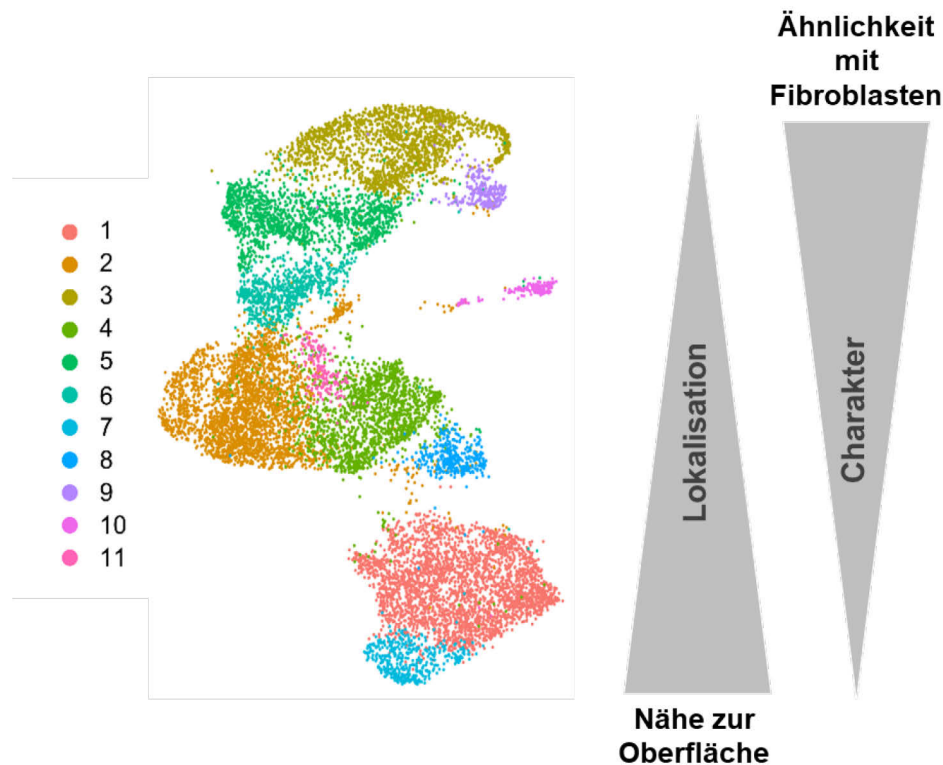


Abbildung 21: Möglicher Zusammenhang zwischen der Lokalisation der EpiSC-Cluster im Epikard und ihrem transkriptionellen Charakter. Gradienten entsprechend der Nähe der EpiSCs zur Herzoberfläche (RNA-*in situ*-Hybridisierung, siehe Abbildung 4) und ihrer Ähnlichkeit mit CFs (Expression von CF-Markergenen⁸⁹) in den EpiSC-Clustern an Tag 5 nach Infarkt. Teile der Abbildung wurden nach Hesse & Owenier *et al.* 2021⁸⁹ modifiziert (Creative Commons Attribution License; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.1.2 Zelluläre und funktionelle Heterogenität zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infarkt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals das transkriptionelle Profil von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt, einem Zeitpunkt, an dem die Expression embryonaler, epikardialer Gene am stärksten ist, mit EpiSCs 21 Tage nach Infarkt verglichen. An diesem späteren Zeitpunkt nach Infarkt sinkt die Expression embryonaler Gene in EpiSCs nach ihrer Hochregulierung nach Infarkt wieder auf das Ursprungslevel⁷⁸. Die EpiSCs 21 Tage nach Infarkt konnten in der kombinierten Clusteranalyse der beiden Zeitpunkte zu 13 der 14 EpiSC-Cluster zugeordnet werden. Dies lässt auf eine ebenfalls hohe Heterogenität des Epikards an Tag 21 nach Infarkt schließen, obwohl eine Rückbildung des aktivierten Epikards über die Zeit nach Infarkt bekannt ist¹²⁵. Dass nur ein Cluster mit EpiSCs von ausschließlich einem Zeitpunkt gefunden wurde, lässt darauf schließen, dass sich das transkriptionelle Profil der EpiSCs 5 und 21 Tage nach Infarkt nicht so stark verändert hat, dass einzelne Cluster eines Zeitpunktes

gebildet werden. Lediglich Cluster 12 enthielt ausschließlich EpiSCs 5 Tage nach (Abbildung 5) (*formale Änderung nach Anmerkung von Prof. Dr. Scheller*). Dieses Cluster konnte als proliferierende Zellpopulation identifiziert werden (Abbildung 6), die zuvor auch schon von Farbehi *et al.* als F-Cyc (*Fibroblast - cycling*) beschrieben wurde¹³¹. Das Cluster konnte heterogen verteilt im Epikard 5 Tage nach Infarkt identifiziert werden, wie die RNA-*in situ*-Hybridisierung zeigen konnte (Abbildung 4). Die proliferierenden Zellen scheinen an Tag 21 nach Infarkt jedoch vollkommen degeneriert zu sein, was darauf hindeutet, dass EpiSCs 21 Tage nach Infarkt ihre proliferativen Eigenschaften verloren haben. Dass diese proliferierende Zellpopulation nur in der Analyse 5 Tage nach Infarkt vorhanden ist, passt zu dem typischen Verlauf der Herzheilung nach Infarkt. F-Cyc sind vor allem während der Phase der Fibroblastenproliferation 2 - 4 Tage nach Infarkt vorhanden^{47,169}. Mit zunehmender Reifung des Narbengewebes nach Infarkt nimmt die Zellproliferation ab und die Fibroblasten gehen in einen Phänotyp zur Aufrechterhaltung der Homöostase über⁴⁹. In Clustern der Gruppe I, welche sich durch die Expression epikardialer und epithelialer Gene auszeichneten, machten die EpiSCs 5 Tage nach Infarkt einen deutlich höheren relativen Anteil aus, als Zellen 21 Tage nach Infarkt in diesem Cluster (Abbildung 5) (*formale Änderung nach Anmerkung von Prof. Dr. Scheller*) Dies ließe sich auf die verringerte Expression der embryonalen epikardialen Gene zu dem späteren Zeitpunkt nach Infarkt zurückführen⁷⁸. Dass an Tag 5 nach Infarkt anteilig mehr aktivierte Epikardzellen vorhanden waren, deutet auf die Aktivierung des Epikards kurz nach Infarkt hin, welche über die Zeit wieder abnimmt. Dies passt zu dem bereits beschriebenen Verlauf der Herzheilung, in dem die Expression embryonaler epikardialer Gene ab Tag 14 nach Infarkt wieder abnimmt (siehe 1.2.2). In Gruppe I befand sich auch Cluster 10, welches sich durch die Anreicherung epithelialer Transkripte (*Msln*, *Krt19*, *Dmkn*) auszeichnete. Da *Msln*-exprimierende Zellen in Zuge dieser Arbeit bereits lokalisiert werden konnten (Abbildung 4), handelte es sich bei Cluster 10 wahrscheinlich um die äußere Zellschicht des Epikards.

In Clustern der Gruppe II, in denen unter anderem aCF- oder Myofibroblasten-assoziierte Transkripte angereichert waren, waren die relativen Anteile der Zellen beider Zeitpunkte unterschiedlich je nach Cluster.

In Cluster 11 befanden sich auch *Tmsbx4*, dem Gen für Tβ4, und *Wt1* unter den signifikant exprimierten Markergenen. Smart *et al.* beschrieben 2011 die Neubildung von Kardiomyozyten aus WT-1⁺-Zellen nach Tβ4-Stimulation. Möglicherweise geht die

Neubildung der von Smart *et al.* beschriebenen Kardiomyozyten von EpiSCs aus diesem Cluster aus. Der Einfluss von T β 4 auf EpiSCs wurde im Rahmen dieser Arbeit noch tiefergehend untersucht (siehe 5.2.2).

Zellen des Chemokin-assoziierten Cluster 4 machten zum Zeitpunkt 5 Tage nach Infarkt einen deutlich größeren relativen Anteil an den EpiSCs aus als an Tag 21 nach Infarkt (Abbildung 5) (*formale Änderung nach Anmerkung von Prof. Dr. Scheller*). Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass diese EpiSC-Population an der Mobilisierung von Neutrophilen und Monozyten beteiligt sein könnte^{89,159}. Des Weiteren passt es zu dem Modell der Herzheilung, dass in diesem Cluster der relative Anteil an EpiSCs Tag 5 nach Infarkt überwiegt, da vor allem in der Inflammationsphase nach Infarkt die Sezernierung von Chemokinen als Signalstoffe für Immunzellen dienen, welche die Herzheilung fördern⁴⁹. Auffällig war auch die Lokalisation der Cluster-Markergene *Cxcl10* und *Ifit3* 5 Tage nach Infarkt in einzelnen „Expressionsherden“, die sowohl im Epikard als auch im Myokard zu beobachten waren (Abbildung 4). Die Transkription von Chemokinen wird durch Gefahrensignale, wie DAMPS (*damage-associated molecular patterns*) und PAMPS (*pathogen-associated molecular patterns*), ausgelöst¹⁷⁰. Diese wiederum aktivieren die membrangebundenen TLRs, welche molekulare Muster von Pathogenen erkennen³⁵. Die Aktivierung der TLR-Signalwege führt zudem zu der Synthese von Interferon¹⁷⁰. Da in dem Cluster vor allem Gene angereichert waren, die mit der Antwort auf Interferon assoziiert sind (Abbildung 6), könnten die „Expressionsherde“ auf Interferon-sezernierende Zellen zurückzuführen sein. Der genaue Ursprung dieser auffälligen Lokalisation des Clusters muss jedoch noch genauer erforscht werden.

Cluster der Gruppe III zeichneten sich durch die Anreicherung von Transkripten nicht-aktivierter Fibroblasten aus. Hierzu zählte auch das zweitgrößte Cluster 1, eine Zellpopulation, die sich aufgrund fehlender Aktivierungsmarker als transitorische Population zwischen *Wnt*-assoziierten und nicht-aktivierten Fibroblasten beschreiben lässt (*F-Trans*) (Abbildung 6). In Cluster 1 machten Zellen von Tag 21 nach Infarkt einen deutlich größeren relativen Anteil aus, als EpiSCs von Tag 5 nach Infarkt. Dies deckt sich mit der Annahme, dass CFs nach Infarkt aktiviert werden und sich in der Proliferationsphase in aCFs differenzieren⁴⁷, sodass an Tag 5 nach Infarkt ein Großteil der CFs bereits in einem aktivierten Phänotyp vorliegen. Später nach Infarkt in der Reifungsphase werden die aCF hingegen apoptotisch oder gehen in einen Phänotyp über, der die Homöostase und Narbenreifung fördern⁴⁷.

In einigen Clustern der Gruppe II und III waren Transkripte angereichert, die mit CFs (Cluster 7) und aCFs (Cluster 6) assoziiert werden (*Postn*, *Tnc*, *Pi16*; Abbildung 6). Obwohl beide Cluster mit ähnlichen Markergenen auch in der Analyse 5 Tage nach Infarkt vorkamen, überwog in der kombinierten Analyse der relative Anteil von EpiSCs 21 Tage nach Infarkt. Dies lässt darauf schließen, dass im Verlauf der Zeit nach Infarkt vermehrt EpiSCs mit CF- oder aCF-Profil entstehen, was auf eine Differenzierung dieser EpiSC-Populationen in CF, bzw. aCF deuten könnte.

In Cluster 5 und 14, die beide mit dem *Wnt*-Signalweg in Verbindung gebracht werden konnten, überwog deutlich der relative Anteil an EpiSCs 21 Tage nach Infarkt. Bei den in den beiden Clustern stark angereicherten Transkripten *Wif1*, *Sfrp2* oder *Dkk3* handelt es sich um *Wnt*-Inhibitoren bzw. Antagonisten, welche über die Inhibierung des *Wnt*-Signalwegs die Herzheilung fördern und als potentielle Therapeutika ein Ziel aktueller Forschung darstellen^{171,172}. Konträr zu diesen Ergebnissen zeigten Farbehi *et al.* in der Untersuchung der *Wnt*-assoziierten Population, dass die Expression von *Wif1* an einem frühen Zeitpunkt nach Infarkt (Tag 3 nach Infarkt) am höchsten war¹³¹. Sie mutmaßten, dass die *Wnt*-assoziierte Population eine inhibitorische Funktion der Fibrose und Angiogenese zwischen der inflammatorischen und fibrotischen Phase in der Herzheilung übernehmen¹³¹. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dagegen eine Funktion der *Wnt*-assoziierten Population 21 Tage nach Infarkt nahe. Ein später Zeitpunkt nach Infarkt wurde in der Studie von Farbehi *et al.* jedoch nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmal die Genexpression von EpiSCs auf Einzelzell-Ebene an zwei Zeitpunkten nach Infarkt (5 und 21 Tage nach Infarkt) verglichen. Dabei wurde insbesondere die Expression von parakrinen Faktoren, Chemokinen, Fibrose-assoziierten Genen und kardialen Faktoren untersucht.

Bereits in der Herzentwicklung spielt das Epikard in der Sekretion parakriner Faktoren eine wichtige Rolle, unter anderem in der Bildung von Koronargefäßen⁷⁵ oder dem Wachstum und der Differenzierung des Herzmuskels⁷⁶. Auch nach Infarkt können EpiSCs über parakrine Prozesse maßgeblichen Einfluss auf die Herzheilung nehmen^{56,78}. Die Analyse der Genexpression von parakrinen Faktoren zeigte, dass die meisten Transkripte der parakrinen Faktoren an Tag 21 nach Infarkt stärker exprimiert waren. Besonders proangiogene Faktoren, wie *Angpt1*, *Ang*¹³⁹, *Adamts1* oder *Vegf*, waren 21 Tage nach Infarkt höher exprimiert (Abbildung 7). Angiogenese trägt zur Herzheilung nach Infarkt bei und wird mit einer verbesserten Herzfunktion assoziiert¹⁷³. Dass EpiSCs an diesem Prozess durch die Sezernierung parakriner Faktoren beteiligt

sind, wurde bereits beschrieben¹⁷³. Jedoch ging man bisher davon aus, dass dies simultan zur Proliferation des aktivierten Epikards stattfindet¹⁷³. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass EpiSCs darüber hinaus auch 21 Tage nach Infarkt proangiogene Faktoren sezernieren.

Von den untersuchten Chemokinen waren *Ccl2* und *Cxcl5* unter anderem in den WT-1-exprimierenden Clustern an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert (Abbildung 7). Sowohl CC- als auch CXC-Chemokine sind nach Infarkt induziert und regulieren einerseits die Leukozytenwanderung und -funktion, andererseits auch die Neutrophileninfiltration¹⁵⁹. Auch *Cxcl12* war in WT-1-exprimierenden Clustern sowie Clustern der Gruppe II, die Merkmale von aktivierten Fibroblasten aufwies, an Tag 5 nach Infarkt höher exprimiert (Abbildung 7). *Cxcl12* wirkt promigratorisch auf Fibroblasten und fördert die Rekrutierung von Fibroblastenvorläufern^{149,159}, was zu einer höheren Expression in Zellen mit Fibroblasten-ähnlichen Genotyp in der Proliferationsphase nach Infarkt zu passen scheint. Diese Ergebnisse legen nahe, dass EpiSC, vor allem aber WT-1-exprimierende Zellen, nach Infarkt an der Expression von Chemokinen im Herzen beteiligt sind und damit die Immunantwort insbesondere in der Proliferationsphase nach Infarkt modulieren.

Auffallend war die deutlich stärkere Expression von *Timp1* an Tag 5 nach Infarkt. Zusätzlich zu der inhibitorischen Funktion von Metalloproteinasen ist *Timp1* mit einer erhöhten Resistenz von Kardiomyozyten gegen Apoptose assoziiert¹⁴⁸. Denkbar wäre, dass die erhöhte Resistenz von Kardiomyozyten auf eine Sekretion von *Timp1* durch EpiSCs zurückzuführen ist. Auch möglich wäre eine schützende Funktion vor Apoptose durch die Expression von *Timp1* ebenfalls in EpiSCs, was jedoch noch genauer untersucht werden müsste.

Bemerkenswert war die Expression von Kollagenen, insbesondere die Transkripte *Col1a1*, *Col1a2* und *Col3a1*, die an Tag 5 nach Infarkt deutlich stärker exprimiert waren, was auf eine Aktivierung zur vermehrten Sekretion für die Narbenbildung nach Infarkt hinweist¹⁴⁹. Dass die Expression an Tag 21 nach Infarkt runterreguliert war, könnte einer möglichen Fibrose entgegenwirken. Die Reifungsphase nach Infarkt wird mit einer vermehrten Vernetzung der ECM assoziiert¹⁷⁴. Maßgeblich an dem Kollagen-Crosslinking sind die Enzyme der LOX-Familie beteiligt¹⁷⁵, die hauptsächlich an Tag 5 nach Infarkt stärker exprimiert waren. Dies könnte auf die weiteren biologischen Funktionen der LOX-Enzyme zurückzuführen sein, wie Regulierung der Zelladhäsion, -migration und -proliferation oder EMT¹⁷⁶⁻¹⁷⁹. Ebenso war *Acta2* an Tag 5 nach Infarkt

hochreguliert, welches in aCF verstärkt exprimiert wird und ein klassischer Aktivierungsmarker von aCF darstellt¹⁵¹. Die stärkere Expression von *Acta2* an Tag 5 nach Infarkt könnte auf einen höheren Aktivierungsstatus der EpiSCs an Tag 5 im Vergleich zu Tag 21 nach Infarkt deuten. Hierfür spricht auch der geringere Anteil an WT-1-exprimierenden Zellen und proliferierenden Zellen an Tag 21 nach Infarkt.

5.1.3 WT-1-Expression nach Infarkt

Während das Epikard im adulten Herzen aus einer ruhenden Einzelzellschicht besteht, wird es nach Infarkt aktiviert, sodass embryonale Genprogramme reaktiviert werden^{78,80,81}. Zhou *et al.* beschrieben eine Hochregulierung der Expression des epikardialen Gens WT-1 nach Infarkt, welche ihren Höhepunkt zwischen Tag 1 und 5 nach Infarkt erreichte und bis 4 Wochen nach Infarkt wieder auf ein Ursprungslevel absank⁷⁸. Unsere Arbeitsgruppe konnte schon in einer vorangegangenen scRNAseq-Analyse feststellen, dass 5 Tage nach Infarkt nur ca. 30 % der Zellen im Epikard WT-1 exprimieren und konnte 5 Tage nach Infarkt unter Verwendung einer Reportermauslinie (*Wt1^{CreERT2}ROSA^{tdTomato}*) keine Differenzierung der WT-1⁺Tomato⁺-EpiSCs in andere Zelltypen identifizieren⁸⁹. In der vorliegenden Arbeit wurde die WT-1-Expression mit derselben Reportermauslinie über einen Zeitraum von 21 Tagen nachverfolgt. Bereits einen Tag nach Infarkt war TdTomato im Epikard und auch vereinzelt im Myokard detektierbar (Abbildung 8), was für eine unmittelbare Aktivierung des Epikards nach Infarkt spricht und sich mit den Beobachtungen von Zhou *et al.* deckt⁷⁸. Die TdTomato-Expression im Epikard erreichte an den hier untersuchten Zeitpunkten an Tag 7 nach Infarkt ihren Höhepunkt. An Tag 21 nach Infarkt war TdTomato nur noch in wenigen epikardialen Zellen detektierbar. Interessanterweise nahmen TdTomato⁺-exprimierende Zellen im Myokard im Verlauf der Zeit zu. Eine Migration der WT-1⁺-EpiSCs ins Myokard lässt sich anhand der TdTomato-Färbung allein nicht beurteilen, ist jedoch aufgrund dahin gehender Studien von Zhou *et al.* und Quijda *et al.* unwahrscheinlich^{57,78}. Da WT-1 nach Infarkt auch von Endothelzellen exprimiert wird¹⁵³, lässt die TdTomato⁺-Expression im Myokard eher auf die Proliferation von WT-1⁺-Endothelzellen im Myokard nach Infarkt schließen. Des Weiteren exprimierte zu keinem Zeitpunkt das gesamte Epikard WT-1. Da WT-1 häufig in Studien als Marker für das Epikard genutzt wird, sollte dort bedacht werden, dass mit WT-1 als Marker nur eine Subpopulation von EpiSCs erkannt wird.

5.2 EpiSCs in der Herzheilung nach Myokardinfarkt

Im Zuge der Heilung des Herzens nach Infarkt wird das tote Gewebe durch ein funktionelles Gewebe ersetzt. Studien im Zebrafisch zeigten, dass das Epikard in der Herzregeneration eine entscheidende Rolle spielt^{180–182}. Neben der Sekretion von parakrinen Faktoren können EpiSCs auch über die Differenzierung in andere Herzzelltypen an der Herzheilung nach Infarkt mitwirken⁵⁶ (siehe 1.3.1). Insbesondere die Differenzierung von EpiSCs in Kardiomyozyten stellt dabei ein Ziel der Forschung dar, doch bislang gibt es noch keinen anwendbaren therapeutischen Ansatz, bei dem die Regeneration nach Infarkt durch die Neubildung von Kardiomyozyten gefördert wird^{56,183}. Grundsätzlich scheinen EpiSCs jedoch auch im adulten Säugetierherzen das Potenzial zu besitzen, sich in nach Infarkt in Kardiomyozyten zu differenzieren^{58,84}. Es gibt bereits vielversprechende Ansätze im Tiermodell, in denen das Potential für eine Kardiomyozytenneubildung oder -proliferation durch „Priming“ des Epikards mit spezifischen Faktoren erhöht wird^{77,184}.

5.2.1 Rolle von EpiSCs bei der Herzheilung nach Myokardinfarkt unter Einfluss von S1P

Als erfolgsversprechendes Molekül in der Herzheilung nach Infarkt wurde das bioaktive Sphingolipid S1P identifiziert. Hohe Plasmalevel an S1P vor Infarkt führen zu einer verringerten Infarktgröße und verbesserten Herzfunktion im Tiermodell an Mäusen^{185–188}. Die scRNAseq-Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt legten eine Beteiligung der EpiSCs an dem Effekt von S1P nahe, da gleich mehrere relevante Gene des S1P-Metabolismus stark in den EpiSC-Clustern angereichert waren (Abbildung 9). Da *bis dato* Sphingolipide nur in myokardialem Gewebe^{189–192} oder Serum¹⁸⁹ von infarzierten Mäusen gemessen wurde, aber noch keine Daten über die Sphingolipid-Zusammensetzung in epikardialen Zellen erhoben wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Lipidomics-Analyse von den stromalen Zellen EpiSCs und aCFs 5 Tage nach Infarkt durchgeführt. Im Vergleich der EpiSCs zu den aCFs wurde in den EpiSCs eine signifikant höhere Konzentration von Ceramid C16:0 beobachtet (Abbildung 10). Interessanterweise war das Gen der Ceramidase *Asah1* in allen EpiSC-Clustern exprimiert (Abbildung 9). Ceramidase wandelt Ceramid zu Sphingosin, einer Vorstufe in der Synthese von S1P¹⁹³. Bei Sphingosin war eine Tendenz zu einer gesteigerten Lipidkonzentration in EpiSCs im Vergleich zu aCFs zu

erkennen. Dass S1P nicht in signifikant höherer Konzentration in EpiSCs vorkam, könnte auf eine Sekretion seiner Vorstufe, Sphingosin, und eine extrazelluläre Wirkung von S1P hindeuten.

In einer Studie von Polzin *et al.* konnte gezeigt werden, dass S1P die Herzfunktion nach Infarkt über S1P1, den Rezeptor des Gens *S1pr1*, von Kardiomyozyten verbessert¹¹³. Das Transkript *S1pr1* wurde in EpiSCs nur schwach exprimiert. Dagegen war das Transkript eines weiteren Rezeptors, *S1pr3*, in dem WT-1⁺-Cluster 8 hochexprimiert. Möglicherweise handelt es sich bei S1P3 um den Rezeptor, über den S1P an EpiSCs wirkt.

Lineage Tracing-Versuche, in denen das Schicksal WT-1⁺-Zellen mittels Immunhistologie nachverfolgt wurde, zeigten in Tieren nach endogener Anreicherung von S1P die Existenz von WT-1⁺-Zellen im Randbereich des Infarktes 21 Tage nach Infarkt (Abbildung 11). Bei diesen ACTN2⁺WT-1⁺-Zellen handelt es sich möglicherweise um Kardiomyozyten-Vorläufer. Dies müsste aber in weiteren Versuchen noch genauer untersucht werden.

5.2.2 Rolle von EpiSCs bei der Herzheilung nach Myokardinfarkt unter Einfluss von Tβ4

Tβ4 wird mit mehreren protektiven Effekten in der Wundheilung assoziiert: Es gesteigert die Angiogenese, die Migration von Keratinozyten, die Kollagen-Anordnung und die Kontraktur der Wunde^{119,120}. Nach Infarkt konnten anti-Inflammatorische Eigenschaften, eine reduzierte Infarktgröße und eine verbesserte Herzfunktion festgestellt werden^{117,194–197}. Hinkel *et al.* identifizierten Tβ4 als essenziellen parakrinen Faktor in der Protektion des Herzens, der durch embryonale Endothelvorläuferzellen vermittelt wird und auf einem gesteigertem Überleben von Kardiomyozyten und Endothelzellen sowie einer verringerten Immunantwort basiert¹²². Smart *et al.* konnten Tβ4 bereits als Stimulator für koronare Vaskulogenese und Angiogenese identifizieren¹⁹⁸. Sie zeigten, dass Tβ4-induzierte epikardiale Zellen eine Quelle für vaskuläre Vorläuferzellen darstellen und dadurch zur Neovaskularisierung nach Infarkt beitragen können. Zudem konnten sie eine gesteigerte Aktivierung des Epikards post-Infarkt mit einer Reaktivierung der WT-1-Expression beobachten, nachdem die Tiere über i.p. Injektionen mit Tβ4 behandelt wurden. Außerdem konnten sie über eine Reportermauslinie eine Differenzierung von WT-1⁺-Zellen in

Kardiomyozyten feststellen, die Troponin T und α -Aktinin exprimierten und funktionell mit den umliegenden Kardiomyozyten verbunden waren⁷⁷. Die Anzahl der in Kardiomyozyten differenzierten WT-1⁺-Zellen war jedoch gering. Um diese Differenzierung in Kardiomyozyten zu steigern und den Effekt des T β 4 zu verstärken, wurde in dieser Arbeit ein AAV9-Vektorsystem designt, wodurch T β 4 herzspezifisch überexprimierte. Die herzspezifische Überexpression nach i.v.-Injektion des AAV9-T β 4 konnte mittels Biolumineszenzmessungen zur Analyse der Lokalisation der Vektorexpression und in Proteinmessungen zur Bestimmung einer gesteigerten T β 4-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 12 und Abbildung 13). Vorteile der T β 4-Überexpression mittels eines AAV9 im Gegensatz zu einer Anreicherung von T β 4 durch i.p.-Injektionen, welche von Smart *et al.* verwendet wurde, könnten zum einen die zielgerichtete T β 4-Überexpression direkt im Herzen sein, welche bei dem AAV9-T β 4 mit einem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor erreicht wurde. Zum anderen konnte unter Verwendung eines AAV9-T β 4 über eine einzige Injektion eine signifikante T β 4-Überexpression erreicht werden, sodass dieses Verfahren vermutlich deutlich stressfreier für die Tiere ist, während in dem Protokoll für eine Anreicherung von T β 4 durch i.p.-Injektionen das T β 4 täglich appliziert werden musste⁷⁷.

Der histologischen Analyse dieser Arbeit zufolge konnte nach T β 4-Überexpression mittels AAV9-Transduktion keine Auswirkung auf die Differenzierung von EpiSCs in andere Zelltypen beobachtet werden (Abbildung 14). Allerdings war die Steigerung der T β 4-Bildung im Herzen nicht sehr hoch, wie Messungen der T β 4-Konzentration im Plasma und im Herzen zeigten (Abbildung 13). Dennoch konnte der Trend einer Steigerung an der Anzahl WT-1⁺-exprimierenden Zellen im Myokard beobachtet werden. Da in den Immunfluoreszenzfärbungen auf CD31 eine Ko-Expression mit TdTomato zu finden war, könnte es sich entweder um eine gesteigerte Bildung von WT-1⁺-Endothelzellen nach T β 4-Überexpression handeln oder aber es handelte sich um Endothelzellen, die WT-1 nach Infarkt mit T β 4-Überexpression verstärkt exprimieren. Insgesamt geben die Daten dieser Arbeit keinen Hinweis darauf, dass die Neubildung von Kardiomyozyten durch WT-1⁺-Zellen in den beschriebenen positiven Effekten von T β 4 während der Herzheilung nach Infarkt eine Rolle spielen. Möglicherweise sind hierfür höhere T β 4-Konzentrationen lokal notwendig.

Um den Einfluss von T β 4 auf die Genexpression der EpiSCs erstmals zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit scRNAseq-Analysen von EpiSCs nach T β 4-Überexpression durchgeführt.

Während von den untersuchten kardiogenen Faktoren an Tag 5 nach Infarkt vor allem *Slit3* unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert waren, waren an Tag 14 nach Infarkt *Robo1* und *Mef2a* in der Mehrheit der Cluster unter Kontrollbedingungen stärker exprimiert. *Id3* dagegen war an Tag 14 nach Infarkt stärker unter T β 4-Überexpression angereichert. Ein Effekt auf die Genexpression von kardiogenen Faktoren nach T β 4-Überexpression konnte in dieser Arbeit demnach sowohl 5 als auch 14 Tage nach Infarkt beobachtet werden. Die Hoch- oder Runterregulierung der kardiogenen Faktoren nach T β 4-Überexpression waren jedoch individuell für die einzelnen Gene und den Zeitpunkt nach Infarkt.

Hinkel *et al.* konnten zeigen, dass T β 4 sowohl CCN-1 als auch CCN-2 erhöht, wodurch die Perfusion des Myokards und die Herzfunktion gesteigert wird¹¹⁴ (siehe 1.3.3). Die Genexpressionsanalysen bestätigten eine gesteigerte Expression von *Ccn1* 5 und 14 Tage nach Infarkt unter T β 4-Überexpression in einigen Clustern der Gruppe I und II. Während *Ccn2* 5 Tage nach Infarkt ebenfalls in einigen Clustern unter T β 4-Überexpression stärker exprimiert war, war es 14 Tage nach Infarkt in einem Großteil der Cluster unter T β 4-Überexpression runterreguliert (Abbildung 17, Abbildung 20). Dies könnte auf eine initiale gesteigerte Genexpression von *Ccn2* durch T β 4 nach Infarkt sprechen, welche zu einem späteren Zeitpunkt wieder runterreguliert wird.

Der Vergleich der Kollagen-Expression zeigte, dass vor allem 14 Tage nach Infarkt die untersuchten Kollagene in Clustern mit unterschiedlicher Genexpression im Vergleich der Bedingungen durchgehend unter T β 4-Überexpression stärker exprimiert waren. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass T β 4 die Kollagen-Anordnung verbessert^{119,120}.

Insgesamt konnten die Analysen von EpiSCs an Tag 5 und 14 nach Infarkt einen tiefergehenden Einblick des Effektes einer T β 4-Überexpression auf die Genexpression geben. Hinweise auf eine von Smart *et al.* beschriebene Differenzierung von EpiSCs in Kardiomyozyten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Da diese Differenzierung nur eine Minderheit der WT-1⁺-EpiSCs betraf, handelt es sich womöglich um einen Effekt, der nicht auf T β 4 beruht. Eine Differenzierung WT-1⁺-EpiSCs in Kardiomyozyten konnte bereits in Wildtyp-Herzen in geringer Anzahl beobachtet werden⁵⁶.

5.3 Ausblick

Mithilfe der scRNAseq wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Transkriptomanalyse von EpiSCs 21 Tage nach Infarkt durchgeführt und die Veränderungen in der Genexpression mit EpiSCs 5 Tage nach Infarkt verglichen. Mit diesen beiden Zeitpunkten konnten die Phasen der Wundheilung, Proliferationsphase (5 Tage nach Infarkt) und Reifungsphase (21 Tage nach Infarkt), näher untersucht werden. Um auch Erkenntnisse über das Transkriptom der EpiSCs kurz nach Infarkt im Zuge ihrer Aktivierung zu erhalten, wäre eine Analyse der EpiSCs in der Inflammationsphase (1-3 Tage nach Infarkt) interessant. Lediglich die Forschergruppe Farbehi *et al.* führte bisher eine scRNAseq der Herzzellen 3 Tage nach Infarkt durch¹³¹. Dabei konnten sie jedoch keine EpiSC-Population identifizieren, was vermutlich auf technische Gründe und den geringen Anteil an EpiSCs an den Gesamtherzzellen zurückzuführen ist. Mit der in dieser Arbeit durchgeführten Zellisolationstechnik wäre eine Analyse heute sicherlich durchführbar. Zudem wäre für die weitergehende Analyse der Reaktivierung des Epikards nach Infarkt, ergänzend zu der histologischen Nachverfolgung der WT-1-Expression über das Reporterprotein TdTomato in dieser Arbeit, eine Quantifizierung des WT-1-, bzw. TdTomato-Signals über den Verlauf nach Infarkt hilfreich.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte unter T β 4-Überexpression eine veränderte Expression zahlreicher Gene 5 und 14 Tage nach Infarkt beobachtet werden. Dies verdeutlicht die Komplexität des Effektes von T β 4, da sich T β 4 auf die Expression einer Vielzahl an Genen auswirkt. Hier bedarf es weiterführender Analysen, um die Wirkung der veränderten Genexpression nach einer T β 4-Behandlung und deren Beteiligung an der Herzheilung zu verstehen. Da bereits ein anti-inflammatorischer Effekt von T β 4 bekannt ist¹¹⁴, sollte in diesem Zusammenhang auch die Analyse der Immunzellen im Zusammenspiel mit EpiSCs in zukünftigen Projekten näher analysiert werden. Um von den positiven Effekten einer T β 4-Behandlung zu profitieren, muss T β 4 zudem vor der Gewebeschädigung verabreicht werden⁸³, was eine Herausforderung in der klinischen Anwendung von T β 4 in der Therapie von Herzinfarkten darstellt. Bis T β 4 in der Therapie von Herzinfarkten eingesetzt werden kann, ist daher noch weitere Forschung zum besseren Verständnis der biologischen Prozesse und seiner Darreichungsform in der klinischen Anwendung notwendig.

EpiSCs können sowohl über die direkte Differenzierung in andere Zelltypen als auch über parakrine Prozesse zur Herzheilung beitragen. Um ein tieferes Verständnis über

den Einfluss von EpiSCs in der Herzheilung zu erlangen, müssen die in dieser Arbeit identifizierten EpiSC-Populationen mit und ohne T β 4-Behandlung untersucht werden. Hier bedarf es weiterer Forschung, sowohl bezüglich der Signalmechanismen der EpiSCs und ihrer Interaktion mit anderen kardialen Herzzellen als auch bezüglich der Untersuchung der von EpiSCs sezernierten parakrinen Faktoren und ihrer Wirkung.

6. Literaturverzeichnis

1. Lederhuber, H. C. & Lange, V. *BASICS Kardiologie*. (Urban & Fischer Verlag, 2010).
2. Pape, H.-C., Kurtz, A. & Silbernagl, S. *Physiologie*. (Georg Thieme Verlag, 2014).
3. Detry, J.-M. R. The pathophysiology of myocardial ischaemia. *Eur Heart J* **17**, (1996).
4. Neri, M., Riezzo, I., Pascale, N., Pomara, C. & Turillazzi, E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm.* **2017**, 7018393 (2017).
5. Heidemann, C. *et al.* *Gesundheitliche Lage von Erwachsenen in Deutschland – Ergebnisse zu ausgewählten Indikatoren der Studie GEDA 2019/2020-EHIS*. <https://edoc.rki.de/handle/176904/8749> (2021) doi:10.25646/8456.
6. Thygesen, K. *et al.* Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Journal of the American College of Cardiology* **72**, 2231–2264 (2018).
7. Lüllmann, H., Mohr, K. & Hein, L. *Taschenatlas Pharmakologie*. (Georg Thieme Verlag, 2015).
8. Task Force Members *et al.* Universal definition of myocardial infarction: Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *European Heart Journal* **28**, 2525–2538 (2007).
9. Vogel, B. *et al.* ST-segment elevation myocardial infarction. *Nat Rev Dis Primers* **5**, 39 (2019).
10. Jennings, R. B. & Ganote, C. E. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circulation Research* **35**, 156–172 (1974).
11. Virmani, R., Forman, M. B. & Kolodgie, F. D. Myocardial reperfusion injury. Histopathological effects of perfluorochemical. *Circulation* **81**, IV57-68 (1990).
12. Frangogiannis, N. G. The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**, 1907–1939 (2006).
13. Reimer, K. A., Jennings, R. B. & Tatum, A. H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* **52**, 72A-81A (1983).
14. Ibáñez, B., Heusch, G., Ovize, M. & Van de Werf, F. Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology* **65**, 1454–1471 (2015).
15. Montecucco, F., Carbone, F. & Schindler, T. H. Pathophysiology of ST-segment elevation myocardial infarction: novel mechanisms and treatments. *European Heart Journal* **37**, 1268–1283 (2016).
16. O’Gara, P. T. *et al.* 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* **127**, e362-425 (2013).
17. Braunwald, E. & Kloner, R. A. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* **76**, 1713–1719 (1985).
18. Jennings, R. B., Murry, C. E., Steenbergen, C. & Reimer, K. A. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* **82**, II2-12 (1990).
19. Prabhu, S. D. & Frangogiannis, N. G. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res* **119**, 91–112 (2016).
20. Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–1080 (2011).
21. Chen, W., Bian, W., Zhou, Y. & Zhang, J. Cardiac Fibroblasts and Myocardial Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 599928 (2021).

22. Souders, C. A., Bowers, S. L. K. & Baudino, T. A. Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* **105**, 1164–1176 (2009).
23. Sadoshima, J. & Weiss, J. N. Cardiac fibroblasts: the good, the bad, the ugly, the beautiful. *J Mol Cell Cardiol* **70**, 1 (2014).
24. Sandanger, Ø. *et al.* The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **99**, 164–174 (2013).
25. Shinde, A. V. & Frangogiannis, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair. *J Mol Cell Cardiol* **70**, 74–82 (2014).
26. Dreyer, W. J. *et al.* Kinetics of C5a release in cardiac lymph of dogs experiencing coronary artery ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* **71**, 1518–1524 (1992).
27. Rossen, R. D. *et al.* Mechanism of complement activation after coronary artery occlusion: evidence that myocardial ischemia in dogs causes release of constituents of myocardial subcellular origin that complex with human C1q in vivo. *Circ Res* **62**, 572–584 (1988).
28. Granger, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* **255**, H1269–1275 (1988).
29. Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest* **115**, 500–508 (2005).
30. Griendling, K. K. & FitzGerald, G. A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* **108**, 1912–1916 (2003).
31. Hensley, K., Robinson, K. A., Gabbita, S. P., Salsman, S. & Floyd, R. A. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* **28**, 1456–1462 (2000).
32. Sen, C. K. & Packer, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* **10**, 709–720 (1996).
33. Lenardo, M. J. & Baltimore, D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. *Cell* **58**, 227–229 (1989).
34. Stancovski, I. & Baltimore, D. NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell* **91**, 299–302 (1997).
35. Beg, A. A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol* **23**, 509–512 (2002).
36. Moser, B. & Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* **2**, 123–128 (2001).
37. Frangogiannis, N. G. *et al.* Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2567–2576 (1998).
38. Frangogiannis, N. G. *et al.* Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**, 699–710 (1998).
39. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).
40. Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **109**, 41–50 (2002).
41. Bassols, A. & Massagué, J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **263**, 3039–3045 (1988).
42. Edwards, D. R. *et al.* Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J* **6**, 1899–1904 (1987).
43. Laiho, M., Saksela, O., Andreasen, P. A. & Keski-Oja, J. Enhanced production and extracellular deposition of the endothelial-type plasminogen activator inhibitor in cultured human lung fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* **103**, 2403–2410 (1986).

44. Virag, J. A. I. *et al.* Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function. *Am J Pathol* **171**, 1431–1440 (2007).
45. Zymek, P. *et al.* The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol* **48**, 2315–2323 (2006).
46. Booz, G. W. & Baker, K. M. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **30**, 537–543 (1995).
47. Fu, X. *et al.* Specialized fibroblast differentiated states underlie scar formation in the infarcted mouse heart. *J. Clin. Invest.* **128**, 2127–2143 (2018).
48. Kaur, H. *et al.* Targeted Ablation of Periostin-Expressing Activated Fibroblasts Prevents Adverse Cardiac Remodeling in Mice. *Circ Res* **118**, 1906–1917 (2016).
49. Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubyrt, M. P. & Lindsey, M. L. Cardiac Fibroblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 448–458 (2017).
50. Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I. & Gabbiani, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* **146**, 56–66 (1995).
51. Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G. & Daemen, M. J. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am J Pathol* **145**, 868–875 (1994).
52. Frangogiannis, N. G. *et al.* Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J* **15**, 1428–1430 (2001).
53. Zhou, Y. *et al.* The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Front Cardiovasc Med* **8**, 738325 (2021).
54. Park, T.-H. *et al.* Impact of myocardial structure and function postinfarction on diastolic strain measurements: implications for assessment of myocardial viability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H724–731 (2006).
55. Lerman, R. H. *et al.* Myocardial healing and repair after experimental infarction in the rabbit. *Circ Res* **53**, 378–388 (1983).
56. Smits, A. M., Dronkers, E. & Goumans, M.-J. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacol. Res.* **127**, 129–140 (2018).
57. Quijada, P., Trembley, M. A. & Small, E. M. The Role of the Epicardium During Heart Development and Repair. *Circ Res* **126**, 377–394 (2020).
58. van Wijk, B., Gunst, Q. D., Moorman, A. F. M. & van den Hoff, M. J. B. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PLoS ONE* **7**, e44692 (2012).
59. Schlueter, J. & Brand, T. Origin and fates of the proepicardium. *Aswan Heart Centre Science & Practice Series* **2011**, 11 (2011).
60. Bressan, M., Liu, G. & Mikawa, T. Early mesodermal cues assign avian cardiac pacemaker fate potential in a tertiary heart field. *Science* **340**, 744–748 (2013).
61. Cossette, S. & Misra, R. The identification of different endothelial cell populations within the mouse proepicardium. *Dev Dyn* **240**, 2344–2353 (2011).
62. Duim, S. N., Goumans, M.-J. & Kruithof, B. P. T. WT1 in Cardiac Development and Disease. in *Wilms Tumor* (ed. van den Heuvel-Eibrink, M. M.) (Codon Publications, 2016).
63. Männer, J., Schlueter, J. & Brand, T. Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn* **233**, 1454–1463 (2005).
64. Vega-Hernández, M., Kovacs, A., De Langhe, S. & Ornitz, D. M. FGF10/FGFR2b signaling is essential for cardiac fibroblast development and growth of the myocardium. *Development* **138**, 3331–3340 (2011).

65. Zhou, B. *et al.* Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* **454**, 109–113 (2008).
66. Cai, C.-L. *et al.* A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* **454**, 104–108 (2008).
67. Kikuchi, K. *et al.* tcf21+ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development* **138**, 2895–2902 (2011).
68. MacNeill, C., French, R., Evans, T., Wessels, A. & Burch, J. B. E. Modular Regulation of cGATA-5 Gene Expression in the Developing Heart and Gut. *Developmental Biology* **217**, 62–76 (2000).
69. Vrancken Peeters, M. P., Mentink, M. M., Poelmann, R. E. & Gittenberger-de Groot, A. C. Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol (Berl)* **191**, 503–508 (1995).
70. von Gise, A. & Pu, W. T. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circ Res* **110**, 1628–1645 (2012).
71. Carmona, R., González-Iriarte, M., Pérez-Pomares, J. M. & Muñoz-Chápuli, R. Localization of the Wilm’s tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res* **303**, 173–186 (2001).
72. Katz, T. C. *et al.* Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells. *Dev Cell* **22**, 639–650 (2012).
73. Lajiness, J. D. & Conway, S. J. Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* **70**, 2–8 (2014).
74. Christoffels, V. M. *et al.* Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* **458**, E8–9; discussion E9–10 (2009).
75. Olivey, H. E. & Svensson, E. C. Epicardial-myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circ Res* **106**, 818–832 (2010).
76. Wessels, A. & Pérez-Pomares, J. M. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* **276**, 43–57 (2004).
77. Smart, N. *et al.* De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* **474**, 640–644 (2011).
78. Zhou, B. *et al.* Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *J Clin. Invest.* **121**, 1894–1904 (2011).
79. Smits, A. M. & Riley, P. R. Epicardium-Derived Heart Repair. *J Dev Biol* **2**, 84–100 (2014).
80. Limana, F. *et al.* Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit(+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol* **48**, 609–618 (2010).
81. Huang, G. N. *et al.* C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science* **338**, 1599–1603 (2012).
82. Foglio, E. *et al.* Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *Int J Cardiol* **197**, 333–347 (2015).
83. Zhou, B. *et al.* Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **52**, 43–47 (2012).
84. Limana, F. *et al.* Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* **101**, 1255–1265 (2007).
85. Zangi, L. *et al.* Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. *Nat Biotechnol* **31**, 898–907 (2013).
86. Smart, N. *et al.* Thymosin beta4 facilitates epicardial neovascularization of the injured adult heart. *Ann N Y Acad Sci* **1194**, 97–104 (2010).
87. Volz, K. S. *et al.* Pericytes are progenitors for coronary artery smooth muscle. *Elife* **4**, e10036 (2015).

88. Bollini, S. *et al.* Re-Activated Adult Epicardial Progenitor Cells Are a Heterogeneous Population Molecularly Distinct from Their Embryonic Counterparts. *Stem Cells and Development* **23**, 1719–1730 (2014).
89. Hesse, J. *et al.* Single-cell transcriptomics defines heterogeneity of epicardial cells and fibroblasts within the infarcted murine heart. *Elife* **10**, e65921 (2021).
90. Heallen, T. R., Kadow, Z. A., Kim, J. H., Wang, J. & Martin, J. F. Stimulating Cardiogenesis as a Treatment for Heart Failure. *Circ Res* **124**, 1647–1657 (2019).
91. Vagnozzi, R. J., Molkentin, J. D. & Houser, S. R. New Myocyte Formation in the Adult Heart: Endogenous Sources and Therapeutic Implications. *Circ Res* **123**, 159–176 (2018).
92. Forte, E., Furtado, M. B. & Rosenthal, N. The interstitium in cardiac repair: role of the immune-stromal cell interplay. *Nat Rev Cardiol* **15**, 601–616 (2018).
93. Winter, E. M. *et al.* Preservation of left ventricular function and attenuation of remodeling after transplantation of human epicardium-derived cells into the infarcted mouse heart. *Circulation* **116**, 917–927 (2007).
94. Foglia, M. J. & Poss, K. D. Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development* **143**, 729–740 (2016).
95. Cao, J. & Poss, K. D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nat Rev Cardiol* **15**, 631–647 (2018).
96. Karra, R. & Poss, K. D. Redirecting cardiac growth mechanisms for therapeutic regeneration. *J Clin Invest* **127**, 427–436 (2017).
97. Wei, K. *et al.* Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature* **525**, 479–485 (2015).
98. Weeke-Klimp, A. *et al.* Epicardium-derived cells enhance proliferation, cellular maturation and alignment of cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **49**, 606–616 (2010).
99. Eid, H. *et al.* Role of epicardial mesothelial cells in the modification of phenotype and function of adult rat ventricular myocytes in primary coculture. *Circ Res* **71**, 40–50 (1992).
100. Oh, H. *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 12313–12318 (2003).
101. Beltrami, A. P. *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* **114**, 763–776 (2003).
102. Zhang, H. *et al.* Sphingosine-1-phosphate, a novel lipid, involved in cellular proliferation. *J Cell Biol* **114**, 155–167 (1991).
103. Sadahira, Y., Ruan, F., Hakomori, S. & Igarashi, Y. Sphingosine 1-phosphate, a specific endogenous signaling molecule controlling cell motility and tumor cell invasiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9686–9690 (1992).
104. Liu, X., Zhang, Q.-H. & Yi, G.-H. Regulation of metabolism and transport of sphingosine-1-phosphate in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* **363**, 21–33 (2012).
105. Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S. & Moolenaar, W. H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* **62**, 579–587 (2010).
106. Orr Gandy, K. A. & Obeid, L. M. Targeting the sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate pathway in disease: review of sphingosine kinase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 157–166 (2013).
107. Kunkel, G. T., Maceyka, M., Milstien, S. & Spiegel, S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 688–702 (2013).
108. Li, N. & Zhang, F. Implication of sphingosin-1-phosphate in cardiovascular regulation. *Front Biosci (Landmark Ed)* **21**, 1296–1313 (2016).

109. Jin, Z.-Q. *et al.* Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**, H1970-1977 (2002).
110. Karliner, J. S., Honbo, N., Summers, K., Gray, M. O. & Goetzl, E. J. The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1713–1717 (2001).
111. Argraves, K. M. & Argraves, W. S. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. *J Lipid Res* **48**, 2325–2333 (2007).
112. Tao, R. *et al.* High-density lipoprotein determines adult mouse cardiomyocyte fate after hypoxia-reoxygenation through lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H1022-1028 (2010).
113. Polzin, A. *et al.* Sphingosine-1-phosphate improves outcome of no-reflow acute myocardial infarction via sphingosine-1-phosphate receptor 1. *ESC Heart Fail* **10**, 334–341 (2023).
114. Hinkel, R., Klett, K., Bähr, A. & Kupatt, C. Thymosin β 4-mediated protective effects in the heart. *Expert Opinion on Biological Therapy* **18**, 121–129 (2018).
115. Huff, T., Müller, C. S., Otto, A. M., Netzker, R. & Hannappel, E. beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 205–220 (2001).
116. Huang, W. Q. & Wang, Q. R. Bone marrow endothelial cells secrete thymosin beta4 and AcSDKP. *Exp Hematol* **29**, 12–18 (2001).
117. Bock-Marquette, I., Saxena, A., White, M. D., Michael DiMaio, J. & Srivastava, D. Thymosin β 4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* **432**, 466–472 (2004).
118. Hannappel, E. beta-Thymosins. *Ann N Y Acad Sci* **1112**, 21–37 (2007).
119. Goldstein, A. L., Hannappel, E. & Kleinman, H. K. Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues. *Trends Mol Med* **11**, 421–429 (2005).
120. Malinda, K. M., Goldstein, A. L. & Kleinman, H. K. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J* **11**, 474–481 (1997).
121. Philp, D. *et al.* Thymosin beta4 increases hair growth by activation of hair follicle stem cells. *FASEB J* **18**, 385–387 (2004).
122. Hinkel, R. *et al.* Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* **117**, 2232–2240 (2008).
123. Hinkel, R. *et al.* MRTF-A controls vessel growth and maturation by increasing the expression of CCN1 and CCN2. *Nat Commun* **5**, 3970 (2014).
124. Kim, H., Kim, M., Im, S.-K. & Fang, S. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* **34**, 147–159 (2018).
125. Owenier, C. *et al.* Novel technique for the simultaneous isolation of cardiac fibroblasts and epicardial stromal cells from the infarcted murine heart. *Cardiovasc. Res.* **116**, 1047–1058 (2020).
126. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682 (2012).
127. Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. & Satija, R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol* **36**, 411–420 (2018).
128. McGinnis, C. S., Murrow, L. M. & Gartner, Z. J. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. *Cell Syst* **8**, 329–337.e4 (2019).
129. Chang, W. *et al.* Shiny: Web Application Framework for R. (2022).

130. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**, 48 (2009).
131. Farbehi, N. *et al.* Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife* **8**, (2019).
132. Bochmann, L. *et al.* Revealing new mouse epicardial cell markers through transcriptomics. *PLoS One* **5**, e11429 (2010).
133. Wittmann, J. *et al.* Plasma gelsolin promotes re-epithelialization. *Sci Rep* **8**, 13140 (2018).
134. Bradshaw, A. D. The role of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in cardiac repair and fibrosis: Does expression of SPARC by macrophages influence outcomes? *J Mol Cell Cardiol* **93**, 156–161 (2016).
135. Frangogiannis, N. G. Cardiac fibrosis: Cell biological mechanisms, molecular pathways and therapeutic opportunities. *Mol Aspects Med* **65**, 70–99 (2019).
136. van Andel, H., Kocemba, K. A., Spaargaren, M. & Pals, S. T. Aberrant Wnt signaling in multiple myeloma: molecular mechanisms and targeting options. *Leukemia* **33**, 1063–1075 (2019).
137. Foulquier, S. *et al.* WNT Signaling in Cardiac and Vascular Disease. *Pharmacol Rev* **70**, 68–141 (2018).
138. Chen, A.-N., Zhong, L.-L., Ju, K. & Cao, H. Bioinformatics Analysis of a Functional ANGPT1 Variant That Interferes with miR-607 and Its Association with Susceptibility and Outcome of Ischemic Stroke in a Han Population. *TCRM Volume* **17**, 1045–1052 (2021).
139. Liu, X.-H. *et al.* Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: Angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvascular Research* **76**, 23–30 (2008).
140. Hirohata, S., Inagaki, J. & Ohtsuki, T. [Diverse Functions of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif-1]. *Yakugaku Zasshi* **137**, 811–814 (2017).
141. Shiraishi, M., Yamaguchi, A. & Suzuki, K. Nrg1/ErbB signaling-mediated regulation of fibrosis after myocardial infarction. *FASEB J* **36**, e22150 (2022).
142. Korf-Klingebiel, M. *et al.* Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat Med* **21**, 140–149 (2015).
143. Hanna, A. & Frangogiannis, N. G. The Role of the TGF- β Superfamily in Myocardial Infarction. *Front Cardiovasc Med* **6**, 140 (2019).
144. Mylonas, K. J. *et al.* 11 β -HSD1 suppresses cardiac fibroblast CXCL2, CXCL5 and neutrophil recruitment to the heart post MI. *Journal of Endocrinology* **233**, 315–327 (2017).
145. Frangogiannis, N. G. Matricellular Proteins in Cardiac Adaptation and Disease. *Physiological Reviews* **92**, 635–688 (2012).
146. Mikolajczyk, T. P. *et al.* Role of inflammatory chemokines in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics* **223**, 107799 (2021).
147. Korbecki, J., Maruszewska, A., Bosiacki, M., Chlubek, D. & Baranowska-Bosiacka, I. The Potential Importance of CXCL1 in the Physiological State and in Noncancer Diseases of the Cardiovascular System, Respiratory System and Skin. *Int J Mol Sci* **24**, 205 (2022).
148. Burke, R. M., Burgos Villar, K. N. & Small, E. M. Fibroblast contributions to ischemic cardiac remodeling. *Cellular Signalling* **77**, 109824 (2021).
149. Frangogiannis, N. G. Cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* **117**, 1450–1488 (2021).
150. Neff, L. S. & Bradshaw, A. D. Cross your heart? Collagen cross-links in cardiac health and disease. *Cell Signal* **79**, 109889 (2021).
151. Shinde, A. V., Humeres, C. & Frangogiannis, N. G. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **1863**, 298–309 (2017).

152. Zhao, Y. *et al.* Intracellular generation of sphingosine 1-phosphate in human lung endothelial cells: role of lipid phosphate phosphatase-1 and sphingosine kinase 1. *J Biol Chem* **282**, 14165–14177 (2007).
153. Duim, S. N., Kurakula, K., Goumans, M.-J. & Kruithof, B. P. T. Cardiac endothelial cells express Wilms' tumor-1: Wt1 expression in the developing, adult and infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol* **81**, 127–135 (2015).
154. Ilicic, T. *et al.* Classification of low quality cells from single-cell RNA-seq data. *Genome Biology* **17**, 29 (2016).
155. Gong, L. *et al.* SLIT3 deficiency attenuates pressure overload-induced cardiac fibrosis and remodeling. *JCI Insight* **5**, e136852 (2020).
156. Wo, D. *et al.* IGFBP-4 enhances VEGF-induced angiogenesis in a mouse model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med* **24**, 9466–9471 (2020).
157. A. Ploplis, V. Effects of Altered Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression on Cardiovascular Disease. *CDT* **12**, 1782–1789 (2011).
158. Flevaris, P. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor Type I Controls Cardiomyocyte Transforming Growth Factor- β and Cardiac Fibrosis. *Circulation* **136**, 664–679 (2017).
159. Chen, B. & Frangogiannis, N. G. Chemokines in Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res* **14**, 35–52 (2021).
160. Zhu, S. *et al.* Protein Cyt11: its role in chondrogenesis, cartilage homeostasis, and disease. *Cell Mol Life Sci* **76**, 3515–3523 (2019).
161. Hatipoglu, O. F. *et al.* ADAMTS1 is a unique hypoxic early response gene expressed by endothelial cells. *J Biol Chem* **284**, 16325–16333 (2009).
162. Folestad, E., Kunath, A. & Wågsäter, D. PDGF-C and PDGF-D signaling in vascular diseases and animal models. *Molecular Aspects of Medicine* **62**, 1–11 (2018).
163. Higashi, Y., Gautam, S., Delafontaine, P. & Sukhanov, S. IGF-1 and cardiovascular disease. *Growth Hormone & IGF Research* **45**, 6–16 (2019).
164. Lee, R. T. Matrix Metalloproteinase Inhibition and the Prevention of Heart Failure. *Trends in Cardiovascular Medicine* **11**, 202–205 (2001).
165. Barallobre-Barreiro, J. *et al.* Extracellular Matrix in Heart Failure: Role of ADAMTS5 in Proteoglycan Remodeling. *Circulation* **144**, 2021–2034 (2021).
166. Roux, M. & Zaffran, S. Hox Genes in Cardiovascular Development and Diseases. *J Dev Biol* **4**, 14 (2016).
167. Gladka, M. M. *et al.* Single-Cell Sequencing of the Healthy and Diseased Heart Reveals Cytoskeleton-Associated Protein 4 as a New Modulator of Fibroblasts Activation. *Circulation* **138**, 166–180 (2018).
168. Wang, L. *et al.* Single-cell dual-omics reveals the transcriptomic and epigenomic diversity of cardiac non-myocytes. *Cardiovasc Res* **118**, 1548–1563 (2022).
169. Ivey, M. J. *et al.* Resident fibroblast expansion during cardiac growth and remodeling. *J Mol Cell Cardiol* **114**, 161–174 (2018).
170. de Haan, J. J., Smeets, M. B., Pasterkamp, G. & Arslan, F. Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. *Mediators of Inflammation* **2013**, 1–13 (2013).
171. Ni, B., Sun, M., Zhao, J., Wang, J. & Cao, Z. The role of β -catenin in cardiac diseases. *Front Pharmacol* **14**, 1157043 (2023).
172. Meyer, I. S. *et al.* The cardiac microenvironment uses non-canonical WNT signaling to activate monocytes after myocardial infarction. *EMBO Mol Med* **9**, 1279–1293 (2017).
173. Wu, X., Reboll, M. R., Korf-Klingebiel, M. & Wollert, K. C. Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res* **117**, 1257–1273 (2021).
174. Frangogiannis, N. G., Michael, L. H. & Entman, M. L. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res* **48**, 89–100 (2000).

175. Rodríguez, C. & Martínez-González, J. The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling. *Cells* **8**, 1483 (2019).
176. Saad, F. A., Torres, M., Wang, H. & Graham, L. Intracellular lysyl oxidase: effect of a specific inhibitor on nuclear mass in proliferating cells. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 944–949 (2010).
177. Rodríguez, C., Rodríguez-Sinovas, A. & Martínez-González, J. Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* **21**, 218–224 (2008).
178. Kagan, H. M. & Li, W. Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* **88**, 660–672 (2003).
179. Rodríguez, C. *et al.* Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **79**, 7–13 (2008).
180. Jopling, C. *et al.* Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* **464**, 606–609 (2010).
181. Kikuchi, K. *et al.* Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* **464**, 601–605 (2010).
182. Lepilina, A. *et al.* A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* **127**, 607–619 (2006).
183. Furtado, M. B., Nim, H. T., Boyd, S. E. & Rosenthal, N. A. View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration. *Development* **143**, 387–397 (2016).
184. Hadas, Y., Katz, M. G., Bridges, C. R. & Zangi, L. Modified mRNA as a therapeutic tool to induce cardiac regeneration in ischemic heart disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **9**, (2017).
185. Theilmeier, G. *et al.* High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* **114**, 1403–1409 (2006).
186. Brulhart-Meynet, M.-C. *et al.* Improving reconstituted HDL composition for efficient post-ischemic reduction of ischemia reperfusion injury. *PLoS One* **10**, e0119664 (2015).
187. Zhang, F. *et al.* Sphingosine 1-phosphate signaling contributes to cardiac inflammation, dysfunction, and remodeling following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **310**, H250-261 (2016).
188. Bandhuvula, P. *et al.* S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**, H1753-1761 (2011).
189. Ji, R. *et al.* Increased de novo ceramide synthesis and accumulation in failing myocardium. *JCI Insight* **2**, e96203, 96203 (2017).
190. Sansbury, B. E. *et al.* Metabolomic analysis of pressure-overloaded and infarcted mouse hearts. *Circ Heart Fail* **7**, 634–642 (2014).
191. Halade, G. V., Kain, V., Tourki, B. & Jadapalli, J. K. Lipoxygenase drives lipidomic and metabolic reprogramming in ischemic heart failure. *Metabolism* **96**, 22–32 (2019).
192. Devarakonda, T. *et al.* Chronic treatment with serelaxin mitigates adverse remodeling in a murine model of ischemic heart failure and modulates bioactive sphingolipid signaling. *Sci Rep* **12**, 8897 (2022).
193. Kovilakath, A., Wohlford, G. & Cowart, L. A. Circulating sphingolipids in heart failure. *Front. Cardiovasc. Med.* **10**, 1154447 (2023).
194. Bock-Marquette, I. *et al.* Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **46**, 728–738 (2009).
195. Srivastava, D., Ieda, M., Fu, J. & Qian, L. Cardiac repair with thymosin β 4 and cardiac reprogramming factors. *Ann N Y Acad Sci* **1270**, 66–72 (2012).
196. Peng, H. *et al.* Thymosin- β 4 prevents cardiac rupture and improves cardiac function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **307**, H741-751 (2014).

197. Kumar, A., Patel, A., Duvalsaint, L., Desai, M. & Marks, E. D. Thymosin β 4 coated nanofiber scaffolds for the repair of damaged cardiac tissue. *J Nanobiotechnology* **12**, 10 (2014).
198. Smart, N. *et al.* Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* **445**, 177–182 (2007).

7. Appendix

Tabelle 8: Nachweis der Kontamination durch Kardiomyozyten (KM) und Erythrozyten (Ery) innerhalb der identifizierten Cluster der kombinierten Analyse der scRNAseq von EpiSCs 5 und 21 Tage nach Infarkt. Hierfür wurde die durchschnittliche Expression von zellspezifischen Markern für Kardiomyozyten, Erythrozyten und glatte Muskelzellen in allen Clustern überprüft.

Cluster		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
KM-Marker	Mb	0,06	0,15	0,11	0,07	0,09	0,11	0,11	0,09	127,33	10,60	0,16	0,05	0,09	0,07	0,03	0,15
	Myl3	0,07	0,08	0,11	0,07	0,09	0,08	0,11	0,10	132,09	9,36	0,19	0,06	0,09	0,14	0,12	0,18
	Tnni3	0,07	0,14	0,11	0,07	0,08	0,09	0,10	0,08	127,74	9,66	0,22	0,06	0,16	0,14	0,07	0,17
	Tnnt2	0,12	0,18	0,13	0,08	0,11	0,19	0,35	0,09	202,52	17,41	0,30	0,06	0,14	0,11	1,12	0,34
Ery-Marker	Alas2	0,08	0,02	0,01	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	1,77	0,31	0,03	0,00	0,01	0,00	0,14
	Gypa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Hba-a1	0,42	1,50	1,00	0,21	1,47	1,38	1,01	3,40	5,29	154,41	1,02	0,08	0,15	0,18	3,06	9,65
	Hbb-bt	0,20	0,50	0,16	0,08	0,50	0,35	0,33	0,87	1,60	75,80	0,22	0,03	0,03	0,07	0,20	1,37

Tabelle 9: Nachweis der Kontamination durch Kardiomyozyten (KM), Erythrozyten (Ery) und glatten Muskelzellen (SMC) innerhalb der identifizierten Cluster der kombinierten Analyse der scRNAseq von EpiSCs 5 Tage nach Infarkt nach Tβ4-Überexpression und Kontrollbedingung. Hierfür wurde die durchschnittliche Expression von zellspezifischen Markern für Erythrozyten und glatte Muskelzellen in allen Clustern überprüft.

Cluster		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ery-Marker	Alas2	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,20	0,11	0,03	0,10	0,03	14,84	23,32	0,00	0,21	0,09
	Gypa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,09	1,28	0,00	0,00	0,00
	Hba-a1	0,34	0,20	0,34	0,61	0,50	0,39	1,04	1,31	0,72	0,95	14,07	1,17	1130,19	1538,35	0,06	6,57	1,20
	Hbb-bt	0,12	0,13	0,17	0,24	0,27	0,16	0,39	0,57	0,46	0,36	6,85	0,55	147,91	746,88	0,01	1,58	1,02
SMC-Marker	Acta2	4,46	17,05	7,85	2,43	9,80	22,23	21,84	8,91	2,12	3,00	13,58	1,11	12,81	3,92	3,47	2,23	103,05
	Vtn	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,83
	Tagln	2,62	17,79	4,77	3,18	4,90	10,83	13,64	6,36	0,71	1,82	6,52	0,65	7,84	2,04	5,13	1,40	82,22
	Myh11	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,05	0,04	0,07	0,01	0,04	0,01	0,02	0,00	0,01	0,03	0,06	13,32

Tabelle 10: Nachweis der Kontamination durch Kardiomyozyten (KM), Erythrozyten (Ery) und glatten Muskelzellen (SMC) innerhalb der identifizierten Cluster der kombinierten Analyse der scRNAseq von EpiSCs 14 Tage nach Infarkt nach T β 4-Überexpression und Kontrollbedingung. Hierfür wurde die durchschnittliche Expression von zellspezifischen Markern für Kardiomyozyten, Erythrozyten und glatte Muskelzellen in allen Clustern überprüft.

Cluster		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
KM-Marker	Mb	0,13	0,09	0,07	0,04	0,1	0,0	0,0	0,1		0,0	0,0	0,0	0,0	0,63	152,5	0,1	
	MyI3	0,10	0,10	0,07	0,03	0,1	0,0	0,1	0,1	1,56	0,0	0,0	0,0	0,0	0,43	4	0,1	0,19
	Tnni3	0,08	0,07	0,05	0,04	0,1	0,0	0,0	0,0	2,62	0,0	0,0	0,0	0,0	0,61	1	0,1	0,04
	Tnnt2	0,08	0,14	0,05	0,04	0,1	0,0	0,1	0,1	1,29	0,7	0,0	0,0	0,1	0,21	95,45	0,0	0,04
Ery-Marker	Alas2	0,03	0,02	0,02	0,01	0,0	0,0	0,0	0,0	0,25	0,0	0,0	0,0	0,0	2,28	0,00	0,0	0,07
	Gypa	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,44	0,00	0,0	0,00
	Hba-a1	0,71	1,02	0,78	0,08	0,2	1,1	0,2	1,6	21,3	2,9	0,5	0,3	0,6	231,3	0	0,0	0,0
	Hbb-bt	0,30	0,45	0,51	0,05	0,0	0,5	0,0	0,3	4	1,7	0,3	0,0	0,6	127,7	0	0,57	0,38
SMC-Marker	Acta2	0,50	0,24	0,17	0,12	0,2	0,8	2,2	2,4	1,73	0,7	2,9	0,3	0,6	1,87	1,06	0,2	110,0
	Vtn	0,01	0,00	0,00	0,03	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	1,13	0,00	0,0	0,00
	Tagln	0,72	0,29	0,27	0,26	0,4	0,4	1,2	1,2	1,49	1,2	4,3	0,0	0,8	2,41	0,44	0,5	96,25
	Myh11	0,01	0,01	0,01	0,07	0,0	0,0	0,1	0,0	0,12	0,0	0,0	0,0	0,3	0,11	0,00	0,0	39,36

8. Danksagung

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

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Jürgen Schrader, der mir erst die Möglichkeit gab, meine Dissertation in diesem spannenden Forschungsfeld und der tollen Arbeitsgruppe durchzuführen. Vielen Dank für die vielen fachlichen Diskussionen und der steten Bereitschaft, bei allen aufkommenden Fragen zu helfen und eine Lösung zu finden.

Auch Herrn Prof. Dr. Scheller möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Karl Köhler aus dem Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum und seinen Mitarbeitern Dr. Tobias Lautwein, Dr. Patrick Petzsch, Daniel Rickert und Dr. Thorsten Wachtmeister für die sehr hilfreiche und lehrreiche Kooperation.

Auch Prof. Dr. Bodo Levkau und Dr. rer. nat. Petra Keul aus dem Institut für Molekulare Medizin III möchte ich für die fruchtbare Kooperation danken.

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

Herzlich bedanken möchte ich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Kardiologie für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei allen fachlichen und praktischen Problemen. Besonders hervorheben möchte ich Dr. rer. nat. Julia Hesse, die stets ein offenes Ohr und eine gute Antwort auf all meine Fragen hatte. Zudem Danke ich Dr. med. Zhaoping Ding für die Durchführung aller Infarkt-Operationen und Bodo Steckel für seine Unterstützung im Labor.

Hervorheben möchte ich die Doktoranden Vera Flocke, Julia Steinhausen und Jasmin Bahr, die von Kollegen zu wahren Freunden wurden und meine Doktorandenzeit unvergesslich gemacht haben. Ich werde die gemeinsamen Kaffeepausen und unseren Spaß im Labor vermissen!

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie: Basti, Mama & Papa und Lena. Danke für die vielen Telefonate, spontanen Besuche und guten Worte zur Aufheiterung. Danke, dass ihr mich immer unterstützt.

Auch meinen Freunden Karo, Jenni, Caro und meiner Leidensgenossin Anne möchte ich dafür danken, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet und mich auch mal mit nicht-wissenschaftlichen Themen ablenken konntet.

9. Eidstattliche Erklärung

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

(Ort, Datum)

(Unterschrift, Ria Zalfen)