

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. habil. Gustav Steinhoff

Isolation, Charakterisierung und Differenzierungspotential von früh-postischämischen mesenchymalen intrakardialen Zellen im Kleintiermodell der Ratte

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von

Beyer, Martin | geb. am 31.05.1993 in Rostock

aus Rostock

Rostock | 08.06.2020

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003016

Doktorarbeit

Universitätsmedizin Rostock

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger

Gutachter/in:

- 1.) Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff (Universität Rostock)
- 2.) Prof. Dr. med. Markus Tiedge (Universität Rostock)
- 3.) Prof. Dr. med. Ingo Kutschka (Universität Göttingen)

Datum der Einreichung: 08.06.2020

Datum der Promotionsverteidigung: 31.03.2021

Teile dieses Forschungsprojektes wurden veröffentlicht:

Veröffentlichte Originalarbeiten:

1. Klopsch C, Skorska A, Ludwig M, Gaebel R, Lemcke H, Kleiner G, **Beyer M**, Vollmar B, David R, Steinhoff G. Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart. Eur Surg Res. 2017;58(5-6):341-353. doi: 10.1159/000480730. Epub 2017 Oct 26. PubMed PMID: 29073604.
2. Klopsch C, Skorska A, Ludwig M, Lemcke H, Maass G, Gaebel R, **Beyer M**, Lux C, Toelk A, Müller K, Maschmeier C, Rohde S, Mela P, Müller-Hilke B, Jockenhoevel S, Vollmar B, Jaster R, David R, Steinhoff G. Intramyocardial angiogenetic stem cells and epicardial erythropoietin save the acute ischemic heart. Dis Model Mech. 2018 Jun 22;11(6). pii: dmm033282. doi: 10.1242/dmm.033282. PubMed PMID: 29752300.
3. Klopsch C, Gaebel R, Lemcke H, **Beyer M**, Vasudevan P, Fang H, Quante M, Vollmar B, Skorska A, David R, Steinhoff G. Vimentin-Induced Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate in the Acute Ischemic Myocardium. Cells Tissues Organs. 2018;206(1-2):35-45. doi: 10.1159/000495527. Epub 2019 Jan 10

Abkürzungsverzeichnis

α-MEM	<i>α-Minimum essential Medium</i>
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ACS	<i>Acute coronary syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
Ca²⁺	Calcium ²⁺ Ion
CCR-2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	<i>Colony-forming unit fibroblast</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CPC	<i>Cardiac progenitor cells</i>
CSC	<i>Cardiac stem cells</i>
cTnT	<i>Cardiac Troponin-T</i>
Cx43	Connexin 43
d	Tag
DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR2	<i>Discoidin domain-containing receptor 2</i>
DMEM	<i>Dulbeccos's modified eagle medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
ECM2	<i>Extracellular matrix protein 2</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	<i>Endothelial cell growth medium-2</i>
EKG	Elektrokardiographie
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndMT	Endothelial-mesenchymale Transition

EPC	<i>Endothelial progenitor cells</i>
EPDC	<i>Epicardium / Epicardially derived cells</i>
EPO	Erythropoetin
ESC	<i>Embryonic stem cells</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FABP4	<i>Fatty acid-binding protein 4</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	<i>Fetale bovine serum</i>
FC	<i>Flow cytometry</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factors-2</i>
FKGO	Forschungsbereich kardialer Gewebe- und Organersatz
FSC-A	<i>Forward Scatter – Area</i>
FSC-W	<i>Forward Scatter – Width</i>
GATA4	<i>Transcription factor GATA-4</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HIF-1α	<i>Hypoxia inducible factor-1α</i>
HMGB1	<i>High-mobility-group-box1</i>
HOXA5	<i>Homeobox protein Hox-A5</i>
HOXB6	<i>Homeobox protein Hox-B6</i>
HPF	<i>High power field</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cells</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICR	Interkostalraum
ID1	<i>DNA-binding protein inhibitor ID-1</i>
IL	Interleukin
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
I/RC	<i>Ischemia reperfusion cardiomyopathy</i>

ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
ISL-1	<i>Insulin gene enhancer protein 1</i>
IST-Supplement	<i>Insulin-Transferrin-Selenium Supplement</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Kardiomyozyten
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant factor-1</i>
MET	Mesenchymal-epitheliale Transition
Mg²⁺	Magnesium ²⁺ Ion
MI	Myokardinfarkt
MNC	<i>Mononuclear cells</i>
miRNA	<i>Micro messenger ribonucleic acid</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cells</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NF IB	<i>Nuclear factor 1 B-type</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-κB</i>
Nkx2.5	<i>Homeobox protein Nkx-2.5</i>
NMRI	<i>Naval Medical Research Institute</i>
NYHA	<i>New York Heart Association Functional Classification</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCI	<i>Percutaneous coronary intervention</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PDGFRα	<i>Platelet derived growth factor receptor α</i>
PTCA	<i>Percutaneous transluminal coronary angioplasty</i>
p-Wert	Signifikanzwert
RBC	<i>Red blood cells</i>
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>

RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT	Raumtemperatur
SCA1	<i>Stem cell antigen 1</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SSC-A	<i>Sideways Scatter – Area</i>
StAbw	Standardabweichung
StF	Standardfehler
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
vs.	<i>versus</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
z.B.	zum Beispiel

Ferner gelten die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementensymbole.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	11
1.1	Der Myokardinfarkt.....	11
1.1.1	Definition	11
1.1.2	Inzidenz und Epidemiologie	11
1.1.3	Pathophysiologische Hintergründe	13
1.1.4	Therapieoptionen	13
1.2	Wundheilungsphasen nach Myokardinfarkt im Kleintiermodell	15
1.2.1	Entzündungsphase	15
1.2.2	Proliferationsphase	17
1.2.3	Reifungsphase	17
1.3	Zellbasierte Therapieansätze	18
1.3.1	Stammzellen für die Herzregeneration	18
1.3.1.1	Embryonale Stammzellen	19
1.3.1.2	Knochenmark abgeleitete adulte Stammzellen.....	20
1.3.1.3	Mesenchymale Stammzellen.....	20
1.3.1.4	Kardiale Progenitor- und Stammzellen	21
1.3.1.5	Induzierte pluripotente Stammzellen	22
1.4	Mesenchymale Stammzellen und ihre herzmedizinische Relevanz	23
1.4.1	Definition und Charakterisierung	23
1.4.2	Regeneratives Potential	25
1.5	Vorarbeiten	28
1.5.1	Identifikation intramyokardialer MSC-Nischen	28
1.5.2	Einfluss von Erythropoetin als kardioreaktiver Wachstumsfaktor	29
1.6	Ziele dieser Arbeit	31
2.	Material	32
2.1	Geräte	32
2.2	Software.....	33
2.3	Verbrauchsmaterialien	34
2.4	Standard- und Pufferlösungen.....	35
2.5	Medien	36
2.6	Operationsbesteck	37
2.7	Medikamente	38
2.8	Kits.....	38
2.9	Antikörper und Chemikalien	39

3.	Methoden.....	42
3.1	Tiere und Tierhaltung	42
3.2	Vorbereitung und Operation	42
3.2.1	Herzentnahme	44
3.3	Isolation und Kultivierung von kardialen mononukleären Zellen	44
3.4	Durchflusszytometrische Analyse von postischämischen MNCs	46
3.5	Sortierung und Kultivierung einer kardialen CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MNC-Subpopulation	48
3.6	CFU-F - Assay	49
3.7	Multipotente Differenzierung	50
3.7.1	Adipogene Differenzierung	51
3.7.2	Osteogene Differenzierung	52
3.7.3	Chondrogene Differenzierung	53
3.8	Kardiomyogene Differenzierung	54
3.9	Angiogenese-Tube-Formation-Assay	56
3.10	Statistische Analysen	57
4.	Ergebnisse	58
4.1	Standardisierte Isolation und Kultivierung früh-ischämischer kardialer MNCs	58
4.2	Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung.....	58
4.3	CFU-F Bildung	63
4.4	Multipotente Differenzierungskapazität.....	65
4.5	Kardiomyogene Differenzierung der kardialen CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSCs	68
4.6	Angiogenese durch CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSCs	70
5.	Diskussion	73
5.1	Isolation und Kultivierung kardialer früh-postischämischer MNCs	73
5.2	In der frühen Phase nach dem Myokardinfarkt proliferiert eine CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MNC-Subpopulation.....	74
5.3	CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MNC-Subpopulation weist Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen auf	77
5.3.1	CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MNC-Subpopulation bildet fibroblastenähnliche klonogene Vorläufer	78
5.3.2	CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MNC-Subpopulation zeigt eine multipotente Differenzierungskapazität.....	79
5.4	Kardiale CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSCs zeigen die Fähigkeit zur kardiomyogenen Differenzierung.....	79
5.4.1	EPO fördert die kardiomyogene Differenzierung der kardialen CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSC-Subpopulation	82

5.5	Kardiale CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSCs zeigen ein proangiogenes Potential	83
5.5.1	EPO fördert synergistisch das parakrine angiogene Potential der kardialen MSC-Subpopulation	85
5.6	Grenzen und Anmerkungen der Studie	86
5.7	Resümee und Ausblick.....	87
6.	Zusammenfassung	89
7.	Thesen	91
8.	Literaturverzeichnis.....	93
9.	Abbildungsverzeichnis	122
10.	Tabellenverzeichnis.....	124
11.	Anhänge	125
11.1	Danksagung.....	125
11.2	Eidesstattliche Versicherung	127
11.3	Curriculum vitae	128

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

1.1.1 Definition

Anfang des 20. Jahrhunderts wurden erste klinische Beschreibungen veröffentlicht, die den Zusammenhang zwischen der Thrombusbildung in einer Koronararterie und den zugehörigen klinischen Merkmalen verdeutlichten [1]. Im Laufe der Zeit wurde die Definition des Myokardinfarkts (MI) konstant weiterentwickelt. Erst zwischen 1950 und 1970 stellte die Weltgesundheitsorganisation (*engl.* WHO) eine auf der Elektrokardiographie (EKG) beruhende Definition vor, die für epidemiologische Vergleichbarkeit auch noch heute Anwendung findet [2]. Seit dem Jahr 2000 erarbeitet die *European Society of Cardiology* und das *American College of Cardiology* auf Grundlage biochemischer und klinischer Erkenntnisse stetig aktuelle Definitionen. Im Jahr 2018 wurde die „vierte Definition des Myokardinfarkts“ von der WHO offiziell angenommen. Diese besagt, dass eine Myokardschädigung, nachgewiesen durch abnorme Biomarker (kardiales Troponin-T über dem 99. Perzentil), im Umfeld einer Myokardischämie als MI zu bezeichnen ist [3]. Das als Biomarker bezeichnete kardiale Troponin-T (*engl.* cTnT) stellt einen Teil des Kontraktionsapparates der Kardiomyozyten dar, das bei einer Gewebeschädigung freigesetzt wird. cTnT wird ausschließlich im Myokardgewebe exprimiert. Aufgrund der hohen Sensitivität, kommen heute bevorzugt cTnT-Assays im klinischen Alltag zum Einsatz. Eine Myokardschädigung kann neben einer Ischämie auch eine Reihe von anderen Ursachen haben. Somit lassen erhöhte Werte an cTnT keine Aussage über den zugrundeliegenden Pathomechanismus zu. Für die Definition des MI ist deshalb der Nachweis einer Myokardschädigung auf Grundlage einer Ischämie zwingend erforderlich [3]. Dabei kann eine myokardiale Ischämie neben einer infarkttypischen Symptomatik, auch durch neu auftretende ischämische EKG-Veränderungen, sowie durch regionale Wandbewegungsstörungen oder Vitalitätsverlust in der Bildgebung nachgewiesen werden [3].

1.1.2 Inzidenz und Epidemiologie

Die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihren Folgen der chronisch ischämischen Herzerkrankung, dem Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz ist laut statistischen Bundesamt und WHO die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen [4, 5]. In Deutschland verursacht die KHK ca. 14% aller Todesfälle und ist mit einer Lebenszeitprävalenz von 9,3% für die 40-79jährigen eine der wichtigsten Volkskrankheiten (siehe Abb. 1.1) [6]. Die Erkrankungen des Herz- und Kreislaufsystems verursachen in ihrer Gesamtheit und vor allem aber im Alter zwischen dem 65.-85. Lebensjahr die höchsten Krankheitskosten im Gesundheitswesen [5].

Trotz konstanter oder sogar steigender Inzidenz der KHK zeigte sich in den letzten Jahren eine Reduktion der Mortalitätsrate an Herz- und Kreislauferkrankungen in einigen Industrieländern, einschließlich in Deutschland [7–11]. Hierbei kommt der Mortalitätsreduktion der KHK

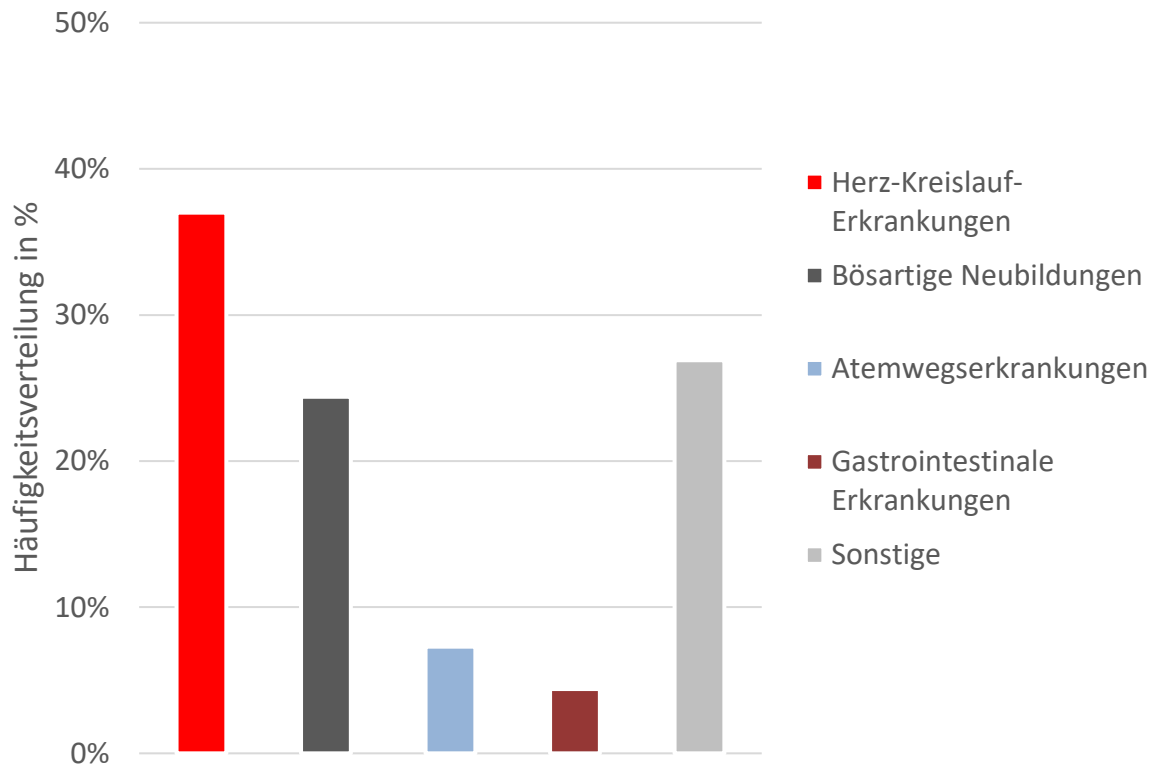


Abb. 1.1: Häufigste Todesursachen in Deutschland 2017. (in Anlehnung an das statistische Bundesamt; Destatis 2019 [5])

und insbesondere der des MI große Bedeutung zu [9, 10]. Die verbesserte Prävention, rasante Entwicklung der Diagnostik und vor allem die interventionellen und pharmakologischen Therapiemöglichkeiten in der Akutphase erklären diesen Rückgang [8, 9]. Außerdem führte die Etablierung der leitliniengerechten Behandlung des Bluthochdrucks und der Fettstoffwechselstörungen, als größte zu beeinflussende Risikofaktoren, zu einer erheblichen Verbesserung [12]. Trotz der therapeutischen Optionen, stieg jedoch das Risiko in den letzten Jahren an, nach einem MI eine ischämische Herzinsuffizienz zu entwickeln. Diese Tatsache erklärt sich unter anderem durch die sinkende Mortalität in der Akutphase des MI, was zu einem größeren Patientenkollektiv mit pathologischen linksventrikulärem Umbau (Remodeling) und daraus resultierender ischämischer Herzinsuffizienz führt [13–15]. Da es für diese einsetzende Herzschwäche nur wenig Behandlungsmöglichkeiten gibt, erleben viele Patienten eine deutliche Einschränkung ihrer Lebensqualität nach überstandenen MI [15]. Die steigende Anzahl an Patienten mit Herzinsuffizienz, führt vermehrt zu Krankenhauseinweisungen und -behandlungen. Allein in den USA verursacht die Therapie der Herzinsuffizienz jedes Jahr Gesundheitskosten von bis zu 40 Milliarden US-Dollar [16].

1.1.3 Pathophysiologische Hintergründe

Gemeinsam mit der instabilen *Angina pectoris* und dem plötzlichen Herztod wird der MI zur Arbeitsdiagnose des akuten Koronarsyndroms (*engl.* ACS) zusammengefasst. Anhand klinischer Kriterien kann nur schwer unterschieden werden, ob das ACS wirklich auf einen MI zurückzuführen ist. Wegen der potentiellen Lebensbedrohlichkeit ist eine schnelle und zielgerichtete Diagnostik notwendig [6, 17].

Pathomorphologisch spielen Gefäßveränderungen im Rahmen der Atherogenese eine entscheidende Rolle. Der MI beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen und ist vor allem mit den Risikofaktoren: genetische Prädisposition, Nikotinabusus, Dyslipoproteinämie und arterieller Hypertonus assoziiert [18]. Der über Jahre ablaufende Prozess der Atherosklerose führt zu einem konsekutiven Gefäßumbau mit Bildung einer atherosklerotischen Plaque. Diese kann durch mechanische Belastung im koronaren Stromgebiet rupturieren und ihren prokoagulatorischen Plaqueinhalt freisetzen. Durch Aktivierung der Gerinnungskaskade entsteht ein wandständiger Thrombus. Dieser kann mit seinem Durchmesser sowohl das Gefäßlumen vollständig okkludieren oder durch abgesprengtes Material, in Folge mechanischer Scherkräfte, eine periphere Embolie auslösen. Unabhängig von der Genese führt ein vollständiger Gefäßverschluss zu einer Minderperfusion im Stromgebiet des betroffenen Koronargefäßes [17, 19].

Die durch den Koronarverschluss akut einsetzende Unterversorgung des Herzmuskelgewebes führt innerhalb von wenigen Herzzyklen zu einem Kontraktionsverlust der ischämischen Kardiomyozyten. Bei vollständiger und andauernder Ischämie kommt es im betroffenen Myokardgewebe zur Nekrose der Kardiomyozyten, die serologisch unter anderem an einem Troponin-T Anstieg zu erkennen ist [18].

Die Größe des MI stellt ein wichtiges Prognosekriterium dar. Mit zunehmender Ausdehnung der Infarktgröße kommt es zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und Verlust an funktionellem Myokardgewebe mit nachfolgendem ventrikulärem Remodeling [11, 20]. Dies zeigt sich klinisch in einer linksventrikulären Dilatation, Herzhypertrophie, vermehrten Sphärizität und verschlechterten kardialen Pumpfunktion [21]. Neben dem infarzierten ist auch das verbliebene, gesunde Myokard davon betroffen. Diese kardialen Umbauprozesse hängen eng mit dem Auftreten von Arrhythmien, plötzlichem Herztod und der Entwicklung einer ischämischen Herzinsuffizienz zusammen [11, 20].

1.1.4 Therapieoptionen

Die *European Society of Cardiology* veröffentlichte 2017 eine aktualisierte Leitlinie mit Empfehlungen zur Behandlung des akuten transmuralen Myokardinfarkts [22]. Hierbei spielt vor allem die Reperfusionstherapie eine entscheidende Rolle. Nach initialer Thrombozytenaggregationshemmung und Antikoagulation stellt, je nach zeitlicher Verfügbarkeit eines Herzkatheterlabors, die perkutane Koronarintervention (*engl.* PCI) die Therapie der ersten Wahl dar.

Das verschlossene Koronargefäß wird dabei im Rahmen einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (*engl.* PTCA) wiedereröffnet. Anschließend wird in der Regel eine Gefäßstütze (Stent) in das betroffene Gefäß eingebracht, um einem erneuten Verschluss vorzubeugen [22, 23]. Bei einer, für die PCI, ungeeigneten Koronaranatomie oder einem Patienten im kardiogenen Schock, stellt die aortokoronare Bypass-Operation eine wichtige Therapiemöglichkeit dar [22, 24]. Durch die in vielen Industrieländern flächendeckende Etablierung von Diagnostik- und Therapieeinheiten (*engl.* Chest Pain Units), konnte in den letzten Jahren ein Rückgang der MI-Mortalität verzeichnet werden [25]. Durch eine Zunahme an Patienten mit KHK und ACS, zeigt sich jedoch eine erhöhte Inzidenz an ischämischer Herzinsuffizienz. Felker *et al.* zeigten, dass eine ischämische Ätiologie der Herzinsuffizienz, im Vergleich zu einer nicht-ischämischen, mit einem kürzeren Überleben verbunden ist [26]. Allerdings führte die Etablierung intensiver medikamentöser und interventioneller Maßnahmen in den letzten Jahren zu einer signifikanten Verbesserung der Morbidität und Mortalität. Trotzdem stellen diese keine kausalen Therapieansätze dar und können somit nur zu einer Symptomlinderung, Verbesserung der Lebensqualität und zeitlich begrenzter Lebensverlängerung führen [27, 28]. Im Endstadium der Herzinsuffizienz können mechanische Herzunterstützungssysteme eine angemessen hämodynamische Stabilisierung ermöglichen, um das Überleben bis zur Herztransplantation zu fördern [29]. Die Transplantation stellt heute die einzig kausale Therapieoption einer terminalen Herzinsuffizienz dar [30]. Trotz sehr guter wissenschaftlicher Erkenntnisse und Ergebnisse auf dem Gebiet der Herztransplantation begrenzt der Mangel an Spenderorganen diese Therapie. Die Anzahl an Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz steigt kontinuierlich, während sich die Anzahl an Spenderherzen in den letzten Jahren konstant bis leicht rückläufig zeigte [31, 32]. Die sozioökonomische Belastung des MI und seiner Folgen machen deutlich, dass es auch in Zukunft intensiver Forschung und Erprobung neuer Therapien benötigt. So werden beispielsweise intensiv die Optimierungen der Heilungsphasen nach einem MI untersucht. Da die Entzündungsphase, über einen fibrotischen Umbau, das pathologische Remodeling begünstigt, stellt die Aufklärung von Signalkaskaden und beteiligten Zelltypen einen wichtigen Schritt zur Entwicklung neuer Therapien dar [33]. So zeigten Cheng und Rong beispielsweise, dass durch die pharmakologische Regulation der Makrophagenpolarisation die Entzündungsaktivität gesenkt, die Wundheilung verstärkt und der fibrotische Umbau vermindert werden kann [34]. Andere Studien beschäftigten sich mit der funktionellen Verbesserung mesenchymaler Stammzellen, um deren großes regeneratives Potential nach MI weiter zu optimieren [35].

1.2 Wundheilungsphasen nach Myokardinfarkt im Kleintiermodell

Amphibien und bestimmte Fische, wie beispielsweise der Molch und der Zebrafisch, sind lebenslang nach einer Myokardschädigung in der Lage, eine vollständige Regeneration des verletzten Myokards durchzuführen [36, 37]. Im Gegensatz dazu besitzt das postnatale Herz von Säugetieren nur für kurze Zeit ein regeneratives Potential. Porrello *et al.* [38] zeigten, dass in unmittelbar postnatal untersuchten Mäuseherzen, nach chirurgischer Apexresektion, eine regenerative Reaktion mit Kardiomyozytenproliferation erfolgte. Dieses regenerative Potential geht jedoch innerhalb der ersten Lebenswoche verloren, da postnatale Kardiomyozyten langfristig nicht mehr imstande sind, in den Zellzyklus einzutreten und somit nicht proliferieren können [38]. Die begrenzte Mitosekapazität schränkt die kardiale Regeneration ein und führt im Rahmen der Wundheilungsphase dazu, dass untergegangene Kardiomyozyten im Säugetierherz durch eine permanente kollagene Narbe ersetzt werden [39].

1.2.1 Entzündungsphase

Ende der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts zeigten Mallory *et al.* [40], dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer Entzündungsreaktion kommt, die durch eine Leukozyten-Rekrutierung gekennzeichnet ist. Frangogiannis *et al.* wiesen 2012 darauf hin, dass die geordnete Koordination dieser Entzündung eine Grundvoraussetzung für die Herzreparatur darstellt, da ein übermäßig früherer Beginn, durch den verstärkten Matrixabbau, zu einem Einriss der Herzwand führen könnte [13]. Eine Verlängerung kann hingegen die Kollagenablagerungen beeinträchtigen und damit zu einer verringerten Zugfestigkeit der Narbe führen, was die Dilatation des Ventrikels fördern würde. Die unregulierte Expression proinflammatorischer Zytokine könnte einen weiteren Verlust an Kardiomyozyten und eine Beteiligung nicht infarzierter Myokardbereiche nachsichziehen. Dies würde zu einer verstärkten Fibrose mit Verschlechterung der Herzfunktion führen [13].

Durch die anhaltende Hypoxie infolge des MI kommt es im akut ischämischen Myokardgewebe zu einem Verlust von Kardiomyozyten und anderen benachbarten Zellen [39]. Dieser Untergang wird hauptsächlich durch Nekrose, aber auch durch Apoptose und Autophagie ausgelöst. Durch den Zelltod und die Schädigung der extrazellulären Matrix (EZM) kommt es zur Freisetzung von „*damage-associated molecular pattern*“ (*engl.* DAMPs) [15]. Diese endogenen Gefahrenmoleküle führen über die Bindung an Mustererkennungsrezeptoren zur Rekrutierung zirkulierender Immunzellen. Zu den wichtigsten DAMPs gehören HMGB1 [41], Protein S-100 [42], Fibronectin-Extra-Domäne A [43], Interleukin-1 α [44], Hitzeschockproteine [45], ATP [46], Harnsäure [46], mitochondriale DNA und RNA [15, 43]. Nach Bindung der DAMPs sind Mustererkennungsrezeptoren, in Form von *Toll-like-Rezeptoren* (*engl.* TLR), in der Lage, verschiedene Kinasen zu aktivieren und den spezifischen Transkriptionsfaktor NF- κ B zu induzieren

[21]. Dieser bewirkt die Transkription verschiedener Adhäsionsmoleküle und Zytokine, die eine wichtige Rolle in der Regulation des Immunsystems spielen [21, 47].

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die in das infarzierte Myokard infiltrieren. Adhäsionsmoleküle, in Form von Selektinen, fördern die Anlagerung an aktivierte Endothelzellen. Dabei kann man zwischen L-Selektin (CD62L), E-Selektin (CD62E) und P-Selektin (CD62P) unterscheiden, die für einen Gewebeeintritt der Leukozyten wichtig sind [21]. Neutrophile Granulozyten werden durch langsames Rollen auf der Endotheloberfläche durch Chemokine erkannt und aktiviert. Die aktivierten Neutrophilen exprimieren β 2-Integrin, das an intrazelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 bindet. Anschließend transmigrieren die Zellen in den Infarktbereich [21, 48]. Dort fördern sie über Phagozytose von Zelltrümmern, Freisetzung proteolytischer Enzyme und Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (*engl.* ROS) die Entzündungsreaktion [15]. Horckmans *et al.* zeigten, dass neutrophile Granulozyten zentrale Modulatoren der Infarktheilung sind [49]. Sie sind in der Lage, Makrophagen in Richtung eines reparativen Phänotyps zu polarisieren. Die zielgerichtet ablaufende Neutrophilen-Reaktion stellt somit eine Voraussetzung für eine regulierte Fibrose, Narbenbildung und günstigen Herzumbau dar [49].

Nach etwa 24 Stunden beginnt die Rekrutierung von Monozyten in das Infarktgebiet. Leuschner *et al.* legten dar, dass Monozyten neben einer verstärkten Mobilisierung aus dem Knochenmark [50], auch aus extramedullären Geweben wie der Milz verstärkt rekrutiert werden. Sie wiesen darauf hin, dass die Milz dabei als Monozytenreservoir fungiert, die die extramedulläre Monozytopoese aufrechterhalten kann [50]. Die Rekrutierung wird hauptsächlich durch CC-Chemokine, vor allem über die Achse des Monozyten-Chemoattraktionsproteins-1 (*engl.* MCP-1) / Chemokinrezeptor Typ-2 (*engl.* CCR-2) vermittelt. Diese Achse zeigt ein hohes chemoattraktives Wirkungspotential auf Monozyten und Makrophagen [12]. Frangogiannis *et al.* berichteten weiterhin über eine entscheidende Beteiligung von MCP-1 in der Zytokinsynthese und Anreicherung von Myofibroblasten im Infarktbereich [18]. Außerdem fördert MCP-1 die Bildung von Granulationsgewebe [21, 78]. Die einströmenden Monozyten differenzieren im Gewebe zu Makrophagen [15]. Gemeinsam mit neutrophilen Granulozyten befreien sie das Infarktgewebe von toten Zellen und extrazellulären Matrixtrümmern und führen dadurch zur Bildung von Granulationsgewebe (Tag 4-7) [43, 51].

Die Entzündungskaskade bietet wegen ihrer bedeutenden Rolle im Heilungsverlauf wichtige therapeutische Möglichkeiten, um den Kardiomyozytenverlust und das pathologische Remodeling nach MI zu optimieren [21]. So konnten Majmudar *et al.* im Mausmodell zeigen, dass eine verminderte Rekrutierung von Monozyten, durch Stummschaltung von CCR-2, zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und eingedämmten pathologischen Remodeling nach MI führte [52].

1.2.2 Proliferationsphase

Die rekrutierten Leukozyten spielen in der Proliferationsphase eine entscheidende Rolle. Durch rechtzeitige Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokinfreisetzung kommt es zur Abnahme von Entzündungszellen im Infarktbereich [15, 21]. Eingewanderte Neutrophile werden apoptotisch und anschließend durch Makrophagen phagozytiert [15]. Das *inter alia* durch entzündungshemmende Mediatoren (z.B. IL-10 und TGF- β) veränderte Milieu, führt über eine Polarisation der Makrophagen zu einem Phänotypenwechsel [15, 53, 54]. Die entstehenden anti-inflammatorischen Makrophagen (\triangleq M2-Makrophagen) sind nicht in der Lage selbstständig EZM zu produzieren. Doch durch ihre engen Verbindungen im Myokard zählen sie zu den wichtigsten Koordinatoren der Umbauprozesse innerhalb der EZM nach einem MI [15, 55].

Zu Beginn der Proliferationsphase sezernieren mononukleäre Zellen (*engl.* MNC) und Makrophagen Wachstumsfaktoren, die zu einer Aktivierung mesenchymaler Reparatormechanismen, vorwiegend in Form von Myofibroblasten und Endothelzellen führen [48]. Die Herkunft der aktivierten kardialen Myofibroblasten ist vielfältig. Residente kardiale Fibroblasten und hämatopoetische Progenitorzellen aus dem Knochenmark stellen einen großen Teil der Zellquelle dar. Sie können aber auch über die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) aus Epikardzellen und über die endothelial-mesenchymale Transition (EndMT) aus Endothelzellen entstehen [56].

Myofibroblasten bilden große Mengen an extrazellulären Matrixproteinen, einschließlich Kollagen, Fibrin und Fibronektin, die durch Integritätserhalt der Ventrikel eine Wandruptur verhindern und die Migration weiterer Myofibroblasten fördern [15, 39]. Weiterhin produzieren sie entzündungshemmende sowie proangiogene Faktoren und fördern dadurch die Bildung von Granulationsgewebe [15].

Bereits ab dem 3. Tag nach Ligatur der linken Koronararterie wurden im Rattenherz eine Anreicherung von Kollagen III sowie die Bildung mikrovaskulärer Strukturen im Granulationsgewebe nachgewiesen [11]. Über dieses vaskuläre Netzwerk werden die Myofibroblasten während der Reparatur mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt [39].

1.2.3 Reifungsphase

Nach der Ausbildung einer kollagenbasierten Narbe im Bereich des Infarkts, kommt es während der Reifungsphase (ab 21. Tag) zu einem apoptotischen Abbau der Myofibroblasten und Endothelzellen im vernarbten Bereich. Das temporär angelegte Mikrogefäßsystem löst sich nachfolgend auf [39, 48, 57]. Im Bereich der hypozellulären Infarktnarbe, kommt es innerhalb der nächsten Wochen zu einem Reifungsprozess, bei dem unter anderem Kollagen III durch Kollagen I ersetzt wird. Dies führt im Verlauf, durch Vernetzung von EZM-Bestandteilen, zu einer verbesserten Zug- und Kontraktionsfähigkeit der Narbe [11, 39].

Experimentelle Infarktmodelle bei Ratten zeigten einen Heilungsverlauf innerhalb von 3-4 Wochen. Im Gegensatz dazu dauert eine vollständige Narbenbildung beim Menschen etwa 8 Wochen [51, 58]. Es zeigte sich, dass die Infarktheilungsrate vom Verhältnis der Oberfläche zum Volumen abhängig ist. Mit zunehmender Infarktgröße nimmt das Verhältnis ab. Demzufolge zeigen größere Infarkte (Mensch) einen langsameren Heilungsverlauf als kleinere Infarkte (Maus, Ratte) [51]. Auch eine schnelle Reperfusion führte, durch eine früh einsetzende Entzündungsreaktion mit Bildung von Granulationsgewebe zu einer schnelleren Infarktheilung [21].

Neben der Narbenreifung, kann sich im Rahmen des pathologischen linksventrikulären Remodelings nach MI eine ischämische Herzschwäche ausbilden. Dies wird vor allem durch entzündliche und fibrotische Prozesse in entfernten bzw. nicht infarzierten Myokardarealen unterstützt [15].

1.3 Zellbasierte Therapieansätze

Die eingeschränkten kausalen Behandlungsmöglichkeiten der ischämischen Herzerkrankung und ihrer Folgen führten dazu, dass in den letzten zwei Jahrzehnten das Gebiet der kardialen regenerativen Medizin in den Mittelpunkt neuer Therapiestrategien rückte [59]. Lange Zeit galt die Annahme, dass Kardiomyozyten postnataler Säugetierherzen terminal differenziert seien [60, 61]. Beltrami *et al.* zeigten jedoch, dass auch das Herz Stammzellen enthält, die die Regeneration unterstützen [62]. Weitere Studien verwiesen auf eine Wachstumsreserve im menschlichen Herzen, die sowohl zur Regeneration von Kardiomyozyten, als auch anderen Zelltypen führt [63, 64]. Die Effizienz der Neubildung reicht jedoch nicht aus, das untergegangene Myokard nach einem MI zu ersetzen [65]. Diese neuen Erkenntnisse führten zu rasanten Entwicklungen von Forschungsprojekten auf dem Gebiet der Stammzellbiologie, mit dem Ziel verletztes und fibrotisches Herzgewebe zu ersetzen [66]. Diese vielversprechenden Ansätze führten zu klinischen Translationen bei denen unter anderem verschiedene Stammzelltypen in den Menschen transplantiert wurden. Die Ergebnisse klinischer Studien waren jedoch teils widersprüchlich und zeigten nur eine begrenzte Optimierung der Herzleistung und des Remodelings nach MI. Ein Verständnis grundlegender Mechanismen auf dem Gebiet der Stammzelltherapie ist eine Voraussetzung, um das vorhandene Potential stärker auszuschöpfen [67].

1.3.1 Stammzellen für die Herzregeneration

Stammzellen stellen undifferenzierte Zellen dar, die die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen. Sie können klonal aus einer einzelnen Zelle hervorgehen und in verschiedene Zellarten und Gewebearten differenzieren. Je nach Quelle zeigen die Zellen Unterschiede in ihrer Differenzierungsfähigkeit. So zeigen embryonale Stammzellen (*engl.* ESCs) einen pluripotenten

Charakter und können in Zellen und Gewebe aller drei Keimblätter (Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) differenzieren. Zu den multipotenten Stammzellen zählen unter anderem mesenchymale Stammzellen (*engl.* MSCs). Sie können entlang der mesodermalen Keimblattlinie differenzieren. Residente Stammzellen können dagegen nur terminal differenzierte Zellen eines bestimmten Gewebes bilden und werden daher als oligopotent bezeichnet [68]. Aus dem Herzen konnten beispielsweise c-KIT⁺ (CD117) kardial residente Stammzellen isoliert werden [69]. Diese Zellen konnten in die drei Hauptzellpopulationen, nämlich funktionelle Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen, differenziert werden [69].

Seit Beginn der Forschung auf dem Gebiet der kardialen regenerativen Medizin, wurden eine Reihe von verschiedenen Stammzelltypen isoliert, charakterisiert und auf ihr Regenerationspotential untersucht [67]. Ihre Wirkung entfalten sie unter anderem durch parakrine Effekte auf residente Zellen, wodurch sie das Überleben, die Entzündung, die Angiogenese, die Reparatur und die Regeneration beeinflussen können [70].

1.3.1.1 Embryonale Stammzellen

Thomson *et al.* beschrieben ESCs als von Blastozysten abgeleitete Stammzellen mit einem pluripotenten Charakter [71]. Sie stellen, durch ihre Möglichkeit in Kardiomyozyten zu differenzieren, eine geeignete Zellquelle mit kardialer Regenerationsfähigkeit dar. Es wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl an Differenzierungsprotokollen etabliert, die unter anderem auch eine Differenzierung in kardiomyozytäre Subtypen vornahmen. Hierbei ist besonders der ventrikuläre Phänotyp von großem Interesse für die regenerative Medizin [72]. Mehrere präklinische Studien zeigten gute Transplantationsergebnisse von ESC-abgeleiteten Kardiomyozyten. Sie zeigten nach Transplantation eine elektromechanische Integration, Verbesserung der Herzfunktion und Eindämmung des pathologischen Remodelings [67, 73–76]. Eine Translation erfolgte im Rahmen einer klinischen Phase-I-Studie (ESCORT, NCT02057900), bei der ESC-abgeleitete kardiale Progenitorzellen, eingebettet in ein Fibrinpfaster, während einer aortokoronaren Bypass-Operation auf das Epikard abgegeben wurden. Eingeschlossen wurden 6 Patienten mit einer schweren linksventrikulären Dysfunktion (mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) von 26%). Die Patienten zeigten in der Nachuntersuchung kein Tumorstadium und keine Arrhythmien, wodurch sich die kurz- und mittelfristige Sicherheit der Methode nachweisen ließ [77]. Eine Verbesserung der Symptomatik von NYHA III auf NYHA I, sowie eine Steigerung der LVEF um bis zu 10% konnte in Einzelanalysen nachgewiesen werden [78]. Diese Ergebnisse verdeutlichen das große Potential der ESCs in der regenerativen Medizin. Eine weitere klinische Translation wird jedoch durch zahlreiche Risiken weiter behindert.

Immunabstoßung durch Alloimmunisierung, genetische Instabilität und onkogenes Potential stellen dabei die aktuell wichtigsten wissenschaftlichen Herausforderungen dar [67]. Diese

müssen auch in Zukunft eng mit ethischen und politischen Fragen diskutiert werden, um die Forschung auf diesem Gebiet angemessen voranzubringen [79].

1.3.1.2 Knochenmark abgeleitete adulte Stammzellen

Im Knochenmark befindet sich eine Vielzahl an reifen- und unreifen Zellsubpopulationen. Bittner *et al.* zeigten an dystrophischen Mäusen, dass es nach einer Knochenmarktransplantation zu einer Rekrutierung von Zellpopulationen in den geschädigten Bereich kam. Dagegen konnte in einer parallel untersuchten Kontrollgruppe keine Rekrutierung beobachtet werden [80]. Die Gruppe um Orlic *et al.* injizierte in der „frühen Phase“ nach dem MI die aus dem Knochenmark isolierten mononukleären Zellen (*engl.* MNCs) in das angrenzende Infarktareal transgener Mäuse und konnten in der Analyse *de-novo* erzeugtes Myokard nachweisen [81]. Diese präklinischen Ergebnisse führten zu einer verstärkten klinischen Translation. Die isolierten MNCs enthielten unter anderem hämatopoetische (*engl.* HSCs)- und endotheliale Progenitorzellen (*engl.* EPCs), sowie mesenchymale Stammzellen (*engl.* MSCs) [82]. Studien mit intrakoronarer oder intramyokardialer Applikationen solcher Zellen zeigten jedoch inkonsistente Ergebnisse, die auch von Metaanalysen bestätigt wurden [83–88].

In klinischen Studien wurden beispielsweise aus dem Knochenmark isolierte hämatopoetische und endotheliale Progenitorzellen wie CD133⁺-Stammzellen im Rahmen einer aortokoronaren Bypass-Operation in das menschliche Herz injiziert. Eine kurzzeitig verbesserte Herzfunktion und Myokardperfusion [89, 90], konnten sich jedoch nicht mit den Langzeit-*Follow-up* Daten decken [91, 92]. In der von Steinhoff *et al.* initiierten klinischen Phase-III-Studie (PERFECT, NCT00950274) zeigte sich eine Verkleinerung der Infarktnarbe und eine verbesserte Myokardperfusion [93]. Mittels systemmedizinischer Analysen konnten relevante Einflussfaktoren für Responder nach CD133⁺-Stammzell-Therapie erarbeitet werden. Im Blut zirkulierende Stammzellpopulationen nach Mobilisation aus dem Knochenmark sowie die Spiegel verschiedener Wachstumsfaktoren und Chemokine waren hierbei von entscheidender Bedeutung, um eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion zu erreichen [93].

1.3.1.3 Mesenchymale Stammzellen

Im Jahr 2017 zeigten Kanelidis *et al.* in einer Metaanalyse präklinischer Studien, dass eine MSC-Therapie in Tiermodellen sowohl nach akutem MI, als auch bei ischämischer Kardiomyopathie die Herzfunktion verbesserte. Dabei wiesen Sie auch auf eine Überlegenheit der transendokardialen Stammzellinjektion im Vergleich zur intramyokardialen, intravenösen und intrakoronaren Infusion hin [94]. Eine Verringerung der Fibrose, Neovaskularisation und Neomyogenese scheinen dabei die drei dominanten Mechanismen der MSC-induzierten Herzreparatur darzustellen [95]. Im Rahmen der klinischen PROMETHEUS-Studie (NCT00587990) wurden

autologe MSCs während einer aortokoronaren Bypass-Operation intramyokardial in akinetische / hypokinetische Bereiche injiziert. Nach 18 Monaten zeigten die Patienten eine verringerte Narbengröße, eine verbesserte Gewebepерfusion, sowie eine Verbesserung der linksventrikulären Herzfunktion [95]. Weitere klinische Studien wiesen jedoch eine Diskrepanz der Ergebnisse auf und zeigten keine signifikanten Vorteile der MSC-Therapie im Vergleich zu Kontrollgruppen [96–98].

Die hochwertig durchgeführten klinischen Studien deuten auf eine sichere Anwendung der MSC-Therapie beim Menschen, sowie einen teilweise signifikant verzeichneten Therapieerfolg hin. Dennoch bleiben viele Fragen bislang unbeantwortet, so dass es in Zukunft wichtig sein wird, die Biologie und Reparationsmechanismen der verschiedenen MSC-Arten weiter zu optimieren. Dabei spielt vor allem das Verständnis der synergistischen Wirkweisen zwischen Stammzellen und anderen sowohl endogenen als auch exogenen Zelltypen eine wichtige Rolle [99]. Im Rahmen aller aufgeführten Stammzellarten sprechen Studien dafür, dass Patientenmerkmale wie beispielsweise Komorbiditäten, Medikation und kardiovaskuläre Risikofaktoren die Anwendung deutlich beeinflussen können [67, 100, 101]. So plädieren Becher *et al.* für die Implementierung personalisierter Stammzell-Therapiestrategien auf Grundlage individueller Patientenmerkmale [101].

1.3.1.4 Kardiale Progenitor- und Stammzellen

Seit dem Nachweis, dass im adulten Herzen ein begrenzter Kardiomyozytenumsatz stattfindet, wurden verschiedene Populationen an kardialen Progenitor- (*engl.* CPCs) und kardialen Stammzellen (*engl.* CSCs) beschrieben [63, 64, 66]. Dazu zählen vor allem Insulin-Gen-Enhancer-Protein-1⁺- (*engl.* ISL-1⁺), Epikard abgeleitete Zellen- (*engl.* EPDCs), c-KIT⁺- (CD117) Zellen, Stammzell-Antigen-1⁺- (*engl.* SCA1⁺) und Thrombozyten-abgeleiteter-Wachstumsfaktorrezeptor- α^+ - (*engl.* PDGFR α^+) Zellen [102–106].

Kardiale c-KIT⁺-Zellen zeigten teilweise eine Expression kardialer Transkriptionsfaktoren (NKX2.5, GATA 4 und MEF2C) und wiesen die Fähigkeit zur Differenzierung in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen auf [62]. Bolli *et al.* zeigten im MI-Schweinemodell, dass nach intrakoronarer Infusion von c-KIT⁺-Zellen die Herzfunktion verbessert und die Angiogenese gefördert werden konnte [107]. Die Gruppe um Zwetsloot *et al.* führte eine systemische Analyse von 80 MI-Tierstudien durch, um die Gesamtwirkung von CSCs in präklinischen Studien zu ermitteln. Dabei zeigte sich nach CSC-Behandlung eine Steigerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) um ~11% im Vergleich zur Kontrollgruppe [108].

Die guten Ergebnisse führten 2011 zu einer ersten klinischen Phase-I-Studie (SCIPIO, NCT00474461). Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie erhielten im Rahmen einer aortokoronaren Bypass-Operation, eine intrakoronare Infusion von KIT⁺-CSCs. Unerwünschte Ereignisse blieben aus und Kontrollen mittels Magnetresonanztomographie zeigten 4 und 12

Monate nach der Infusion eine Verbesserung der Herzfunktion mit Abnahme des Infarktareals [109]. Eine weitere randomisierte kontrollierte klinische Phase-II-Studie (PERSEUS, NCT01829750) zeigte bei Patienten mit univentrikulärer Herzerkrankung, nach intrakoronärer CPC-Infusion, eine verbesserte Herzfunktion und einen positiven Einfluss auf das pathologische Remodeling nach MI, im Vergleich zur Kontrollgruppe [110]. Vorteile, die für CSCs sprechen sind vor allem die autologe Transplantationsfähigkeit, die in klinischen Studien nachgewiesene Sicherheit und das geringe Potential zur Tumorbildung. Auf der anderen Seite ist eine Zellgewinnung nur durch eine invasive Myokardbiopsie möglich, außerdem besteht bislang eine unzureichende Zellcharakterisierung und teils widersprüchliche Ergebnisse bezüglich ihres kardiovaskulären Differenzierungspotentials [67].

1.3.1.5 Induzierte pluripotente Stammzellen

Yamanaka *et al.* beschrieben in 2007 die Erzeugung von humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (*engl.* iPSCs) aus somatischen Zellen durch die retrovirale Einführung der vier definierten Transkriptionsfaktoren: Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc [111]. iPSCs zeigen die Eigenschaft zur Selbsterneuerung und können sich in unterschiedliche Gewebe- und Zellarten differenzieren, einschließlich Kardiomyozyten [112]. Sie bieten die Möglichkeit Prinzipien der Kardiogenese auf die regenerative Medizin anzuwenden und so Physiologie und Krankheiten auf zellulärer Ebene weiter zu untersuchen [112, 113]. Präklinische Studien deuten darauf hin, dass aus iPSCs differenzierte Kardiomyozyten, sich positiv auf die Herzfunktion und das pathologische Remodeling auswirken können [114–118]. Neuartige Methoden wie beispielsweise das „*Next-Generations-Sequenzierung*“ ermöglichten jedoch den Nachweis von genomischen Instabilitäten in iPSC-Linien. Diese könnten auf eine bereits vorhandene Instabilität in den adulten Ursprungszellen oder durch Prozesse bei der Reprogrammierung zurückzuführen sein [67]. Es wurde gezeigt, dass genomische Instabilitäten und Mutationen in jedem Stadium auftreten können. Dieses potentielle onkogene Potential stellt eine große Herausforderung dar [119]. So bedarf es in Zukunft weiterer Verbesserung, um eine sichere klinische Translation zu gewährleisten.

1.4 Mesenchymale Stammzellen und ihre herzmedizinische Relevanz

1.4.1 Definition und Charakterisierung

Mesenchymale Stammzellen (*engl.* MSCs) erfreuen sich aufgrund ihrer residenten, multipotenten und regenerativen Eigenschaften seit über zwei Jahrzehnten großer Beachtung in der biomedizinischen Forschung und stellen unter anderem einen vielversprechenden Therapieansatz des MI und seiner begleitenden Folgen dar. In der Literatur wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Oberflächenmarkern zur Identifizierung und Isolierung von MSCs beschrieben. Eine Isolation aus vielen Geweben und Organen einschließlich Knochenmark, Fettgewebe, Plazenta, Nabelschnur, Herz und peripheren Blut wurde gezeigt [99, 106, 120, 121]. Friedenstein *et al.* konnten um 1970 erstmals eine Untergruppe spindelförmiger, klonogener Progenitorzellen aus dem Knochenmark des Menschen isolieren, die nicht zu den hämatopoetischen Stammzellen zählten [122]. Da diese Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung zeigten, bezeichnete Caplan sie einige Jahre später als mesenchymale Stammzellen [123]. Über die Jahre wurden weitere Veränderungen der Nomenklatur vorgeschlagen und unterschiedliche Begriffe geprägt. So wurden MSCs [123] unter anderem als stromale Stammzellen [124], mesenchymale Progenitorzellen [125], skelletale Stammzellen [126] oder medizinische Stammzellen [127] bezeichnet. Die internationale Gesellschaft für Zelltherapie (*engl.* ISCT) veröffentlichte 2006 definierende Kriterien für humane MSCs (siehe Abb. 1.2). Danach sind MSCs multipotente Zellen, die auf Kunststoffoberflächen adhärieren, eine fibroblastenähnliche Morphologie aufweisen, bestimmte Oberflächenantigene exprimieren und in Chondrozyten, Adipozyten und Osteozyten differenzieren [128].

Humane MSC-Kriterien der ISCT

- Adhärenz auf Kunststoffoberflächen
- $\geq 95\%$ der MSC-Population müssen CD73, CD90 und CD105 exprimieren
- $\leq 2\%$ der MSC-Population dürfen CD34, CD45, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA II exprimieren
- Multipotentes Differenzierungspotential

Abb. 1.2: Humane MSC-Kriterien. (nach Dominici *et al.* [128])

Die Kriterien der ISCT führten zu einer einheitlichen Charakterisierung von isolierten MSCs *in vitro* und einer Vergleichbarkeit zwischen den Laboren [128]. Die Definition lieferte weiterhin wichtige Grundlagen, auf deren Basis die Homogenität der isolierten MSCs in Kultur weiter vorangebracht werden konnte. Auch wenn damals schon erkannt wurde, dass die Kriterien mit einer gewissen Flexibilität anzuwenden sind [128].

So wurde interessanterweise gezeigt, dass MSCs, die aus Fettgewebe isoliert wurden, für eine gewisse Zeit eine Expression von CD34 zeigen, der laut ISCT-Definition als Ausschlussmarker dient [129, 130]. Durch die weitere Berücksichtigung von negativen Expressionsmarkern sollte eine noch bessere Abgrenzbarkeit der isolierten Zellpopulation von hämatopoetischen Zellen ermöglicht werden [128]. Seither sind viele Marker dazugekommen, die das MSC-*Pannel* beim Menschen vergrößerten [131].

In präklinischen Tierexperimenten zeigten sich hingegen keine festgelegten Kriterien für die Identifizierung von tierischen MSCs. Die isolierten Zellen erwiesen zwar ebenfalls die Fähigkeit auf Kunststoffoberflächen zu adhären und entlang der mesodermalen Linie zu differenzieren, zeigten aber Unterschiede im Antigen-Expressionsprofil zwischen den verschiedenen Spezies [132]. Da sich diese Arbeit mit der Charakterisierung von kardialen MSCs im Nagetiermodell beschäftigt, wird nachfolgend auf das MSC-Antigen-Expressionsprofil dieser Spezies eingegangen. Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1.1) gibt einen Überblick über die unterschiedlichen MSC-Oberflächenmarker von Nagetieren, unterschieden nach Zellquellen:

Tabelle 1.1: Oberflächenmarker-Expressionsprofil von Nagetier-MSCs

Gewebequelle	Positive Marker	Negative Marker
Fettgewebe [133]	CD44 CD90 SCA1	CD34 CD45 CD31
Knochenmark [134, 135]	CD29 CD44 CD90 CD105 SCA1	CD34 CD45
Synovia [136]	CD29 CD44 SCA1 (30% positiv)	CD34 CD45 CD106 CD140a

Durch das vielseitige Expressionsprofil mesenchymaler Oberflächenmarker spielen indirekte Nachweismethoden eine wichtige Rolle. Neben der Adhärenz auf Kunststoffoberflächen und der multipotenten Differenzierbarkeit ist auch das Verhalten und die Expansion in der Zellkultur ein wichtiger indirekter Identifikationsmarker von MSCs. Durch ihre Selbsterneuerungskapazität sind sie typischerweise nach Aussaat in der Lage, aus einzelnen Zellen klonogene fibroblastenähnliche Zellen (*engl.* CFU-F) zu bilden. Dabei spielt die Dichte der ausgesäten Zellen keine Rolle, was bedeutet, dass die Bildung selbst bei niedrig ausgesäten Zelldichten möglich ist [137]. Es wurde jedoch gezeigt, dass für die Ausprägung der CFU-F Bildung die Dichte an proliferativen Progenitorzellen in der ausgesäten Population entscheidend ist [138]. So konnten Ganguly *et al.* nachweisen, dass eine altersbedingte Veränderung humaner Knochenmark-MSCs zu einer Verringerung ihrer proliferativen Kapazität führte, was die Gruppe auf den Verlust von proliferativen Progenitorzellen zurückführte [138].

1.4.2 Regeneratives Potential

Die etablierte Isolation und sichere Möglichkeit der Allotransplantation machen MSCs so attraktiv für die regenerative Medizin [139]. Wakitani *et al.* zeigten in 1995 erstmals, dass MSCs aus postnatalen Organismen eine Quelle für myokardiale Progenitorzellen darstellen und bei der myogenen Regeneration eine Rolle spielen [140]. Weitere Arbeiten stellten das große Potential adulter MSCs für regenerative Prozesse von kardiovaskulärem Gewebe dar [141, 142]. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse erfolgten viele Versuche auf diesem Gebiet. Eine Umprogrammierung von MSCs in differenzierte Kardiomyozyten konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* berichtet werden [143–145]. Weiterhin, um Aussagen über genaue Wirkmechanismen der MSCs im ischämischen und postischämischen Herzen zu treffen, wurden viele experimentelle Untersuchungen vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass trotz Funktionsverbesserung der ventrikulären Funktion, der Beitrag von MSCs zu einem möglichen Kardiomyozytenersatz keinen eindeutigen therapeutischen Mechanismus darstellt [95, 98, 99, 146]. Die positive Wirkung der transplantierten MSCs wurden vorwiegend auf parakrine Signale zurückgeführt, die die endogene Kardiomyogenese, Angiogenese, Zytoprotektion, Hemmung der Fibrose sowie Entzündung und Stimulation residenter Stammzellen fördern können [147, 148]. Es wurde gezeigt, dass MSCs in der Lage sind Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine freizusetzen und damit die genannten regenerativen Mechanismen unterstützen [149]. So konnte beispielsweise die Gruppe um Windmolders *et al.* zeigen, dass parakrine Faktoren innerhalb eines konditionierten MSC-Mediums, die Migration residenter Stammzellen aus dem humanem Myokard verbesserte [150]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass MSCs durch die Abgabe von kleinen Membranvesikeln, sogenannter Exosomen, die interzelluläre Kommunikation steuern. Diese Exosomen dienen unter anderem als Vehikel für Boten- (*engl.* mRNA) und mikro-Boten-RNA (*engl.* miRNA), die die Genexpression in der Zielzelle regulieren können.

Zusätzlich haben Zhang *et al.* im MI-Rattenmodell gezeigt, dass die Vorbehandlung kardialer Stammzellen mit MSC-Exosomen zu einem verlängerten Überleben, verringerter kardialer Fibrose und langfristig gesteigerter Herzfunktion führte [151].

MSCs bilden in vielen Organen und Geweben einschließlich dem Herzen, gemeinsam mit residenten Stammzellen und Fibroblasten eine Stammzellnische [152, 153]. Diese Nischen bilden dynamische Einheiten, die durch intrinsische und extrinsische Faktoren kontrolliert werden. MSCs sind in der Lage residente kardiale Stammzellen zu stimulieren. Dadurch kann eine Amplifikation und Differenzierung neuer adulter Kardiomyozyten ermöglicht werden. Die Erkenntnisse, dass durch die Interaktion mit residenten Wirtselementen neue Zellen entstehen können, bildet eine entscheidende Komponente für die Geweberegeneration und nachfolgende Studien [154]. Die Aufdeckung grundlegender Prozesse in der Interaktion zwischen MSCs und CSCs stellt weiterhin eine große Herausforderung für die zukünftige Wissenschaft dar [154]. Eine Verbesserung der Definition und der Lokalisierung von kardialen Stammzellnischen beschreibt eine Grundvoraussetzung für weitere Angriffspunkte der Forschung [155].

Erstmalig konnten Chong *et al.* MSC-ähnliche, CFU-F bildende Zellen aus dem Mäuseherz isolieren. Mit Hilfe der Abstammungslinien und Embryonenanalysen konnte ein proepikardialer Ursprung dieser Zellen ausgemacht werden [106]. Das Epikard als äußere Schicht des Herzens, spielt eine wichtige Rolle in der Herzentwicklung [156]. Das Epikard entsteht aus dem Proepikard. Dies beschreibt eine Population an embryonalen Progenitorzellen, die neben der Epikardbildung, auch an der Entwicklung des kardialen Interstitiums und des Koronargefäßsystems beteiligt sind [157–160]. Nach Bildung des primitiven Epikards durch mesenchymal-epitheliale Transition (MET) erfahren einige epikardiale Epithelzellen eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Die entstandenen mesenchymalen Zellen werden als „*epicardium-derived-cells*“ (*engl.* EPDCs) bezeichnet [157]. Sie können in Kardiomyozyten, kardiale Fibroblasten, Koronarendothelzellen, sowie in glatte Muskelzellen differenzieren [161, 162] (siehe Abb. 1.3).

Das durch die EMT entstandene Mesenchym ist an verschiedenen Orten an der Entwicklung embryonaler kardialer Strukturen beteiligt [157]. Neben der Organogenese spielen EMT-ähnliche Prozesse auch bei physiologischen Reaktionen auf Verletzungen oder Gewebeschädigungen eine Rolle [163]. Bemerkenswerterweise konnten Lepilina *et al.* bei Zebrafischen, die einer linksventrikulären Apexresektion unterzogen wurden, eine Proliferation von Progenitorzellen beobachten, die präkardiale Marker exprimierten. Weiterhin beschrieben Sie eine Ausdehnung des epikardialen Gewebes, was zu einer Epithelabdeckung des betroffenen Myokards führte. Somit zeigten Sie, dass eine Subpopulation an epikardialen Zellen eine EMT durchliefen und nach anschließender Differenzierung in Kardiomyozyten und Endothelzellen zur Regeneration des verletzten Areal beigetragen haben [164]. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Ischämie zu einer erneuten epikardialen EMT und Migration führte [161].

EPDCs, die durch eine Ischämie verstärkt aktiviert und gebildet wurden, durchliefen eine EMT und unterstützten nach anschließender Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen die Herzregeneration. Die beobachtete regenerative Kapazität war jedoch begrenzt und lieferte nur eine limitierte Anzahl neugebildeter Kardiomyozyten [65].

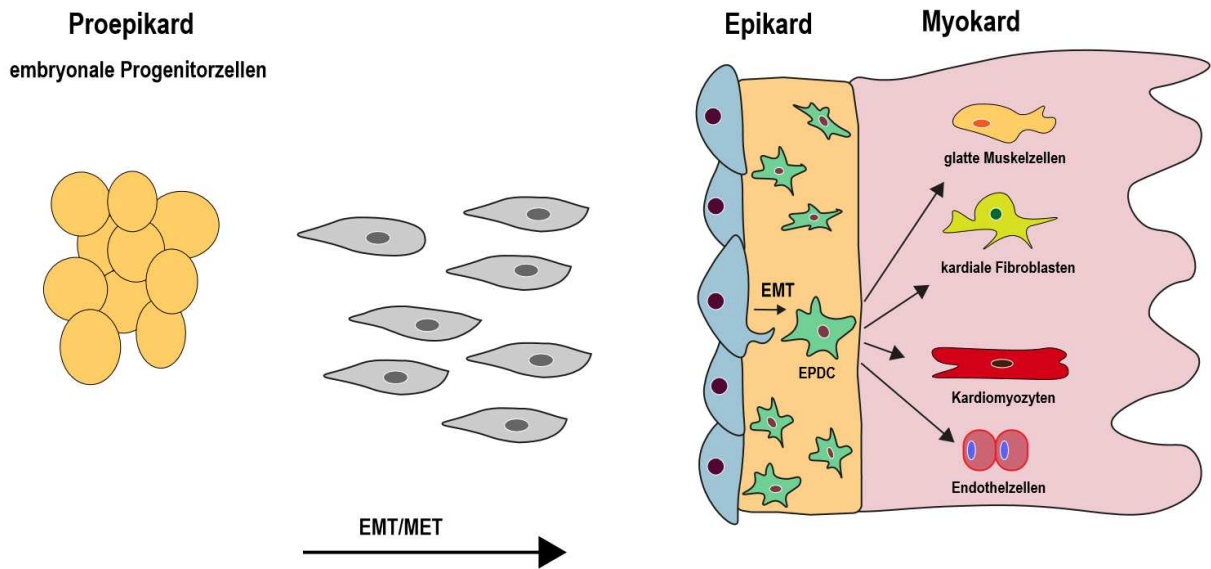


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Entwicklung epikardialer Zelllinien durch EMT und MET.
(modifiziert nach Smits et al.[162])

Das Proepikard besteht aus embryonalen Progenitorzellen. Diese lagern sich der Mykardoberfläche an und bilden nach einer EMT, als Epithelzellen das „primitive Epikard“. Einige, vom Epikard stammende Zellen (EPDCs), wandern in die subepikardiale Schicht ein und werden einer EMT unterzogen. EPDCs sind in der Lage sich in glatte Muskelzellen, kardiale Fibroblasten, Kardiomyozyten und in Endothelzellen zu differenzieren.

1.5 Vorarbeiten

1.5.1 Identifikation intramyokardialer MSC-Nischen

Die Erkenntnis, dass das adulte Säugetierherz kein postmitotisches Organ darstellt [62], sondern über Nischen mit dynamischen Stammzellpopulationen verfügt, lieferte einen wichtigen Fortschritt im Forschungsfeld der regenerativen Medizin [65, 106]. Dabei scheinen kardiale Progenitorzellen (CPCs)/ kardiale Stammzellen (CSCs), MSCs und vor allem ihre Interaktionen großes Potential zur Regeneration des verletzten Myokards zu besitzen [154].

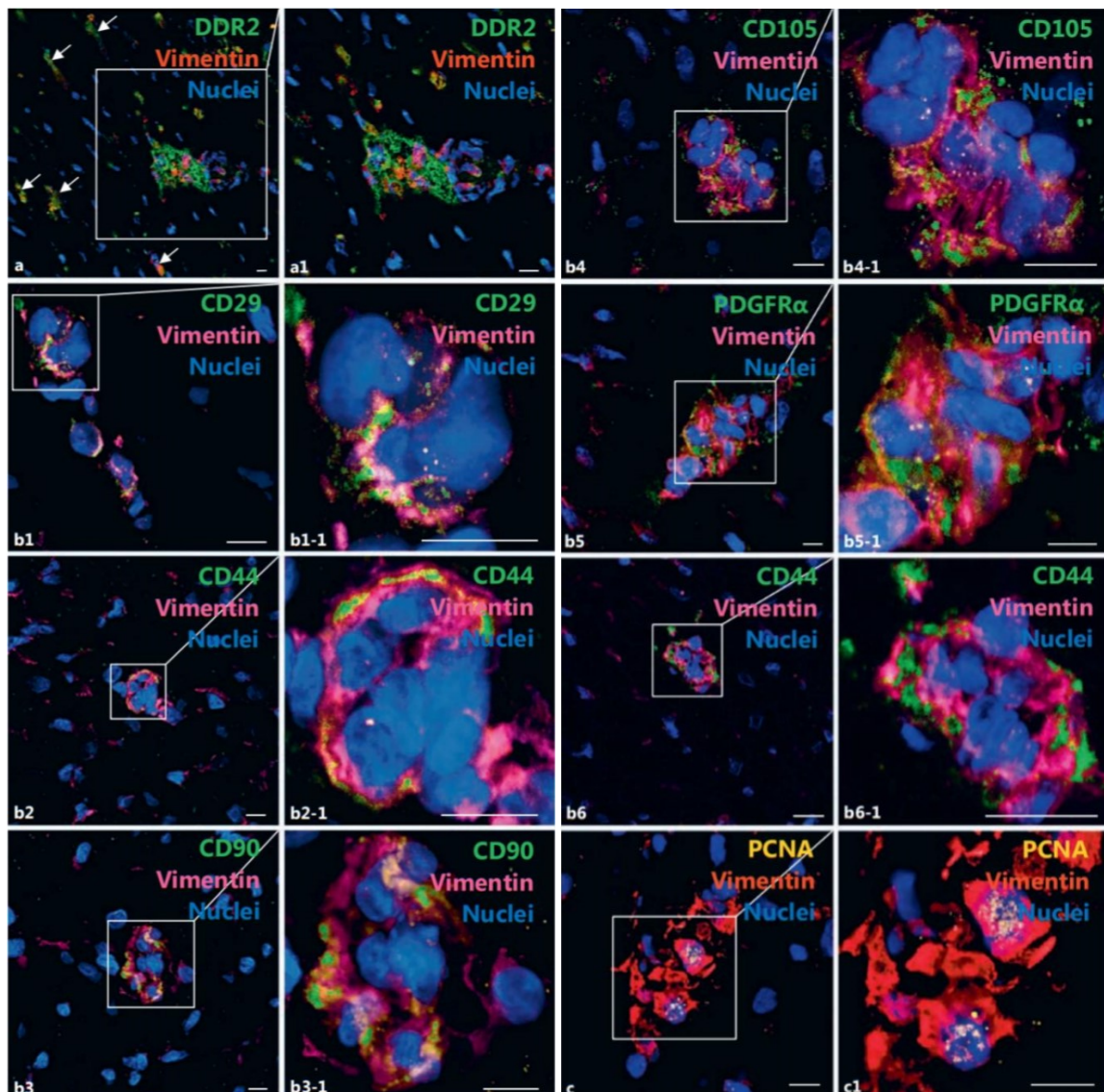


Abb. 1.4: Intramyokardiale mesenchymale Stammzellnische mit Expression typischer MSC-Oberflächenmarker - nachgewiesen durch Immunfluoreszenzfärbung. (nach Klopsch et al. [155])
(a) MI-Gruppe; Co-Lokalisierung von DDR2 und Vimentin in mesenchymalen Zellen und MSC-Clustern (**a1**)
(b1-b5) MI-Gruppe; Vimentin-positive MSC-Cluster exprimieren typische MSC-Oberflächenmarker
(b6) Kontrollgruppe; im nicht infarzierten Herzen wurden Vimentin-positive MSC-Cluster nur selten gefunden
(c) MSC-Cluster im Periinfarktgebiet exprimieren Proliferationsmarker (engl. PCNA)
 Maßstabsleiste: 10 µm

Die Etablierung von Methoden, die eine Isolation und weitere Charakterisierung von kardialen residenten Stammzellen ermöglichte, eröffnet neue Möglichkeiten für regenerative Therapieansätze nach MI [155, 165–167]. Dabei deuten einige Studien daraufhin, dass Einblicke in die Nischenlokalisierung und das dortige Zusammenspiel von residenten Stammzellen eine weitere wichtige Rolle spielen [65, 106, 167, 168]. Die Vorarbeit aus unserem Labor demonstrierte im postischämischen Rattenherz, 24 Stunden nach MI, eine starke Expression von Vimentin-positiven Zellclustern mit typischer MSC-Oberflächenmarker Co-Expression (siehe Abb. 1.4) [155].

Vimentin ist ein Typ-III-Intermediärfilament und Teil des Zytoskeletts mesenchymaler Zellen sowie von Zellen die eine EMT durchlaufen haben [169, 170]. Es wurde beschrieben, dass eine Myokardverletzung die EMT und damit eine verstärkte Vimentinexpression induziert [171].

Klopsch *et al.* zeigten weiterhin, dass die Größe der MSC-Cluster 24 Stunden nach MI sowohl im Infarktbereich als auch im nicht infarzierten Bereich der Interventionsgruppe (MI-Gruppe) signifikant vergrößert waren, im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Sham*-Gruppe). Damit machten Sie deutlich, dass die identifizierten kardialen MSCs schon früh nach MI auf Ischämie ansprechen und aktiv proliferieren [155].

1.5.2 Einfluss von Erythropoetin als kardioreaktiver Wachstumsfaktor

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoproteinhormon, dass in peritubulären Zellen der Niere und während der fötalen Entwicklung sowie beim Neugeborenen in der Leber gebildet wird [172]. In Säugetierzellen findet unter hypoxischen Bedingungen eine verstärkte Expression des Hypoxie-induzierten-Faktors-1 α (*engl.* HIF-1 α) statt [173]. Diese Hochregulation führt zu einer ansteigenden Bildung und Sekretion von EPO [174]. Das im Plasma zirkulierende Hormon bindet nachfolgend an den EPO-Rezeptor, der unter anderem auf erythroiden Progenitorzellen zu finden ist. Hier führt es über eine verstärkte Proliferation, Hemmung der Apoptose sowie Förderung der terminalen Differenzierung zu einer steigenden Anzahl an funktionsfähigen Erythrozyten [175]. Rekombinantes humanes EPO wird seit mehr als zwei Jahrzehnten zur Behandlung von Patienten mit chronischer Anämie eingesetzt [176]. Neben der Expression auf hämatopoetischen Zellen exprimieren auch zahlreiche nicht erythropoetische Zellen und Gewebe, einschließlich des Herzens, den EPO-Rezeptor [175, 177]. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse zeigten Parsa *et al.* erstmals, dass eine periphere EPO-Infusion über die Aktivierung antiapoptotischer Zellkaskaden die Myozytenapoptose hemmen, die Infarktgröße reduzieren und somit zu einer verbesserten kardialen Funktion nach MI führen kann [178]. Es ist bekannt, dass EPO die Regeneration nach MI, über synergistische Effekte auf MSCs, verstärken kann [179, 180]. Auch MSCs exprimieren einen EPO-Rezeptor, über diesen ihr angiogenes Potential und ihre Proliferation gefördert werden kann [181]. Interessanterweise zeigten

Klopsch *et al.* darüber hinaus, dass eine direkte intramyokardiale EPO-Injektion eine frühzeitige Hochregulation von regenerativen Schlüsselproteinen induziert, über die es zu einer verstärkten Rekrutierung von hämatopoetischen Stammzellen, endothelialen Progenitorzellen, MSCs und residenten kardialen Stammzellen kommt [180, 182]. Sie demonstrierten, dass eine epikardiale EPO-Abgabe bereits am ersten Tag nach einem MI die TGF- β (*engl. Transforming Growth Factor β*) und Wnt-Signalübertragung in den proliferierenden intramyokardialen MSC-Clustern steigerte [180]. Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass TGF- β , sowie der Wnt-Signalweg zu den wichtigen Regulatoren der EMT in Stammzellen zählen, in dem sie zu Änderungen des Transkriptionsprogrammes, des Phänotyps und der Migrationskapazität führen [183, 184].

Über diese Mechanismen führte die intrakardiale EPO-Supplementierung nach MI zu einer verminderten Kardiomyozytenapoptose, reduzierten Inflammation und Fibrose, sowie einer Verbesserung der ventrikulären Funktion [182, 185]. Die regenerativen Einflüsse von EPO schrieben Klopsch *et al.* vor allem der Proliferationsinduktion und Regulation der myokardialen Stammzellnische zu [180]. Dabei scheinen Parameter wie die EPO-Abgabe, Dosierung, sowie der Zeitpunkt der Supplementierung wichtige Einflussgrößen darzustellen, die für eine Verbesserung der therapeutischen Wirkung Optimierung bedürfen [182, 186–188]. Interessanterweise zeigten Klopsch *et al.*, dass die epikardiale EPO-Applikation die frühen intrakardialen Regenerationsmechanismen nach MI aktivieren konnten und schlossen daraus, dass EPO am vielversprechendsten wirken könnte, wenn es lokal und so zeitnah wie möglich nach akuten ischämischen Schäden verabreicht würde [180].

Die Transplantation oder Stimulation von MSCs im postischämischen Säugetierherz, auf Grundlage ihrer regenerativen Eigenschaften, besitzt auch weiterhin ein großes Potential. Eine geringe Überlebenszeit dieser Zellen schränkt jedoch ihre therapeutische Wirkung stark ein und Bedarf gezielter Verbesserung [189]. Die kombinierte Gabe von EPO steigert neben den regenerativen Eigenschaften, auch die Apoptoseresistenz der MSCs [190, 191]. Bemerkenswerterweise zeigten Copland *et al.*, dass durch retrovirale Transduktion muriner MSCs mit EPO, ihre Regenerationsfähigkeit über autokrine und parakrine Effekte gesteigert wurde [191]. Eine Verstärkung von regenerativen Schlüsselmechanismen und proangiogenen Signalen innerhalb der MSC-Nische kann die Regeneration nach MI fördern [180].

Nach diesen positiven Einflüssen von EPO im Tiermodell zeigten klinische Studien jedoch eher enttäuschende und zum Teil zweideutige Ergebnisse [192, 193].

Die Erkenntnisse verdeutlichen das große Potential von EPO als pleiotropen Wachstumsfaktor in den unterschiedlichsten Bereichen, einschließlich der Herzmedizin. Sie zeigen auf der anderen Seite aber auch die Schwierigkeiten der optimalen Anwendung, um einen größtmöglichen therapeutischen Effekt zu erzielen.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Für eine gezielte Steuerung der Regeneration nach einem Myokardinfarkt (MI), ist eine genaue Definition und Lokalisierung der Stammzellnischen sowie eine Untersuchung von zellspezifischen Mechanismen kardial residenter Zellpopulation von großer Bedeutung. Bisher existieren keine schlüssigen Daten bezüglich relevanter Zellquellen zur Regeneration des MI. Allerdings lieferten wissenschaftliche Vorarbeiten innerhalb der letzten 10 Jahren Erkenntnisse zu spezifischen kardialen MSC-Nischen. Diese verdeutlichten gleichzeitig die Notwendigkeit der Etablierung von Methoden und Standardisierung von Protokollen für die Isolation sowie Kultivierung gewebespezifischer kardialer MSCs. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um die *in vitro*-Charakterisierung zu fördern und eine Vergleichbarkeit zwischen den Forschungseinrichtungen zu leisten, die diese Zellen als Referenz nutzen [65, 106, 168].

In unseren Vorarbeiten konnten wir eine intramyokardiale CD29⁺ CD44⁺ CD90⁺ CD105⁺ PDGFR α ⁺ DDR2⁺ MSC-Nische mittels Immunfluoreszenzfärbung in kardialen Gewebeschnitten im Rattenherz identifizieren, die früh nach MI in Form von Clustern aktiv proliferierte. Diese Ergebnisse lieferten einen wichtigen Ansatz zur Identifikation intrakardialer MSC-Nischen nach MI und bilden die Grundlage für weiterführende Experimente, die das Verständnis dieser Zellen weiter fördern können [155].

Aufbauend auf diesen Ergebnissen liegt das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung und Standardisierung einer Methodik im Rattenmodell zur Identifizierung und Isolation einer gewebespezifischen kardialen MSC-Subpopulation, die früh nach MI eine Aktivierung und Proliferation aufweist. Anhand der Expression MSC-spezifischer Oberflächenmarker sollen die isolierten mononukleären Zellen (*engl.* MNCs) durchflusszytometrisch charakterisiert und anschließend sortiert werden. Darüber hinaus soll die kultivierte MNC-Subpopulation *in vitro* auf ihre multipotenten, angiogenen und kardiomyogenen Eigenschaften weiter untersucht werden. Außerdem soll der therapeutische Einfluss von Erythropoetin als pleiotroper Wachstumsfaktor auf das angiogene und kardiomyogene Differenzierungspotential der isolierten Zellsubpopulation ermittelt werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Generierung eines standardisierten Protokolls für die Isolation einer kardialen MSC-Subpopulation, die im Labor jederzeit als Referenzzelle oder für weitere experimentelle Forschung zugänglich ist. Darüber hinaus sollen mit diesen Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Versuche gestaltet werden, um die Beantwortung grundlegender Fragen zum Verständnis intrakardialer MSC-Nischen weiter voranzutreiben.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen

Geräte	Typ	Hersteller
Kleintierbeatmungsgerät	SAR-830P	IITC-Life Science
Operationstisch	HI 1220	Leica
Operationsmikroskop	OPM 241 F	Carl Zeiss
Pipetten	Eppendorf Research Pipetten (2,5-1000µl)	Eppendorf
	Pipetboy	Integra Bioscience
Zentrifuge	Multifuge 1S-R	Heraeus
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific-Industries
Wasserbad	WNB Basic	Memmert
Durchflusszytometer (FACS)	BD™ FACS LSRII	BD Bioscience
	BD™ FACS Aria IIIu	BD Bioscience
Fluoreszenzmikroskop (Konfokales Laser Scanning Mikroskop)	ELYRA PS.1 LSM 780	Carl Zeiss
Durchlichtmikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
	MZ 12.5	Leica
Mikroskopkamera	DFC 420c	Leica
	Axio Cam MRm	Carl Zeiss
Computer	Workstation xw4400 Base Unit	HP

Inkubator	CB 150	Binder
Hämozytometer	TC20 Automated Cell Counter	Bio Rad
Kryostat	CM 1900	Leica
Sterilwerkbank	Safeflow 1.2	Nunc
Autoklav	V-150	Systec

2.2 Software

Tabelle 2.2: Verwendete Software mit Typen- und Herstellerbezeichnung

Software	Typ	Hersteller
Schreib-Software	Office-2019	Microsoft
FACS-Software	FACS DIVA™ Version 6.1.2	BD Bioscience
Planimetrie-Software	Zeiss Axio Vision LE Rel. 4.5	Zeiss
Mikroskop-Software	ZEN 2011, blue edition	Zeiss
Statistik-Software	SigmaStat 3.0	SPSS
	SigmaPlot 9.0	SPSS
Angiogenese-Analysemodul	ImageJ-Software	National Institute of Health

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien mit Typen- und Herstellerbezeichnung

Produkt	Typ	Hersteller
Zellkulturflaschen	50 ml (25 cm ²), 250 ml (75 cm ²), 650 ml (175 cm ²)	Greiner Bio-One
Multiwellplatten	Cellstar® – 24 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One
	Tissue Culture Testplatte 6	TTP
Deckgläschen	Borosilikatglas, rund, 13 mm Ø	Mariefeld
Röhrchen	Cellstar® - 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen	Ultratip	Greiner Bio-One
Serologische Pipetten	2 ml, 10 ml, 25 ml	TPP
Objektträger	Glas, 76×26×1 mm	Mariefeld
Hydrophobischer Stift	PAP pen 1 unit	Abcam
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tubes (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Zellsieb	40 µm, 100 µm	BD Falcon
FACS-Röhrchen	5 ml	BD Falcon
Nagellack	Top Coat-transparent	Rival de Loop

2.4 Standard- und Pufferlösungen

Tabelle 2.4: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
PBS (PAN-Biotech)	70 mM NaCl 1,5 mM KCl 4 mM Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 1 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
PBS* / 2 mM EDTA	PBS* (PAN-Biotech) 0,4% 0,5 M EDTA (Life Technologies) pH 8,0
MACS®-Puffer (Miltenyi-Biotec GmbH)	PBS 0,5% Rinderserumalbumin (BSA) 5 mM EDTA pH 7,4
Inkubationspuffer für durchflusszytometrische Analyse (Blockade der nicht-spezifischen Bindungen)	PBS 3% BSA
HBSS*-Puffer (Gibco)	5,33 mM KCl 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 4,16 mM NaHCO ₃ 137,93 mM NaCl 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ 5,55 mM D-Glukose pH 6,7-7,8

HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})	HBSS* mit Zusatz von: 1,26 mM CaCl_2 0,49 mM MgCl_2 0,41 mM MgSO_4 pH 6,7-7,8
Enzymatischer Cocktail	Kollagenase I Kollagenase XI Hyaluronidase I DNase I HBSS-Puffer (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})
DMEM-10	DMEM plus 10% FBS 1% Penicillin-Streptomycin

*) alle Puffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

2.5 Medien

Tabelle 2.5: Verwendete Zellmedien und Zusammensetzung

Medium	Hersteller
DMEM (<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> , hoher Glukosegehalt)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
α -MEM (<i>Minimum essential medium α</i>)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
DMEM/F-12 (<i>Dulbecco's modified eagle-medium</i> , Nährstoffmischung F-12)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)
EGM-2 (<i>Endothelial cell growth medium-2</i>)	Lonza
Gefriermedium (<i>Recovery cell culture freezing medium</i>)	Gibco (Thermo Fisher Scientific)

2.6 Operationsbesteck

Tabelle 2.6: Verwendetes Operationsbesteck mit Typen- und Herstellerbezeichnung

Produkt	Typ	Hersteller
feine Pinzette	gerade, 5-Inox	Dumont
Mikroskopierpinzette	gebogen; 130 mm	AESCU LAP
feine Schere	La Grange; gezähnt; 110 mm	AESCU LAP
Mikrofederschere mit Flachgriff	NOYES; 125 mm	AESCU LAP
Mikrofederschere mit Flachgriff	VANNAS; 85 mm	AESCU LAP
Nadelhalter	Masing; 130 mm	AESCU LAP
Wundspreizer	Logan; 50 mm	AESCU LAP
chirurgische Schere	Standard Modell; 145 mm	AESCU LAP
Nahtmaterial	6-0 Prolene; nicht resorbierbar	Ethicon
	2-0 PDS II; resorbierbar	Ethicon
	5-0 Safil; resorbierbar	B.Braun
Venenverweilkanüle	Vasofix; 17 Gauge	B.Braun
Spritzen	1 ml Spritzen; Typ Omnifix	B.Braun
	2 ml Spritzen	Becton Dickinson Discardit
	10 ml Spritzen	Becton Dickinson Discardit
steriles-Skalpell	160 mm	Dahlhausen
Einmalrasierer	einschneidig	Med Comfort

2.7 Medikamente

Tabelle 2.7: *Verwendete Medikamente mit Herstellerbezeichnung*

Medikament	Hersteller
Diethyläther	J.T. Baker
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Sigma-Aldrich Chemie
Fentanyl (Fentanylcitrat)	Janssen
Vetalgin®	MSD-Tiergesundheit
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	B.Braun
Sauerstoff (99,5%)	Messer Griesheim
Druckluft	Messer Griesheim
Natriumchlorid (99,5%)	Carl Roth
Aqua dest.	Baxter S.A.

2.8 Kits

Tabelle 2.8: *Verwendete Kits mit Inhalt und Herstellerbezeichnung*

Kit	Inhalt	Hersteller
Funktionelles MSC-Identifikationskit für die Ratte (SC020)	Adipogenes Supplement	R&D Systems
	Osteogenes Supplement	
	Chondrogenes Supplement	
	Insulin-Transferrin-Selenium Supplement	
	anti-mFABP4 (#967799)	

	anti-hAggrecan (#967800)	
	anti-hOsteocalcin (#967801)	
Zell-Markierungs-Kit (<i>Qtracker® 565 Cell Labeling Kit</i>)	Qtracker® nanocrystals (Component A)	Thermo Fischer Scientific
(Q25031MP)	Qtracker® carrier (Component B)	

2.9 Antikörper und Chemikalien

Tabelle 2.9: *Verwendete Chemikalien und Antikörper mit Herstellerbezeichnung und Katalognummer*

Produkt	Hersteller
CD29 monoklonaler Antikörper (11-0291)	eBioscience
CD44H monoklonaler Antikörper (12-0444)	eBioscience
CD45 monoklonaler Antikörper (17-0461)	eBioscience
CD90 monoklonaler Antikörper (202510)	BioLegend
CD105 monoklonaler Antikörper (#05-1424)	Millipore
DDR2 (CD167b) polyklonaler Antikörper (bs-4194R)	Bioss
PDGFRα polyklonaler Antikörper (#3164)	Cell Signaling
Nkx2.5 Antikörper (sc-8697)	Santa Cruz Biotechnology
GATA4 Antikörper (#14-9980-80)	eBioscience
Esel-anti-Ziege Antikörper Alexa Fluor 488 (A11055)	Thermo Fisher Scientific
Esel-anti-Maus Antikörper Alexa Fluor 488 (A21202)	Thermo Fisher Scientific

Ziege-anti-Ratte Antikörper Alexa Fluor 647 (A21247)	Thermo Fisher Scientific
Triton X-100 (T8787)	Sigma-Aldrich Chemie
Normales Esel Serum (D9663)	Sigma-Aldrich Chemie
Fluoroshield® mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (F6057)	Sigma-Aldrich Chemie
Zombie Aqua™ (<i>Fixable Viability Kit</i>) (423101)	Bio Legend
ZellShield® (13-0050)	Minerva Biolabs GmbH
Fetales Kälberserum (FBS) (P30-1302)	PAN-Biotech
Human Plasma Fibronectin (F0895)	Millipore
Ethanol absolut (WAL105020500)	Walter CMP GmbH
Kollagenase I (SCR103)	Sigma-Aldrich Chemie
Kollagenase XI (C7657)	Sigma-Aldrich Chemie
Hyaluronidase I (H4272)	Sigma-Aldrich Chemie
DNase I (4716728001)	Roche
Bovines Rinderserum (BSA) (A1933)	Sigma-Aldrich Chemie
Trypanblau-Farbstoff (T8154)	Sigma-Aldrich Chemie
Trypsin/EDTA (P10-023100)	Pan Biotech
Paraformaldehyd-Pulver (P6148)	Sigma-Aldrich Chemie
Erythrozyten-Lyse-Puffer (<i>RBC-lysis buffer</i>) (00-4333-57)	eBioscience
Methanol (AH1116)	RCI Labscan Limited

Material

Giemsas-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (1.09204.0500)	Sigma-Aldrich Chemie
Matrigel® (<i>Growth Factor Reduced</i>) (354230)	Corning Inc.
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (SA62550-12)	Sakura

3. Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Dieses Projekt wurde vom Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern geprüft und genehmigt (Antragsnummer: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-010/11).

Für die Versuchsdurchführung wurden 16 männliche Lewis Ratten (*Rattus norvegicus*) der Firma *Charles River* verwendet. Das Gewicht der Tiere lag durchschnittlich bei $279 \text{ g} \pm 22,0 \text{ g}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Die Lewis-Ratte ist eine Inzucht-Ratte. Dies führt zu einem ähnlichen genetischen Profil der Tiere. Die Tiere wurden bis zur Operation unter Futter- und Wassergabe bei konstanten Temperatur-, Luftfeuchtigkeits- und Luftdruckverhältnissen gehalten.

3.2 Vorbereitung und Operation

Die Lewis Ratten wurden zufällig in eine Kontrollgruppe (*Sham*-Gruppe, $n=8$) und eine Interventionsgruppe (MI-Gruppe, $n=8$), aufgeteilt. Alle Ratten wurden mittels Diethyläther narkotisiert und mit einer intraperitoneal verabreichten Pentobarbital-Natrium Injektion (50 mg/Kg Körpergewicht) anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert und mit einer 17 Gauge Venenverweilkanüle intubiert. Nach der Intubation bekamen alle Ratten zusätzlich 3 ml einer 1:40 verdünnten Fentanyl-Lösung *subcutan* injiziert, um eine adäquate Anästhesie der Tiere zu gewährleisten. Mittels eines Kleintierbeatmungsgerätes wurden die Tiere druckkontrolliert (bei $1 \text{ cm H}_2\text{O}$) mit reinem Sauerstoff beatmet.

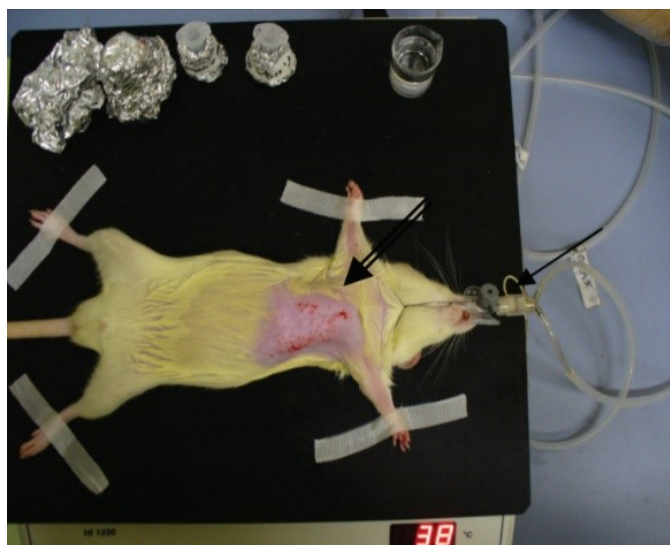


Abb. 3.1: Lagerung der intubierten Ratte auf dem Operationstisch. (mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. Klopsch)

Pfeil: Tubus (Venenverweilkanüle);

Doppelpfeil: rasierter links-anteriorer Thorax

Die manuell eingestellte Atemfrequenz lag bei 90/min. Als Vorbereitung auf den Eingriff erfolgte eine Rasur des linken oberen Quadranten des Thorax.

Auf Höhe des 5. Interkostalraumes (ICR) wurde ein links-anteriorer Hautschnitt durchgeführt. Für den Zugang zum Herzen wurden die Muskelfaszien, sowie die *Musculi pectorales* der linken Seite durchtrennt. Die Durchtrennung der Interkostalmuskulatur erfolgte auf Höhe des 5. ICR. Anschließend konnte unter Einsatz eines Wundspreizers die Einsicht in den geöffneten Thorax ermöglicht werden. Die folgenden Schritte erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops mit einer 16-100-fachen Vergrößerung. Nach Eröffnung des Perikards wurde der *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) ca. 2 mm distal seines Ursprungs aus der linken Koronararterie mittels einer 6-0 Prolene Naht permanent ligiert. Zur Kontrolle des durch die Ligation ausgelösten Myokardinfarkts diente das Abblasen bzw. die Graufärbung des Myokards im abhängigen Stromgebiet des RIVA. Ratten, die der Kontrollgruppe zugeordnet wurden, erhielten dieselbe Operation ohne Ligation des RIVA.

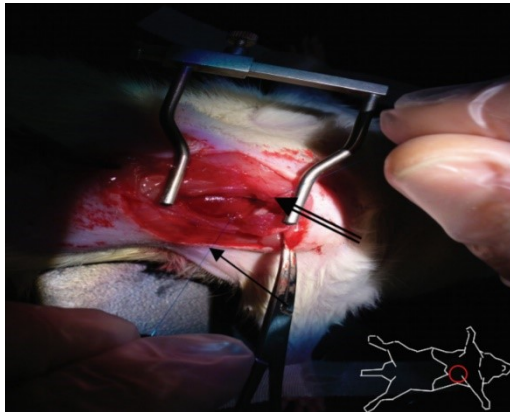


Abb. 3.2: Fadenführung bei der Ligation des RIVA. (mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. Klopsch)

Pfeil: eintretender Faden

Doppelpfeil: austretender Faden

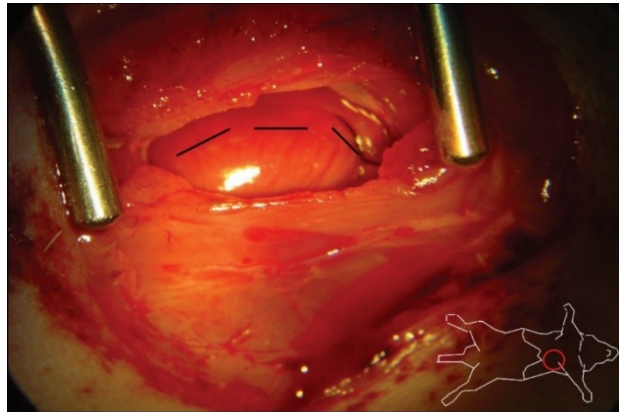


Abb. 3.3: Abgeblasstes ischämisches Myokard im Versorgungsgebiet des RIVA. (mit freundlicher Genehmigung von Herrn PD Dr. Klopsch)

gestrichelte Linie: Infarktgrenze

Vor Verschluss des Thorax wurde die Pleurahöhle durch Überdruckbeatmung der Lungenflügel entlüftet. Anschließend wurde der Thorax mittels einer 2-0 PDS Naht geschlossen.

Die *Musculi pectorales* wurden ebenso wie die darüberliegende Haut mit einer 5-0 Safil Naht fortlaufend vernäht. Nach Beendigung der Operation wurden die Tiere vom Beatmungsgerät entwöhnt und anschließend in entsprechende Käfige umgelagert. Die Tiere erhielten zur Analgesie 10 Tropfen Vetalgin® in ihr Trinkwasser.

3.2.1 Herzentnahme

24 Stunden nach der Operation wurden die Ratten erneut mit Diethyläther narkotisiert. Anschließend erfolgte die zervikale Dislokation, was zum Tod der Tiere führte. Es erfolgte die komplette Eröffnung des Thorax mithilfe einer Schere. Anschließend wurde das Herz in seiner Gesamtheit entfernt und bis zur weiteren Aufbereitung in HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) auf Eis gelagert.

3.3 Isolation und Kultivierung von kardialen mononukleären Zellen

Nach Entnahme der Herzen, wurde mithilfe eines sterilen Skalpells und einer Schere, Fettgewebe, Teile der *Aorta ascendens* und des *Truncus pulmonalis* entfernt. Anschließend wurde das Herzgewebe mit HBSS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gespült. Daraufhin wurden die Rattenherzen unter Zugabe von HBSS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) mit einem Skalpell in kleine 1-2 mm³ große Stücke geschnitten. Hiernach wurde ein enzymatischer Cocktail aus 250 µl Kollagenase I (Arbeitskonzentration: 450 U/ml), 500 µl Kollagenase XI (Arbeitskonzentration: 125 U/ml), 50 µl Hyaluronidase I (Arbeitskonzentration: 600 U/ml), 33 µl DNase I (Arbeitskonzentration: 120 U/ml) und 4,167 ml HBSS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) hergestellt. Dieser wurde zu dem zerkleinerten Myokardgewebe gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dies führte zur enzymatischen Zersetzung des Herzmuskelgewebes. Das gewonnene biologische Gemisch wurde dann mit 7 ml DMEM-10 in ein 15 ml Röhrchen überführt und darauf durch ein 100 µm großes Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen geleitet. Anschließend erfolgte die zweimalige Zentrifugation bei 75×g für 5 Minuten (4°C). Die entstandenen Überstände, die die zu isolierenden mononukleären Zellen (*engl.* MNCs) enthielten, wurden auf Eis gelagert. Zunächst wurden die gesammelten Überstände in ein 50 ml Röhrchen überführt und zweimal bei 300×g für 10 Minuten (4°C) zentrifugiert. Die im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten wurden mittels Erythrozyten-Lysepuffer gelöst (1 ml bei 4°C für 10 Minuten inkubiert). Danach wurden 9 ml DMEM-10 Medium hinzugefügt und die Zellsuspension bei 300×g für 10 Minuten zentrifugiert (4°C). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 1 ml DMEM-10 Medium resuspendiert. Die Zellen konnten jetzt unter Verwendung von Trypanblau-Farbstoff mit dem TC-Zellgerät automatisiert gezählt werden. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit der gleichen Menge an Farbstoff verdünnt und in eine Zählkammer gegeben.

Hiernach wurden 5×10^5 Zellen für eine erste durchflusszytometrische Analyse entnommen. Die verbleibenden MNCs wurden in zwei 75-cm²-Zellkulturflaschen in DMEM-10 Medium ausgesät. Nach 48 Stunden wurden die nicht adhärenenten Zellen entfernt, die Zellkulturflasche mit PBS Puffer einmal gewaschen und mit frischem DMEM-10 Medium versetzt. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Bei einer Konfluenz der MNCs von 80-90% erfolgte das erste Passagieren. Hierzu wurde das DMEM-10 Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und die

Zellen mit PBS gründlich gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA Lösung für etwa 1-2 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Verlust der Zelladhärenz wurde der Prozess durch Hinzugabe von frischem DMEM-10 Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Tube überführt und für 5 Minuten bei 300×g (24°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das erhaltene Zellpellet wurde in frischem DMEM-10 Medium resuspendiert und in einer neuen Zellkulturflasche (T25 oder T75) je nach Zellzahl ausgesät. Eine Million Zellen wurden auch in 1 ml Gefriermedium erst bei -80°C und 2 Wochen später in Stickstoff eingefroren.

Isolation von MNCs aus dem Rattenherz

1. sterile Entnahme des Herzens aus der Ratte - in kaltes HBSS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})
2. Entfernung von überflüssigen Strukturen und Geweben vom Herzen (z.B. Fettgewebe)
3. Spülung des Herzens mit 2 ml HBSS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})
4. Trennung des Herzens mittels eines Skalpells in 2 Hälften
5. Herzhälften mittels Skalpells in kleine Teile schneiden
6. Zugabe von (angegebene Werte beziehen sich fortan auf eine Herzhälfte):

$250\ \mu\text{l}$ Kollagenase Typ I
 $500\ \mu\text{l}$ Kollagenase Typ XI
 $50\ \mu\text{l}$ Hyaluronidase
 $33\ \mu\text{l}$ DNase Typ I
 $4,167\ \text{ml}$ HBSS (mit Ca^{2+} , Mg^{2+})
7. Inkubation für 30 Minuten bei 37°C im Inkubator
8. Überführung des Auszuges in ein 15 ml Tube unter Zugabe von 10 ml DMEM-10
9. Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren (15×)
10. Zellsuspension durch eine $100\ \mu\text{m}$ großes Zellsieb in ein 50 ml Tube überführen
11. Zentrifugation der Zellen bei 75×g für 5 Minuten (bei 4°C)
12. Abnahme des Überstandes und Lagerung in einem separaten Tube auf Eis
13. Pellet enthält Kardiomyozyten - resuspendieren des Pellets in 9 ml DMEM-10
14. Zentrifugation bei 75×g für 5 Minuten (bei 4°C)
15. Abnahme des Überstandes und Zusammenführung mit dem bereits abgenommen Überstand
16. Zentrifugation der gesammelten Überstände bei 300×g für 10 Minuten (bei 4°C)
17. Überstand abnehmen und Pellet in 1 ml RBC Lyse-Puffer resuspendieren
18. Inkubation für 10 Minuten bei 4°C
19. Zugabe von 9 ml DMEM-10
20. Zentrifugation bei 300×g für 10 Minuten (bei 4°C)
21. Überstand verwerfen und Pellet in 1 ml DMEM-10 resuspendieren (Pellet enthält MNCs)
22. Zentrifugation bei 300×g für 5 Minuten (bei 4°C)
23. Pellet (MNCs) in MACS®-Puffer oder Inkubationspuffer für Durchflusszytometrie resuspendieren

Abb. 3.4: Protokoll zur Isolation von MNCs aus dem Rattenherz.

3.4 Durchflusszytometrische Analyse von postischämischen MNCs

In der Vorarbeit aus dem Jahr 2018 zeigten Klopsch *et al.* an kardialen Gewebeschnitten mittels Immunfluoreszenzfärbung, dass es früh nach MI zu einer Aktivierung und Proliferation in einer intrakardialen MSC-Nische kam. Die detektierten Zellcluster zeigten eine Expression verschiedener MSC-typischer Oberflächenmarker [155]. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde in dieser Arbeit eine durchflusszytometrische Phänotypisierung und darauffolgende Sortierung der isolierten MNCs anhand der folgenden Oberflächenmarker durchgeführt:

CD29 (Positiv-Marker) [194]

CD44 (Positiv-Marker) [194]

CD45 (Negativ-Marker) [194, 195]

CD90 (Positiv-Marker) [194]

CD105 (Positiv-Marker) [134]

PDGFR α (Positiv-Marker) [196]

DDR2 (CD167b) (Positiv-Marker) [197]

Für die als „Positiv-Marker“ bezeichneten Oberflächenmoleküle wurde in der Literatur eine Expression durch MSCs nachgewiesen [198–200]. Dahingegen definierte die ISCT innerhalb ihrer „minimalen Kriterien für MSCs“ CD45 als Negativ-Marker, der nur bei maximal 2% der isolierten Zellen vorkommen darf, damit diese als MSCs bezeichnet werden dürfen [128].

Die frisch isolierten kardialen MNCs wurden unter Verwendung von Trypanblau-Farbstoff mittels TC Zellgerät automatisiert gezählt. $0,3\text{--}1 \times 10^6$ Zellen (je nach Ausbeute) wurden in 2-3 ml Inkubationspuffer (PBS, 3% FBS) aufgenommen. Anschließend wurde zur Unterscheidung von vitalen und toten Zellen eine Färbung mit Zombie Aqua™-Farbstoff durchgeführt. Dieser wurde zuvor in PBS auf eine Konzentration von 1:100 verdünnt. Die Zellen wurden dann mit je 100 μl dieser Lösung gefärbt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit inkubiert. Nach anschließender Zugabe des Inkubationspuffers und Zentrifugation für 10 Minuten bei $300 \times g$, konnten die Zellen für die durchflusszytometrische (*engl.* FC) -Analyse vorbereitet werden. Dazu wurden die MNCs zur Detektion der Oberflächenmarker zuerst mit einem Primärantikörper gefärbt und für 30 Minuten bei 4°C (im Kühlschrank) inkubiert. Der Primärantikörper wurde zuvor in 100 μl Inkubationspuffer auf die gewünschte Arbeitslösung verdünnt (siehe Tabelle 3.1). Nach der Inkubation wurden die Zellen wie zuvor durch Zentrifugation in Inkubationspuffer gewaschen. Hiernach wurden die Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten sekundären Antikörper in Inkubationspuffer auf die gewünschte Arbeitslösung verdünnt (siehe Tabelle 3.1). Anschließend wurden die Zellproben in der verdünnten Arbeitslösung (in PBS) resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C (im Kühlschrank) in der Dunkelheit inkubiert. Darauf

wurden die Zellen erneut gewaschen und in 0,5 ml Inkubationspuffer in FACS-Röhrchen resuspendiert. Die FC-Analyse wurde unter Verwendung des BD™ FACS LSRII mit der BD™ FACS DIVA-Software durchgeführt.

Alle Ereignisse wurden als Dot-Plot (SSC-A *versus* FSC-A) angezeigt. Eine homogene Zellpopulation der mononukleären Zellen wurde gewählt, aus der in nachfolgenden Plots (FSC-A *versus* FSC-W) Singlets und dann mithilfe von SSC-A *versus* AquaZombie™ vitale Zellen in die weitere Analyse eingeschlossen wurden. Im weiteren Vorgang wurden mithilfe vom Plot SSC-A *versus* CD45 vitale MNCs in die CD45⁺ und CD45⁻ Regionen unterteilt. Die Daten der positiven positiv-exprimierten Ereignisse der Zielsubpopulation (CD29, CD44, CD90, CD105, PDGFR α , DDR2) innerhalb der vitalen CD45⁻ Zellpopulation wurden erhoben. Entsprechende ungefärbte negative Kontrollproben (ohne Primärantikörper) wurden verwendet, um die Zielregionen angemessen einzustellen.

Tab. 3.1: Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur durchflusszytometrischen Analyse

Primär-/Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung	Wirt
CD45	APC	1:50	Maus
CD44H	PE	1:333	Maus
CD29	FITC	1:100	Armenischer Hamster
CD90	-	1:555	Maus
CD105	-	1:100	Maus
DDR2 (CD167b)	-	1:50	Kaninchen
PDGFR α	-	1:200	Kaninchen
Sekundär anti-Maus	Alexa Fluor 488	1:300	Esel
Sekundär anti-Kaninchen	Alexa Fluor 488	1:300	Esel

3.5 Sortierung und Kultivierung einer kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation

Die isolierten MNCs die nicht für die FC-Analyse verwendet wurden, wurden in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Die Zellen wurden über 1-2 Passagen weiter kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 90-100% erreichten. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA Lösung aus der Zellkulturflasche gelöst und automatisiert gezählt. Die Zellen wurden in einem Totalvolumen von 100 µl PBS resuspendiert und es wurde 1 µl Aqua-Zombie™ hinzugegeben. Anschließend wurde das Zellgemisch für 15 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 1 ml Inkubationspuffer resuspendiert und bei 300×g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen.

Tab. 3.2: Antikörper-Mix für die Sortierung im Gesamtvolumen von 100 µl Inkubationspuffer

Antikörper	Arbeitskonzentration (Verdünnung)
CD45 APC	4 µg/ml (1:50)
CD44 H-PE	0,6 µg/ml (1:333)
DDR2 (CD167b) Kaninchen polyklonal	2 µg/ml (1:50)

Der Antikörpermix wurde mit Inkubationspuffer auf ein Totalvolumen von 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen in diesen 100 µl resuspendiert und bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und bei 300×g für 10 Minuten (2-8°C) zentrifugiert (≙Waschschritt). Der entstandene Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Als sekundärer Antikörper wurde Alexa Fluor 488 Esel anti - Kaninchen mit einer Verdünnung von 1:300 verwendet. Dieser wurde mit Inkubationspuffer auf ein Totalvolumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe des sekundären Antikörpers zu den Zellen, wurden diese für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen. Der entstandene Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 300 µl MACS®-Puffer resuspendiert und vor der Sortierung durch ein 40 µm großes Zellsieb geleitet. Die MNCs wurden in der *Core Facility* für Zellsortierung und Zellanalyse der Universitätsmedizin Rostock (unter Leitung von Frau Prof. Dr. Müller-Hilke) durch Herrn Dr. Engelmann mittels FACSAria IIIu™ und der BD™ FACSDiva v.8.0.2 sortiert. Die sortierten vitalen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ - Subpopulationen wurden anschließend in 5 ml DMEM-10 Medium resuspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Es erfolgte eine entsprechende Re-Analyse der sortierten Zellpopulation. Die Ziel-MNCs wurden in DMEM-10 Medium für maximal 18 Passagen weiter kultiviert. Das Medium wurde alle 3-4 Tage gewechselt.

3.6 CFU-F - Assay

Zur Testung auf die Bildung klonogener Einheitsfibroblasten (*engl.* CFU-F), wurde die mittels FACS sortierte Zellpopulation in einer Dichte von 100, 500 und 1000 Zellen pro 1 cm^2 als Duplikat einer 6-Wellplatte ausgesät (siehe Abb. 3.5). Anschließend wurden die Zellen in 2 ml DMEM-10 Medium bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert.

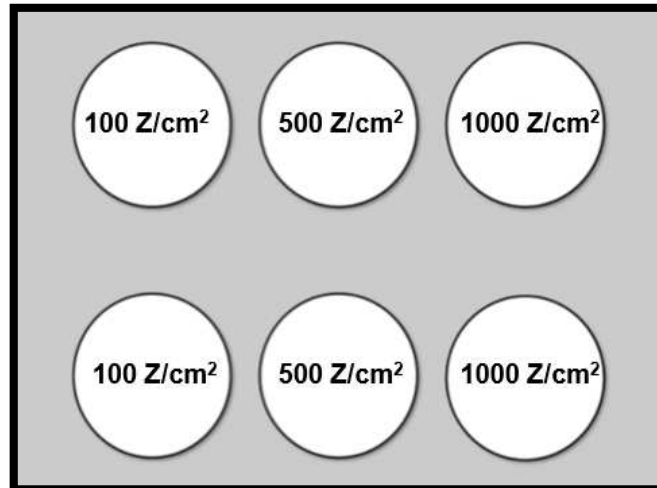


Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Zelldichte in der CFU-F Analyse. Mittels FACS sortierte kardiale $\text{CD45}^- \text{CD44}^+ \text{DDR2}^+$ MNCs wurden in 3 unterschiedlichen Zelldichten als Duplikat über 9 Tage auf einer 6-Wellplatte kultiviert.

Das Medium wurde nachfolgend alle 3 Tage gewechselt. Am 9. Tag wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Farbstoff Arbeitslösung, für eine bessere Auszählung der Kolonien, gefärbt. Dazu wurde das Medium aus den Wells abgenommen und die Zellen zweimal für eine Minute mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Methanol in die Wells gegeben und für 5 Minuten bei RT fixiert. Das Methanol wurde danach vollständig entfernt und die Zellen wurden unter Raumbedingungen an der Luft getrocknet. Der Giemsa-Farbstoff wurde in entionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 1:20 verdünnt. Anschließend wurde 1 ml der verdünnten Farbstoff-Lösung in jedes Well gegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach vollständiger Entfernung der Giemsa-Lösung wurden die Zellen zweimal mit 1 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Anschließend konnten die Kolonien direkt oder innerhalb von 3 Tagen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

3.7 Multipotente Differenzierung

Für die Testung der multipotenten Differenzierungskapazität der postischämischen kardialen $CD45^- CD44^+ DDR2^+$ MNCs der Ratte wurden Passageanzahlen zwischen 4 und 18 gewählt. Die Zellen wurden mit PBS für eine Minute gewaschen und anschließend bis zum Verlust der Adhärenz mit einer Trypsin/EDTA Lösung behandelt. Nach Zentrifugation bei $300\times g$ für 5 Minuten ($23^\circ C$) wurden die Zellen, unter Verwendung von Trypanblau-Farbstoff, unter dem Mikroskop gezählt.

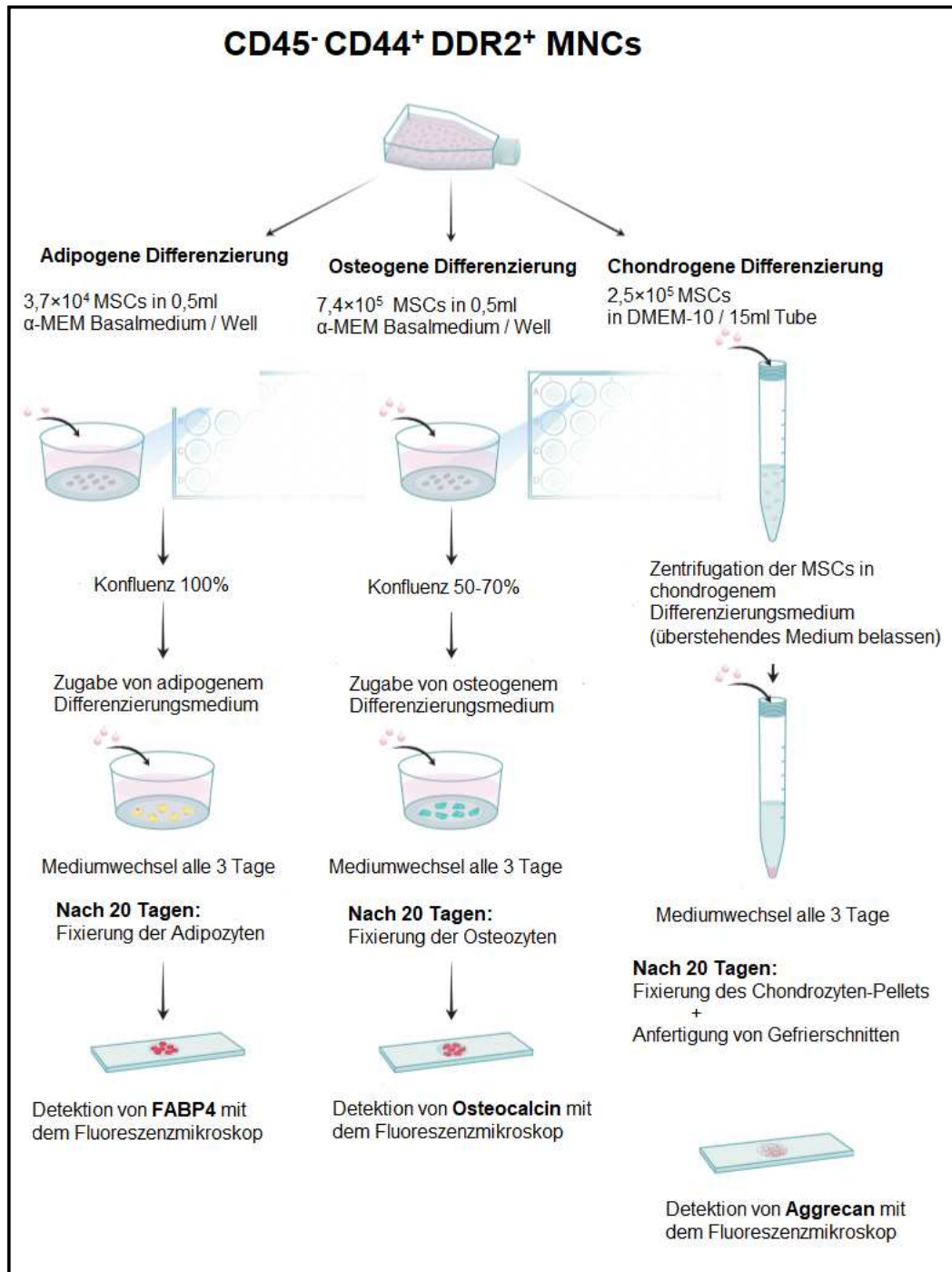


Abb. 3.6: Schematische Darstellung des Protokolls zur funktionalen Identifizierung mesenchymaler Stammzellen der Ratte. (modifiziert nach R&D-rat mesenchymal stem cell functional identification kit (SC020))

3.7.1 Adipogene Differenzierung

Zur Vorbereitung der adipogenen Differenzierung wurde ein steriles Deckgläschen (sterilisiert mit 95% Ethanol) in jedes zu verwendende Well einer 24-Wellplatte gelegt und mit 0,5 ml sterilem PBS bedeckt. Die schwimmenden Deckgläschen wurden dann vorsichtig unter Verwendung einer sterilen Pipettenspitze eingetaucht. Das PBS wurde entfernt, bevor mit dem adipogenen Differenzierungsprotokoll begonnen wurde.

Für die Differenzierung wurden $3,7 \times 10^5$ MNCs in 5 ml α -MEM Basalmedium (bestehend aus 90% α -MEM, 10% FBS und 1% Zellshield®) vorbereitet und anschließend 0,5 ml dieser Zellsuspension in jedes Well gegeben. Die Wellplatte wurde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Das α -MEM Basalmedium wurde alle zwei Tage ersetzt, bis eine Konfluenz von 100% erreicht wurde. Anschließend wurde das Medium durch 0,5 ml des adipogenen Differenzierungsmediums, zur Induktion der Adipogenese, ersetzt. Dieses wurde innerhalb der nächsten 20 Tage in dreitägigem Abstand gewechselt.

Nach 20 Tagen konnten die Adipozyten fixiert und für die Immunfärbung vorbereitet werden. Dazu wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml in PBS gepuffertem 4% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei RT fixiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit 0,5 ml 1% BSA in PBS für 5 Minuten gewaschen. Zunächst erfolgte die Permeabilisierung und Blockierung mit 0,5 ml Perm/Block Lösung: 0,3% Triton X-100, 1% BSA und 10% normalem Eselserum in PBS bei RT für 45 Minuten. Währenddessen wurde der anti-mFABP4-Antikörper in Antikörperarbeitslösung: 0,03% Triton X-100, 1% BSA und 10% normalem Eselserum in PBS bis zur einer Arbeitskonzentration von 10 µg/ml verdünnt. Parallel wurde eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) unter Zugabe der Antikörperarbeitslösung durchgeführt.

Nach dem Permeabilisieren und Blockieren erfolgte die Inkubation mit 300 µl der anti-mFABP4-Antikörper-Arbeitslösung pro Well über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurden die Zellen dann dreimal mit 0,5 ml 1% BSA in PBS für 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper Esel-anti-Ziege Alexa Fluor 488 wurde in 1% BSA in PBS auf eine Konzentration von 1:200 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl der Sekundärantikörper-Arbeitslösung pro Well im Dunkeln für 60 Minuten bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 ml BSA in PBS für 5 Minuten wurden die Zellen mit 1 ml PBS und daraufhin mit destilliertem Wasser equilibriert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Eindeckmedium (Fluoroshield®), welches DAPI enthielt, eingedeckt. Nach weiterer Trocknung unter RT wurden diese mit einem transparenten Nagellack versiegelt. Die gefärbten Deckgläschen konnten anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.7.2 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurde eine 24 Wellplatte mit sterilen Deckgläschen (sterilisiert mit 95% Ethanol) verwendet. Um eine bessere Adhärenz der Zellen zu erreichen wurden die Deckgläschen mit humanem Fibronektin beschichtet. Dazu wurden 0,5 ml einer Fibronektinlösung in einer Konzentration von 1 µg/ml (in PBS) in jedes Well gegeben und die Wellplatte bei 37°C über Nacht inkubiert. Auf die beschichteten Deckgläser wurden bis zum Beginn des Differenzierungsprotokolls jeweils 0,5 ml PBS gegeben und die Platte bei 37°C im Inkubator gelagert. Bevor das osteogene Differenzierungsprotokoll startete wurde das PBS entfernt.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von $7,4 \times 10^5$ in α -MEM Basalmedium ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei einer Konfluenz von etwa 50 bis 70% wurde das Basalmedium durch das osteogene Differenzierungsmedium, zur Induktion der Osteogenese, ersetzt. Dieses wurde für die nächsten 20 Tage in dreitägigem Abstand gewechselt. Nach 20 Tagen konnten die Zellen fixiert und für die Immunfärbung vorbereitet werden. Hierfür wurden die Zellen zweimal in 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 ml 4% Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach fand ein dreimaliges Waschen mit 0,5 ml 1 % BSA in PBS für 5 Minuten statt. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 ml Perm/Block Lösung bei RT für 45 Minuten permeabilisiert und blockiert. Währenddessen wurde der anti-hOsteocalcin-Antikörper in Antikörperarbeitslösung bis zu einer Arbeitskonzentration von 10 µg/ml verdünnt. Parallel wurde eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) nur mit Antikörperarbeitslösung angefertigt.

Die Zellen wurden nach dem Permeabilisieren und Blockieren mit 300 µl anti-hOsteocalcin-Antikörper-Arbeitslösung pro Well für eine Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit 0,5 ml 1% BSA in PBS für 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper Eesel-anti-Maus Alexa Fluor 488 wurde in 1% BSA in PBS auf eine Konzentration von 1:200 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl der Sekundärantikörper-Arbeitslösung pro Well im Dunkeln für 60 Minuten bei RT inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann wie oben beschrieben für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

3.7.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in DMEM-10 Medium in ein 15 ml Röhrchen aliquotiert und für 5 Minuten bei $200 \times g$ (23°C) zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und die Zellen in 1 ml DMEM / F-12-Basalmedium (bestehend aus 99% D-MEM/F-12, 1% IST-Supplement und 1% Zellshield®) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert und das Medium verworfen. Die Zellen wurden dann in 0,5 ml chondrogenem Differenzierungsmedium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde nicht entfernt und das Zellpellet nicht resuspendiert. Die Kappe des 15 ml Röhrchens wurde etwas gelöst, damit ein Gasaustausch ermöglicht wurde. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Das Medium wurde für die nächsten 20 Tage, alle 3 Tage durch 0,5 ml frisches chondrogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Nach 20 Tagen konnte das Chondrozytenpellet fixiert und für die weitere Verarbeitung mittels Kryostat genutzt werden. Hierfür wurde das Pellet zweimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde es mit 0,5 ml gepuffertem 4% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei RT fixiert. Darauf folgte ein zweimaliges Waschen mit 1 ml PBS für 5 Minuten. Zunächst wurde das Pellet im O.C.T. Eindeckmedium eingebettet und bei -80°C luftdicht gelagert. Von dem eingebetteten Chondrozytenpellet wurden mittels Kryostat 5-10 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgetragen. Daraufhin wurde mit einem Flüssigkeitsbarrierestift eine hydrophobe Barriere um jeden Schnitt auf dem Objektträger gezeichnet, um das Auslaufen der Lösung zu vermeiden. Hiernach wurden die Pellet-Schnitte mit 150 μl Perm/Block Lösung bei RT für 45 Minuten permeabilisiert und blockiert. Währenddessen wurde der anti-hAggrecan-Antikörper in Antikörperarbeitslösung auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Parallel wurde eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) nur mit Antikörperarbeitslösung angefertigt.

Weiterhin wurden die Schnitte mit der anti-hAggrecan-Antikörper-Arbeitslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Schnitte dreimal mit PBS/1% BSA Puffer für 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper Esel-anti-Ziege Alexa Fluor 488 wurde in PBS/1% BSA auf 1:200 verdünnt. Hiernach wurden die Schnitte mit der Sekundärantikörper-Arbeitslösung im Dunkeln für 60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte erst dreimal mit PBS/1% BSA für 5 Minuten und dann einmalig mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Deckgläschen wurden daraufhin wie oben beschrieben für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung vorbereitet.

3.8 Kardiomyogene Differenzierung

Die kardiomyogene Differenzierung von kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs wurde in Co-Kultur mit neonatalen murinen Kardiomyozyten getestet. Wie bei Lemcke *et al.* [201] beschrieben, wurde hier ein Co-Kultursystem verwendet, um das kardiale Transdifferenzierungspotential der kardialen MSC-Subpopulation zu untersuchen.

Die neonatalen murinen Kardiomyozyten wurden in unserem Labor von Herrn Dr. Lemcke unter standardisierten Bedingungen aus neonatalen Mäusen des *Naval Medical Research Institute* (engl. NMRI) extrahiert. In Kürze: das Myokardgewebe wurde in rund 1 mm³ große Stücke geschnitten, mittels einer kommerziell verfügbaren Enzymlösung verdaut (*Primary Cardiomyocyte Isolation Kit*, Thermo Fischer Scientific) und gemäß den Anweisungen des Herstellers weiterverarbeitet. Die erhaltende Zellsuspension wurde 90 Minuten auf nicht beschichteten Zellkulturgefäßen inkubiert, um die Adhärenz von Nicht-Kardiomyozyten zu ermöglichen. Anschließend wurden die nicht adhätierenden Kardiomyozyten gesammelt und 10 Minuten bei 300×g zentrifugiert. Die Kardiomyozyten wurden auf gelatinebeschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert und in DMEM-10 Medium gehalten [202]. Die kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs der Ratte wurden zur späteren Lokalisation mit 15 nM des Qtracker® 565 *Cell Labeling Kits* markiert. Kontrollen wurden dabei nur mittels Qtracker®, aber ohne Antikörperfärbung, markiert. Die Co-Kultur von Ratten-MSCs mit neonatalen Kardiomyozyten der Maus wurde mit EPO (100 U/ml) ergänzt und hinsichtlich unterschiedlicher Konditionierungszeiten (1 oder 7 Tage) gegen eine nicht stimulierte Co-Kultur und nicht stimulierte MSC-Monokultur kontrolliert. 7 Tage erwiesen sich dabei als zeitlich begrenztes Intervall, um eine stabile Co-Kultivierung der MSCs mit murinen neonatalen Kardiomyozyten zu gewährleisten.

Kardiale MSCs wurden zusammen mit neonatalen Kardiomyozyten im Verhältnis 1:60 in DMEM-10 Medium kultiviert. Die Monokultur kardialer MSCs enthielt dementsprechend die gleiche Anzahl an Zellen ($2,5 \times 10^4$). Das DMEM-10 Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Dabei erhielt die eintägig stimulierte EPO-Gruppe nur am 1. Tag und die siebentägig stimulierte EPO-Gruppe täglich über 7 Tage eine EPO-Supplementierung in das DMEM-10 Medium. Nach 7 Tagen wurden die Zellen mit 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert und in 0,2% Triton-X in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Für die Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 60 Minuten unter RT mit PBS/1% BSA Puffer inkubiert.

Für die Immunfärbung wurden die Primärantikörper gegen Nkx2.5 und GATA4 in PBS/1% BSA auf eine Arbeitskonzentration von 1:100 verdünnt. Anschließend wurde die Zellen mit der Antikörperarbeitslösung für 60 Minuten unter RT inkubiert. Die Zellen wurden dann zweimal mit 0,2% BSA in PBS für 5 Minuten gewaschen. Die sekundären Antikörper (siehe Tabelle 3.3 und 3.4) wurden in PBS/1% BSA auf eine Konzentration von 1:300 verdünnt und für 45 Minuten

mit den Zellen bei RT inkubiert. Parallel wurde eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) nur mit Sekundärantikörperarbeitslösung angefertigt.

Tab. 3.3: *Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur kardiomyogenen Differenzierung – GATA4*

Primär-/Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung	Wirt
GATA4	-	1:100	Ratte
Sekundär anti-Ratte	Alexa Fluor 647	1:300	Esel

Tab. 3.4: *Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur kardiomyogenen Differenzierung – Nkx2.5*

Primär-/Sekundärantikörper	Konjugat	Verdünnung	Wirt
Nkx2.5	-	1:100	Ziege
Sekundär anti-Ziege	Alexa Fluor 488	1:300	Esel

Nach zweimaligem Waschen mit 0,2% BSA in PBS für 5 Minuten wurden die Zellen mit 1 ml PBS und daraufhin mit destilliertem Wasser equilibriert. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Eindeckmedium (Fluoroshield®), welches DAPI enthielt, eingedeckt. Nach weiterer Trocknung unter RT wurden diese mit einem transparenten Nagellack versiegelt. Die gefärbten Deckgläschen konnten anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Die relativen Fluoreszenzsignalintensitäten von intranukleärem Nkx2.5 und GATA4 in Qtracker®-markierten kardialen MSCs wurden unter standardisierten Einstellungen eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops und Anwendung der ZEN 2011-Software quantifiziert. Für eine eindeutige MSC-Identifizierung wurde eine sorgfältige Untersuchung auf definitive zytosolische Qtracker®-Expression und einen Kernzelldurchmesser >10 µm durchgeführt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten von MSCs aus Co-Kulturen mit und ohne entsprechender EPO-Supplementierung wurden in mindestens 50 „*High Power Fields*“ (engl. HPF's) bei 400-facher Vergrößerung pro Kulturgruppe gegen die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten von MSCs aus Monokulturen verglichen.

3.9 Angiogenese-Tube-Formation-Assay

Für die Untersuchung auf das angiogene Potential der isolierten MSC-Population kamen humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*engl.* HUVECs) zum Einsatz. Die Zellen wurden durch ein modifiziertes Kollagenase-Verdauungsprotokoll aus Nabelschüren, gesunder aufgeklärter Frauen isoliert [203, 204]. Die Ethikkommission der Universität Rostock hat diese Isolation genehmigt (Register-Nr. A 2011 06, verlängert am 23. September 2013).

HUVECs wurden in EGM-2 Medium bei 37°C in einer feuchten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Passageanzahlen 1-3 der HUVECs wurden verwendet. Nachdem eine 80-90% Konfluenz erreicht wurde, wurden die HUVECs kurz trypsinisiert, mit komplettem EGM-2 Medium gewaschen und für 10 Minuten bei 300×g zentrifugiert.

Für den Angiogenesetest wurden 24-Wellplatten mit je 300 µl 4°C kaltem Matrigel® pro Vertiefung beschichtet und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In Vorversuchen wurde zuvor die vitale Toleranz der HUVECs unter Zugabe von DMEM-10 Medium getestet und als optimal bestätigt.

Vor dem Start des Angiogenesetests wurden jeweils $3,5 \times 10^4$ HUVECs, in warmem DMEM-10 Medium, in die Matrigel®-beschichteten Vertiefungen gegeben. Zum Testen des direkten Zell-Zell-Kontakts auf die Netzwerkbildung wurden CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs in DMEM-10-Medium im Verhältnis 1:4 (MSCs:HUVECs) zugegeben. Das „konditionierte DMEM-10 Medium“ wurde hergestellt, in dem kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs der Ratte über 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Das Medium wurde anschließend abgenommen und für die Angiogenese-Versuche verwendet.

Die Untersuchungen wurden in Bezug auf fünf verschiedene Ansätze von Kulturbedingungen durchgeführt, wie in der Tabelle 3.5 dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Wells pro Gruppe betrug 4.

Tabelle 3.5: Gruppen mit Bezeichnung und Kulturansätzen

Gruppenname	Kulturansatz
HUVEC-Kontrolle	HUVECs in DMEM-10
HUVECs + MSC	HUVECs in Co-Kultur mit kardialen CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ MSCs der Ratte
Konditioniertes DMEM-10	HUVECs in konditioniertem DMEM-10

DMEM-10 + EPO	HUVECs in DMEM-10, ergänzt mit EPO in einer Konzentration von 100 U/ml
Konditioniertes DMEM-10 + EPO	HUVECs in konditioniertem DMEM-10, ergänzt mit EPO in einer Konzentration von 100 U/ml

Die Kulturansätze wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Angiogenese unter Verwendung von Phasenkontrastmikroskopie und Konfokalmikroskopie qualitativ auf die Bildung von Endotheltubuli und -netzwerken untersucht. Die Anzahl der Zellverzweigungen (*branches*) und Knotenpunkte (*junctions*), sowie die Länge der Endothelverzweigungen pro HPF mit 100-facher Vergrößerung wurde quantitativ durch computergestützte Planimetrie mit der ImageJ-Software in sechs zufällig ausgewählten Feldern pro Well analysiert.

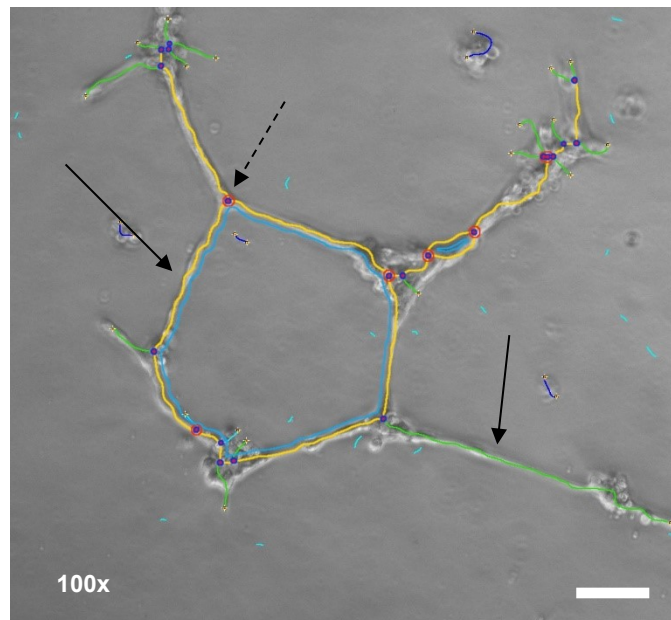


Abb. 3.7: Beispielhafte Darstellung der Auswertung eines Endothelzellnetzwerkes (HUVECs) mittels ImageJ-Software. (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Durchlichtmikroskop, 100x)
 Maßstabsleiste: 100 µm
 Pfeile: Verzweigungen (*branches*)
 gestrichelter Pfeil: Knotenpunkt (*junction*)

3.10 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde die SigmaStat-Software 3.5 verwendet. Die aufgeführten Ergebnisse der Figuren sind als Mittelwert \pm Standardfehler (MW \pm StF) oder als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm StAbw) aufgeführt. Die Daten wurden auf Normalverteilung mittels Kruskal-Wallis-Test geprüft. Um die verschiedenen Untersuchungsgruppen auf Signifikanz zu prüfen wurde das *one-way* ANOVA-Verfahren mit post-hoc Tests (Holm-Sidak-Test und Dunn-Test) verwendet. p-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Standardisierte Isolation und Kultivierung früh-ischämischer kardialer MNCs

Im Rahmen dieser Arbeit sollte vorrangig ein Protokoll für die Isolation und die anschließende Kultivierung einer mononukleären Zellpopulation aus dem Rattenherz etabliert werden. Basierend auf den Protokollen, die in den Forschungslaboren der Herzchirurgie zum Beginn dieser Doktorarbeit bereits vorlagen, wurde als Ergebnis ein modifiziertes Isolationsprotokoll für kardiale MNCs erfolgreich erstellt (siehe auch Abb. 3.4).

Aufbauend auf den oben beschriebenen erfolgten Beobachtungen und aufgrund der ausgeprägten Adhärenz wurden die frisch extrahierten MNCs erstmal unter standardisierten Bedingungen bei 5% CO₂ und 37°C in DMEM-10 Medium für 1-2 Passagen kultiviert. Nachfolgende durchflusszytometrische Analysen dieser MNCs zeigten keine Unterschiede im Oberflächenexpressionsprofil im Vergleich zu unmittelbar nach Isolation analysierten MNCs. Darüber hinaus konnte nach 1-2 Passagen, die aus dem passagierten Zellgemisch durchgeführte Zellsortierung mittels FACS erfolgreich durchgeführt werden. Bemerkenswerterweise hatte dieser Vorgang keinen negativen Einfluss auf die weitere Kultivierung der sortierten CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation. Die Zellen konnten unbeeinträchtigt unter den oben genannten Kulturbedingungen langfristig stabil bis zu 18 Passagen kultiviert werden.

Das verwendete Protokoll ermöglicht, unter Beachtung spezifischer Wachstumseigenschaften von MNCs, die standardisierte Isolation und langzeitstabile Kultivierung *in vitro*.

4.2 Durchflusszytometrische Analyse und Sortierung

Die durchflusszytometrische Analyse der frisch isolierten kardialen MNCs ergab, dass die CD45⁺ Zellfraktion 24 Stunden nach dem operativen Eingriff um $1,6 \pm 1,1\%$ in der *Sham*-Gruppe und um $4,2 \pm 2,6\%$ in der MI-Gruppe angestiegen war. Diese erhöhte Expression (~2,6-fach) in der MI-Gruppe ist auf eine verstärkte Aktivierung der Entzündungsphase, mit der Infiltration von MNCs zurückzuführen.

Die kardiale CD45⁻ MNC-Fraktion zeigte zwar jeweils einen Abfall in der MI-Gruppe im Vergleich zur *Sham*-Gruppe. Dennoch zeigten Analysen der MNC-Subfraktionen klare Trends für eine erhöhte CD45⁻ CD44⁺ und CD45⁻ DDR2⁺ Expression 24 Stunden nach MI. Die Subfraktionen CD45⁻ CD44⁺ und CD45⁻ DDR2⁺ hatten sich in der MI-Gruppe im Vergleich zur *Sham*-Gruppe 24 Stunden nach MI um das 1,9- bzw. 2,1-fache erhöht (siehe Abb. 4.1).

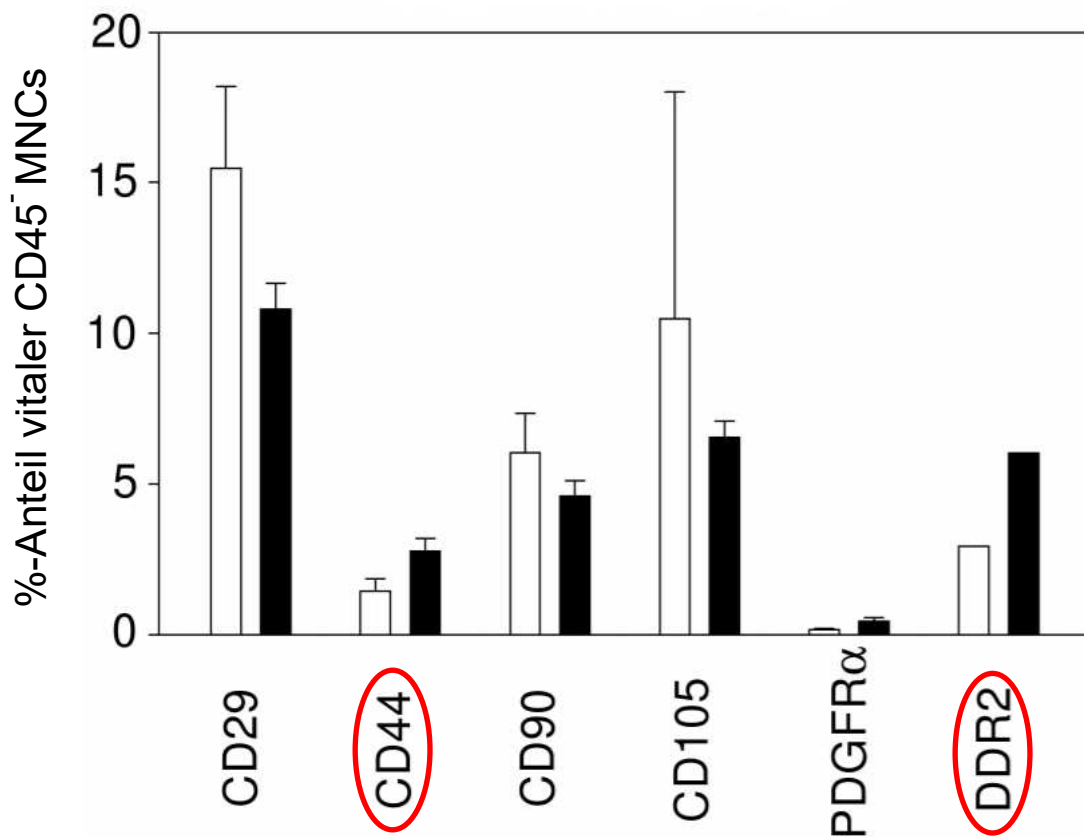


Abb. 4.1: Durchflusszytometrische-Analyse der verschiedenen MNC-Subpopulationen 24 Stunden nach der Operation. 24 Stunden nach der Operation zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression der CD45⁺ CD44⁺ und CD45⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulationen innerhalb der MI-Gruppe, im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; n=2

Basierend auf der erhöhten Expression wurde mittels FACS-Sorter eine gezielte Sortierung der kardialen CD45⁺ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation durchgeführt. Diese ließ sich unabhängig von der Passageanzahl bei 5% CO₂ und 37°C langzeitstabil kultivieren. Die Zellpopulation wurde für nachfolgende Experimente verwendet.

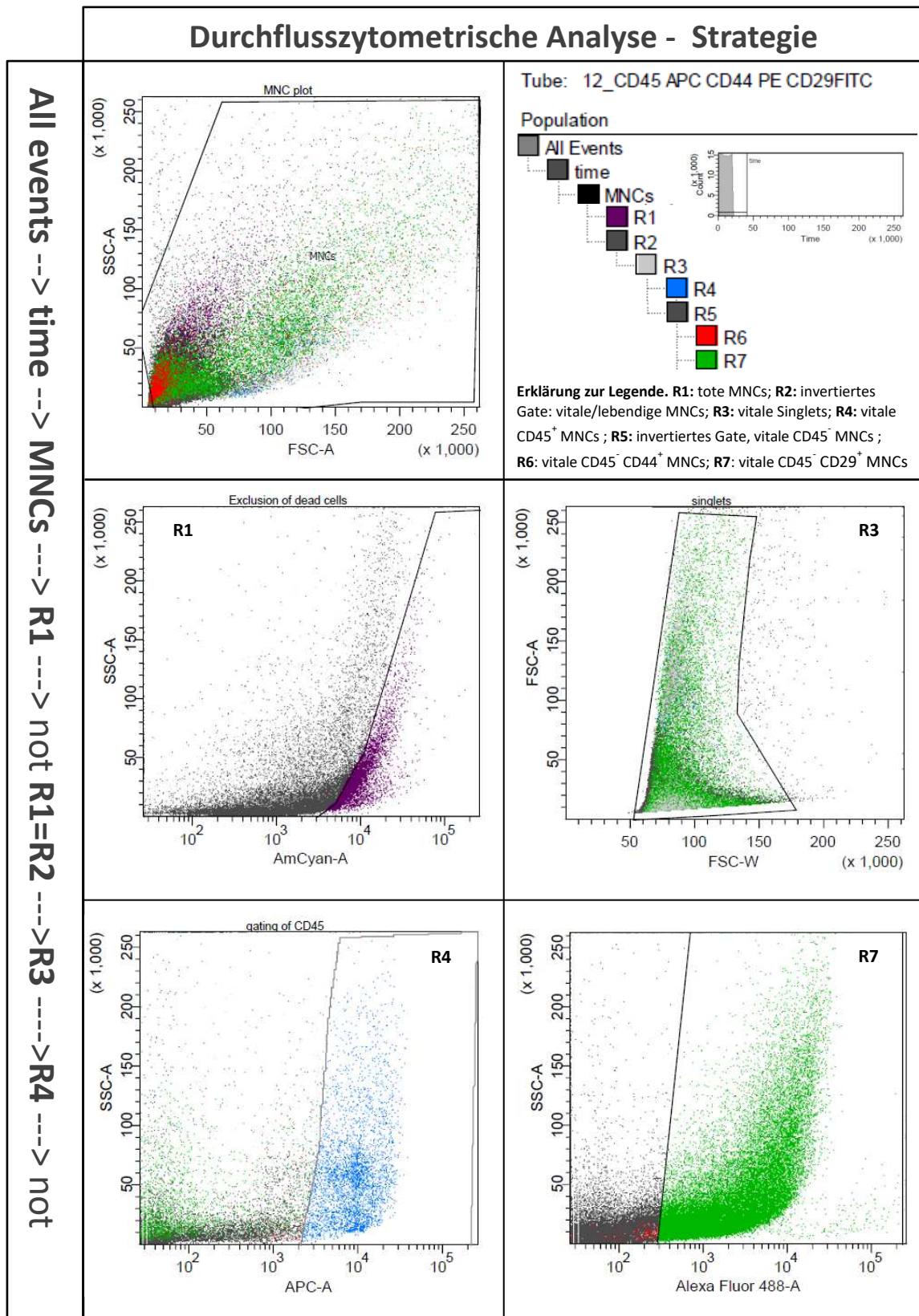


Abb. 4.2: Repräsentative Gating Strategie einer durchflusszytometrischen Analyse kardialer MNC Fraktion 24h post OP. Kardiale mononukleäre Zellen wurden 24 Stunden nach der Operation aus dem postischämischen Herzen der Ratte enzymatisch isoliert und direkt mittels Durchflusszytometrie analysiert. Alle Ereignisse wurden innerhalb des SSC vs. FSC Plots dargestellt (=MNCs). Anschließend wurden die vitalen Zellen (=R2) durch Invertieren der Region R1 (=tote Zellen) ausgewählt, gefolgt vom Einschluss der vitalen Singlets (=R3).

Die, durch das weitere Invertieren der Region R4, vitalen CD45⁺ MNCs wurden als Basis für die Analyse der Zielsubpopulation (R7) selektiert. Gezeigt ist hier eine vitale CD45⁻ CD29⁺ MNC-Subpopulation, R7.

AmCyan- Fluorochrom, Leben-Tod Farbstoff, Zombie-Aqua; APC – Allophycocyanin Flurochrom, CD45; Alexa Fluor 488 – Fluorochrom, z.B. CD29

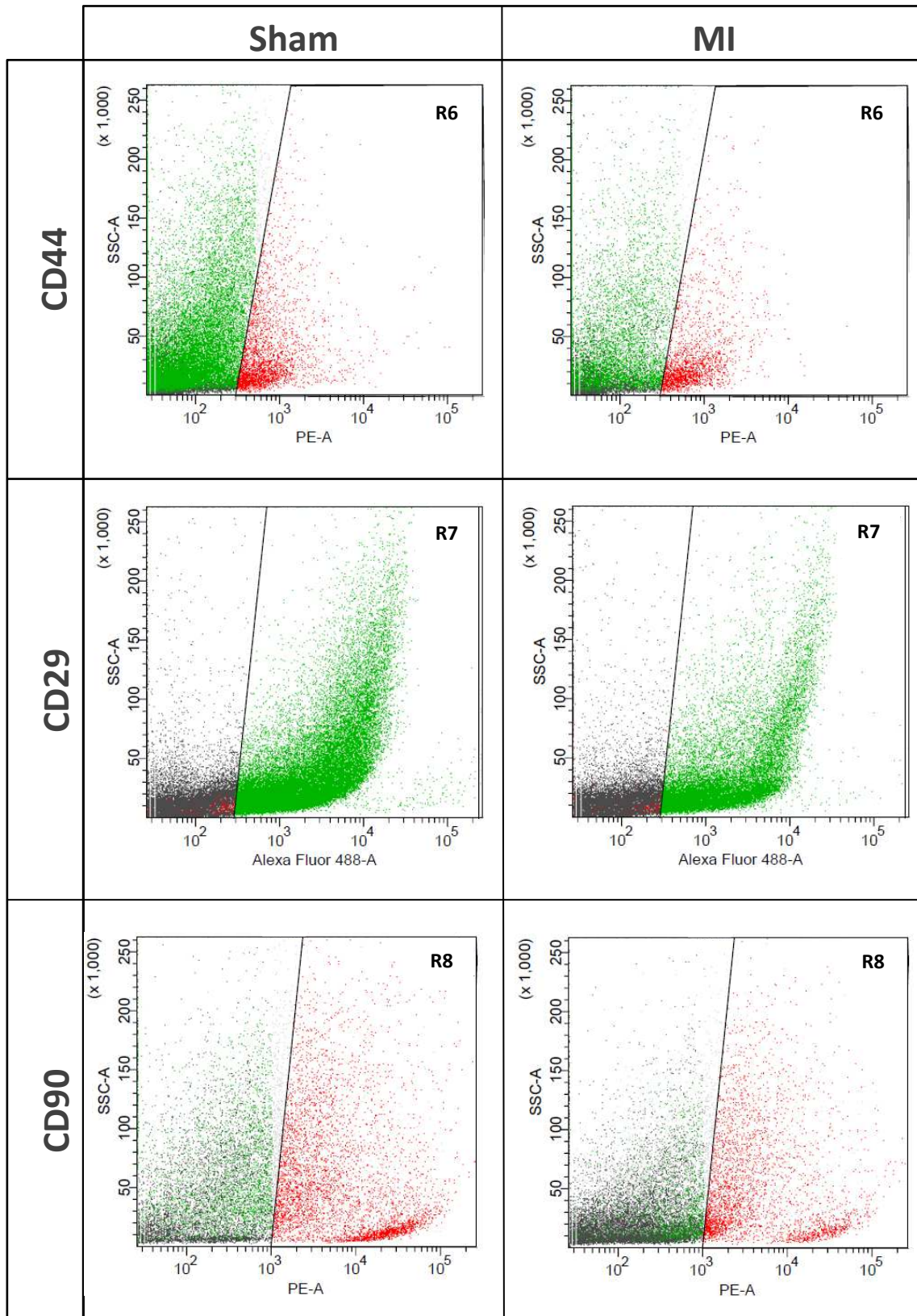


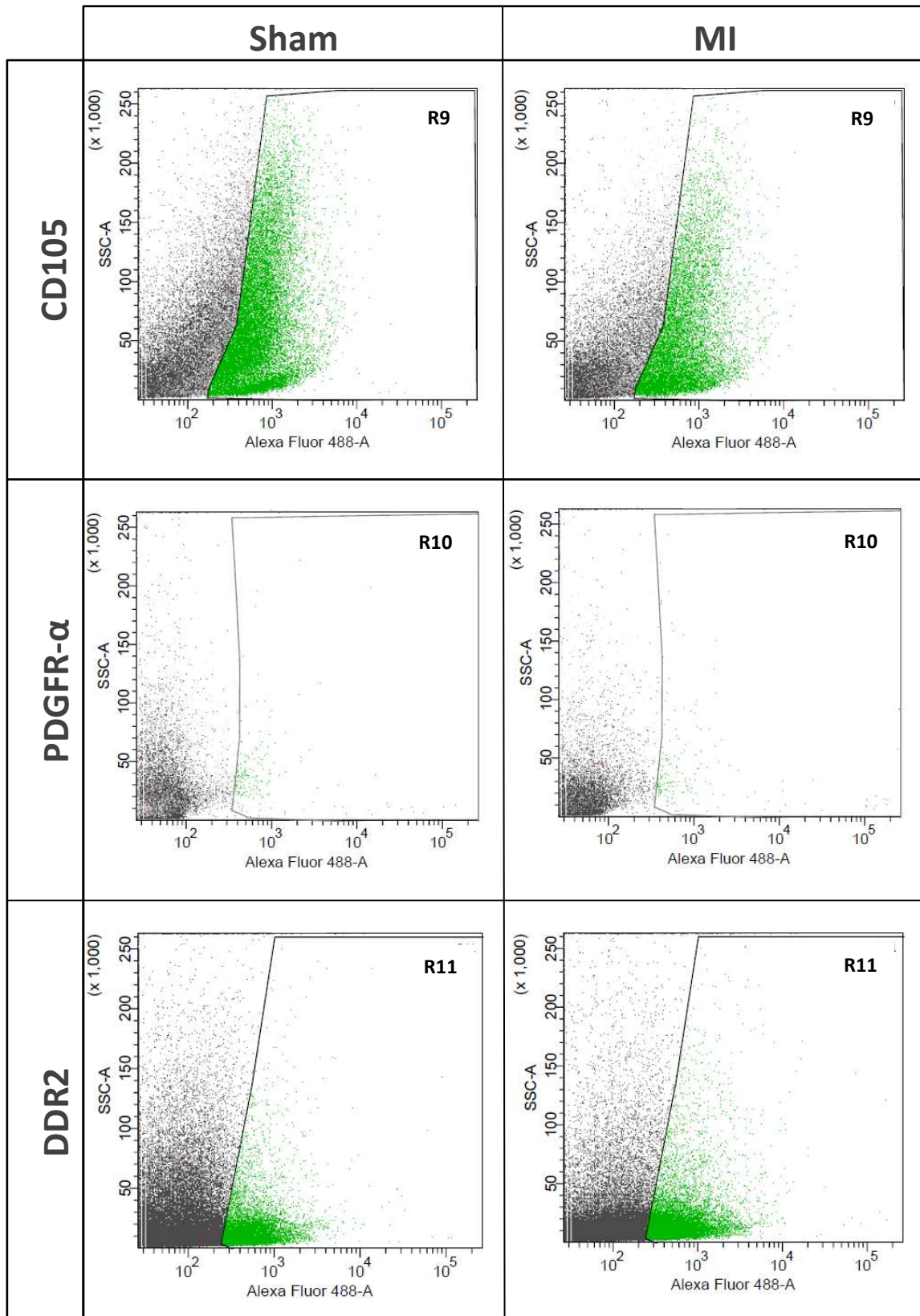
Abb. 4.3: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellungen der kardialen Zielsubpopulationen 24h nach operativem Eingriff (Sham vs. MI).

Die vitalen kardialen Zielsubpopulationen wurden auf der Basis der Gating Strategie (siehe Abb. 4.2) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

R6 – vitale CD45⁻ CD44⁺

R7 – vitale CD45⁻ CD29⁺

R8 – vitale CD45⁻ CD90⁺



Fortsetzung der Abbildung 4.3:

Die vitalen kardialen Zielsubpopulationen wurden auf der Basis der Gating Strategie (siehe Abb. 4.2) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

R9 – vitale CD45⁺ CD105⁺

R10 – vitale CD45⁺ PDGFRα⁺

R11 – vitale CD45⁺ DDR2⁺

4.3 CFU-F Bildung

Die kardiale $CD45^- CD44^+ DDR2^+$ MNC-Subpopulation entwickelte in der Zellkultur fibroblastenähnliche klonogene Vorläufer (*engl.* CFU-F). Die beobachtete Bildung von klonogenen Vorläufern ließ sich dabei unabhängig von der Passageanzahl und der ausgesäten Zelldichte nachweisen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mit zunehmender Dichte der ausgesäten Zellen die Anzahl an gebildeten Kolonien stieg.

Repräsentativ wird hier eine CFU-F Bildung bei der Passage 18 der Zielsubpopulation dargestellt:

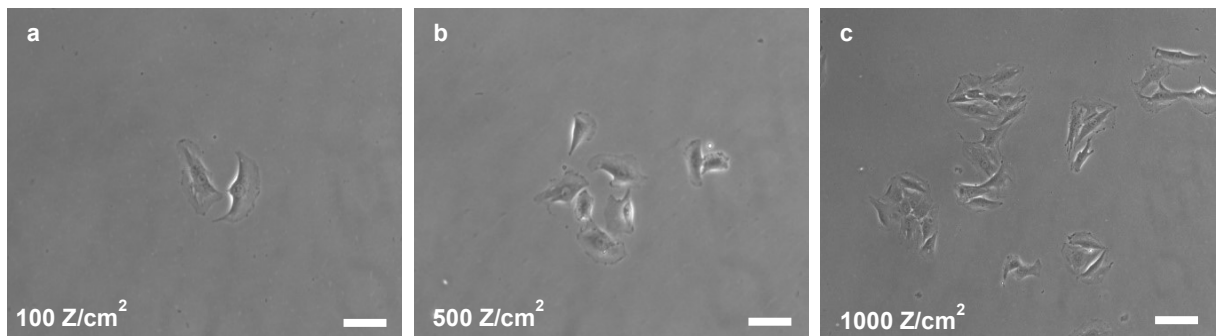


Abbildung 4.4 a-c: Ausgangssituation der Koloniebildung in Abhängigkeit der Zelldichte. Die kardialen $CD45^- CD44^+ DDR2^+$ Zellen wurden bei 100 Zellen/cm², 500 Zellen/cm² sowie 1000 Zellen/cm² ausgesät und einen Tag später mittels Kontrastverfahren aufgenommen. (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Durchlichtmikroskop, 100x)
Maßstabsleiste: 100 µm

Am 9. Tag wurde das Experiment beendet, die Zellen fixiert und gefärbt. In allen 6 Wells konnte eine deutliche Koloniebildung nachgewiesen werden.

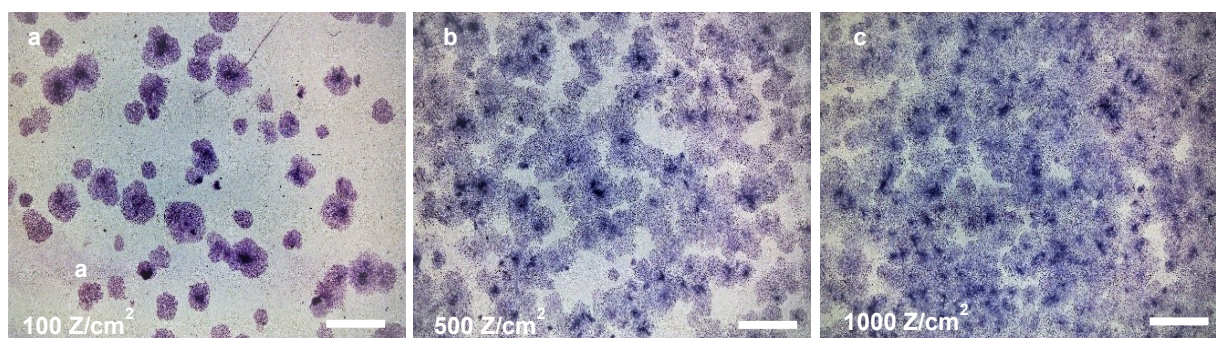


Abbildung 4.5 a-c: Lichtmikroskopische Darstellung der zelldichteabhängigen CFU-F Bildung. Die Kolonien wurden am 9. Tag des Versuchs mit Methanol fixiert und anschließend nach dem Giemsa-Färbeprotokoll gefärbt. Die Fotos wurden mittels Leica A-Plan Mikroskop bei 5-facher Vergrößerung (5x) aufgenommen.
Maßstabsleiste: 500 µm

Bei einer ausgesäten Zelldichte von 100 MNCs pro cm^2 konnte nach 9 Tagen eine mittlere Kolonieanzahl von 207,5 Kolonien / $9,6 \text{ cm}^2$ (\cong Well einer 6-Wellplatte) festgestellt werden. Bei Zelldichten von 500 und 1000 Zellen pro cm^2 konnte aufgrund der bereits fortgeschrittenen Konfluenz keine Auszählung einzelner Kolonien mehr vorgenommen werden.

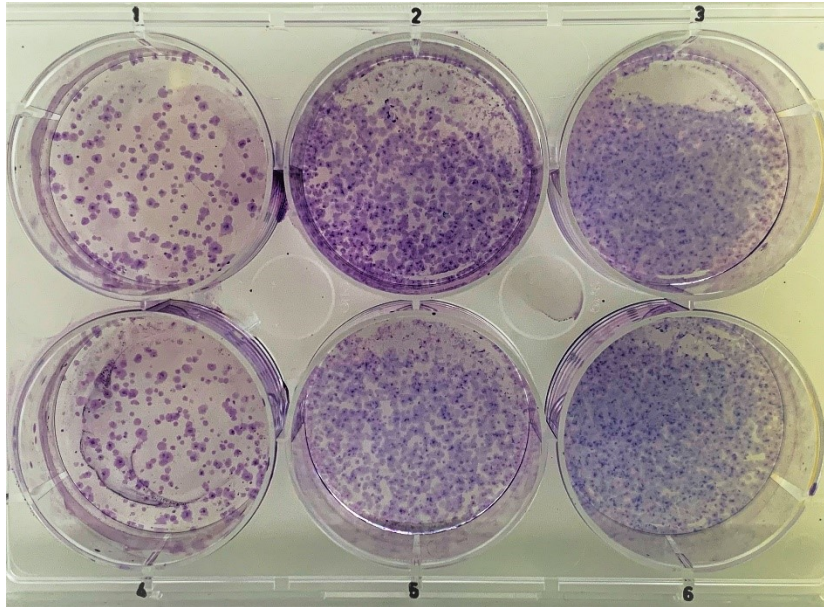


Abbildung 4.6: *Übersichtsaufnahme der CFU-F Bildung bei verschiedenen Zelldichten.*
(nach Tag 9; lila: Giemsa-Farbstoff).

Zelldichte: Well 1 und 4: 100 Zellen/ cm^2
Well 2 und 5: 500 Zellen/ cm^2
Well 3 und 6: 1000 Zellen/ cm^2

Durch die nachgewiesene ausgeprägte CFU-F Bildung, auch bei niedriger Aussaat der Zellen, erfüllt die kardiale $\text{CD45}^- \text{CD44}^+ \text{DDR2}^+$ MNC-Subpopulation eines der am frühesten definierten MSC-Kriterien nach Friedenstein [205].

4.4 Multipotente Differenzierungskapazität

Die isolierten MNCs zeigten *in vitro* die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung. Die Anzahl an Passagen war dabei nicht relevant. CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNCs zeigten in den entsprechenden funktionellen Differenzierungsmedien eine vollständige Differenzierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten.

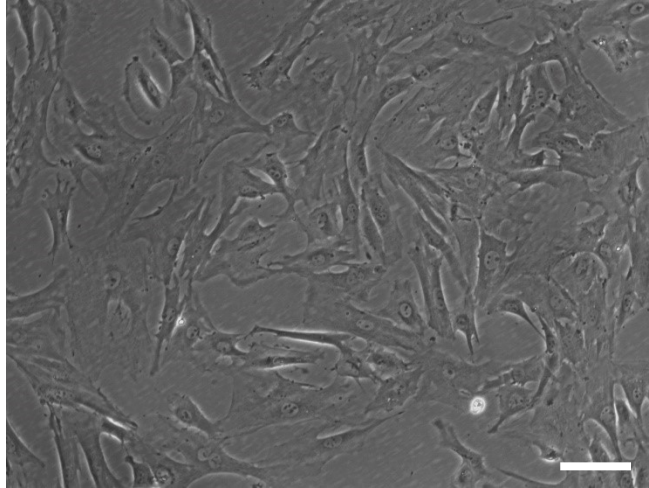


Abbildung 4.7: Kontrastaufnahme der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ Zellen vor der Induktion der multipotenten Differenzierung. (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Durchlichtmikroskop, 100x)
Maßstabsleiste: 100 µm

Die Bildung von Adipozyten konnte durch den optischen Nachweis großer Lipidvakuolen unter dem Mikroskop bestätigt werden (Abb. 4.8). Weiterhin belegte der positive Nachweis des „fatty acid binding protein 4“ (engl. FABP4) mit dem Fluoreszenzmikroskop die stattgehabte Differenzierung (Abb. 4.9). FABP4 ist ein Trägerprotein für Fettsäuren, das hauptsächlich in Adipozyten und Makrophagen exprimiert wird [206].

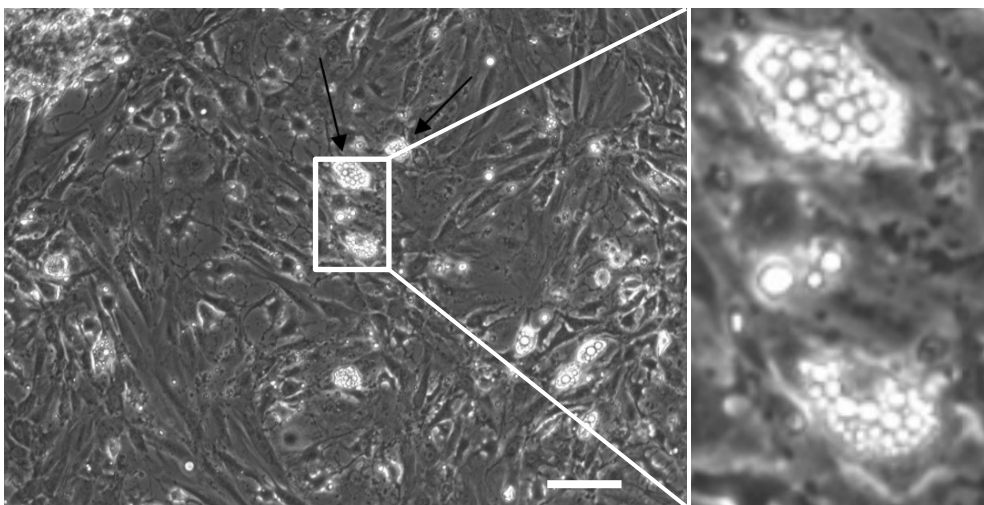


Abbildung 4.8: Kontrastaufnahme der adipogen differenzierten MSCs. Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation zeigt adipogene Differenzierungskapazität am 20. Tag der Differenzierung (Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Durchlichtmikroskop, 100x), Maßstabsleiste: 100 µm

Pfeile: Vakuolenbildung

rechtes Bild: repräsentative Darstellung der Vakuolen

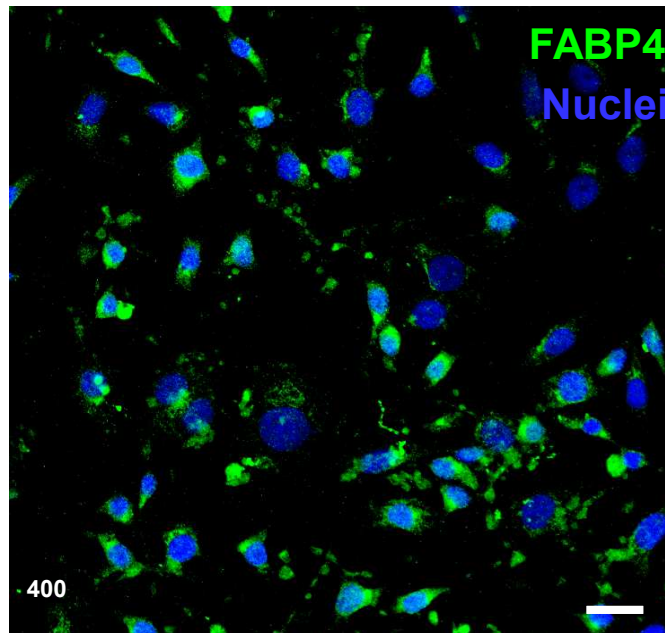


Abbildung 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der adipogen differenzierten MSCs. Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation zeigt am 20. Tag der Differenzierung eine Expression von FABP4. Die Fotos wurden mittels Konfokalem-Laser-Scanning-Mikroskop Elyra PS.1 aufgenommen. Maßstabsleiste: 10 μ m

Die Differenzierung in Osteozyten konnte durch den positiven Nachweis an Osteocalcin, mittels Fluoreszenzmikroskopie, erbracht werden (Abb. 4.10). Die Bildung von Osteocalcin lässt sich vorwiegend im, durch Osteoblasten gebildeten, Knochen nachweisen und ist ein Teil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix [207, 208].

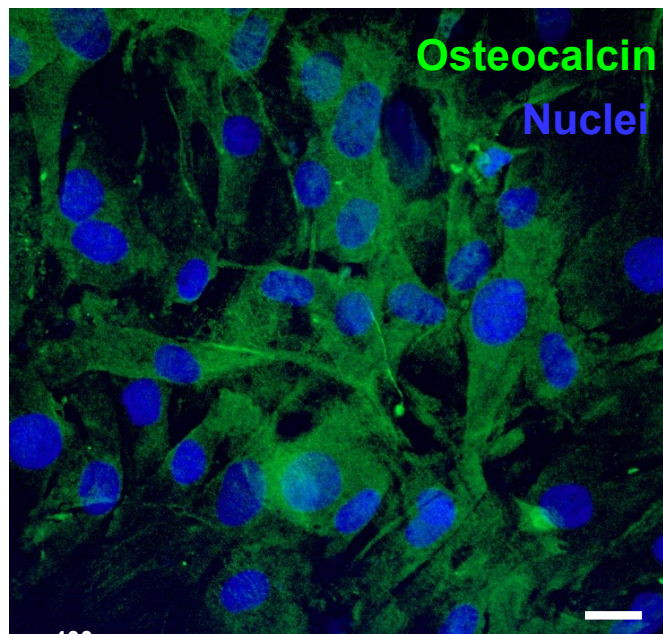


Abbildung 4.10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der osteogen differenzierten MSCs. Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation zeigt am 20. Tag der Differenzierung eine Expression von Osteocalcin. Die Fotos wurden mittels Konfokalem-Laser-Scanning-Mikroskop Elyra PS.1 aufgenommen. Maßstabsleiste: 10 μ m

Während des chondrogenen Differenzierungszeitraums bildete sich in dem 15 ml Röhrchen ein Knorpel-Pellet. In den mithilfe des Kryostats angefertigten Kryo-Pellet-Schnitten konnte, durch Immunfärbung, ein positiver Nachweis auf Aggrecan gezeigt werden (Abb. 4.11). Dieses Proteoglykan stellt einen Marker für die stattgefundene hyaline Knorpelbildung dar [209].

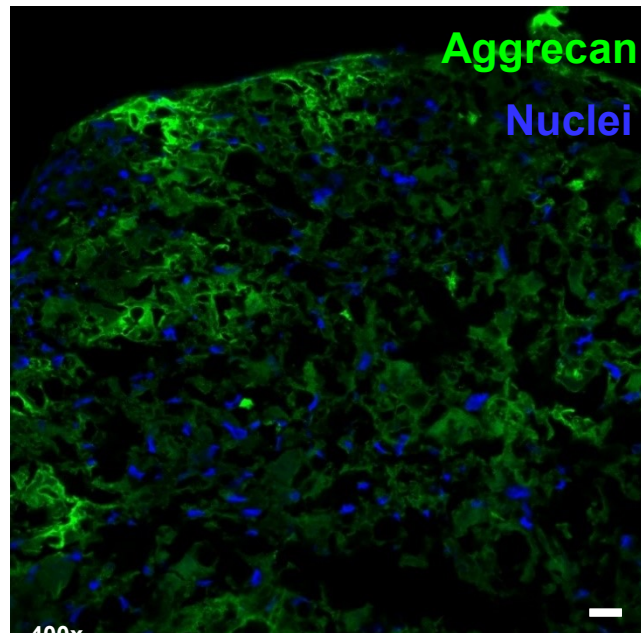


Abbildung 4.11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der chondrogen differenzierten MSCs.
Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC- Subpopulation zeigt am 20. Tag der Differenzierung eine Expression von Aggrecan. Die Fotos wurden mittels Konfokalem-Laser-Scanning-Mikroskop Elyra PS.1 aufgenommen.
Maßstabsleiste: 10 µm

Durch den Nachweis der ausgeprägten multipotenten Differenzierungskapazität der isolierten CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation, wird neben der CFU-F Bildung und phänotypischen Verifikation, ein weiteres wichtiges funktionelles Kriterium für die mesenchymale Stammzelldefinition erfüllt [128].

4.5 Kardiomyogene Differenzierung der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs

Auf Grundlage, der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Ergebnissen wurden die kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs weiter auf ihre funktionelle und therapeutische Kapazität untersucht.

Qtracker®-markierte ischämisch präkonditionierte CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs aus dem Ratteherz zeigten in einem Co-Kultur-Modell mit murinen neonatalen Kardiomyozyten die Fähigkeit zu einer kardiomyogenen Differenzierung. Dies wurde durch den Expressionsnachweis der frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA4 belegt (siehe Abb. 4.12).

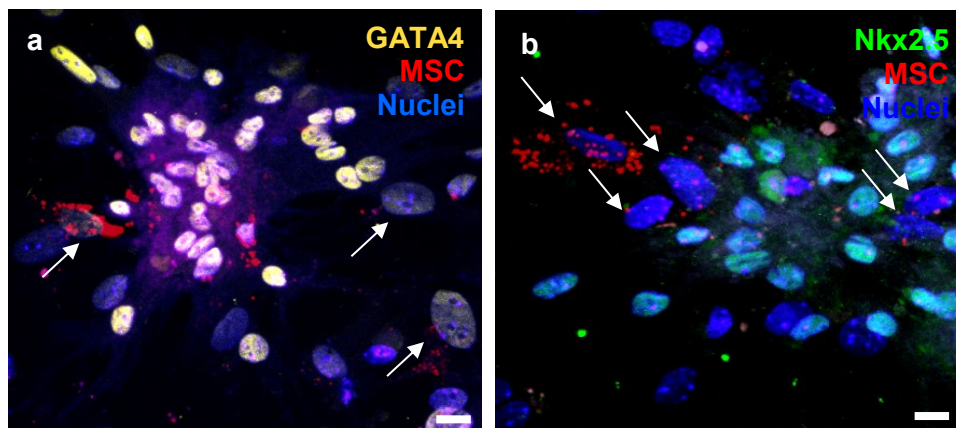


Abbildung 4.12 a, b: Repräsentative Bilder der Immunfärbung für den Expressionsnachweis der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 in Qtracker®-markierten MSCs.

Für die Darstellung wurden die Zellen zuerst mit Nkx2.5 und GATA4 Primärantikörpern und anschließend für die Visualisierung mit sekundären Antikörpern gefärbt. Die relativen Fluoreszenzsignalintensitäten von intranukleärem Nkx2.5 und GATA4 in Qtracker®-markierten MSCs (rot) wurden mittels konfokaler-Laser-Scanning Mikroskopie (Elyra PS.1) ausgewertet.

Die kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs (Pfeile) zeigten nach 7-tägiger Co-Kultur mit murinen neonatalen Kardiomyozyten eine deutliche Expression von GATA4 und Nkx2.5.

Maßstabsleiste: 10 µm

Die kardialen MSCs zeigten nach 7-tägiger Co-Kultur mit neonatalen murinen Kardiomyozyten sowohl ohne als auch unter EPO-Supplementierung eine signifikant erhöhte Expression von Nkx2.5 und GATA4 im Vergleich zur MSC-Monokultur. Die Expression dieser frühen kardialen Transkriptionsfaktoren konnte durch EPO noch gefördert werden. Es zeigte sich, dass die kontinuierliche EPO-Stimulation über 7 Tage die Nkx2.5-Signalintensität in Co-kultivierten MSCs, im Vergleich zur nicht stimulierten Co-Kultur, um das 1,6-fache erhöhte (siehe Abb. 4.13).

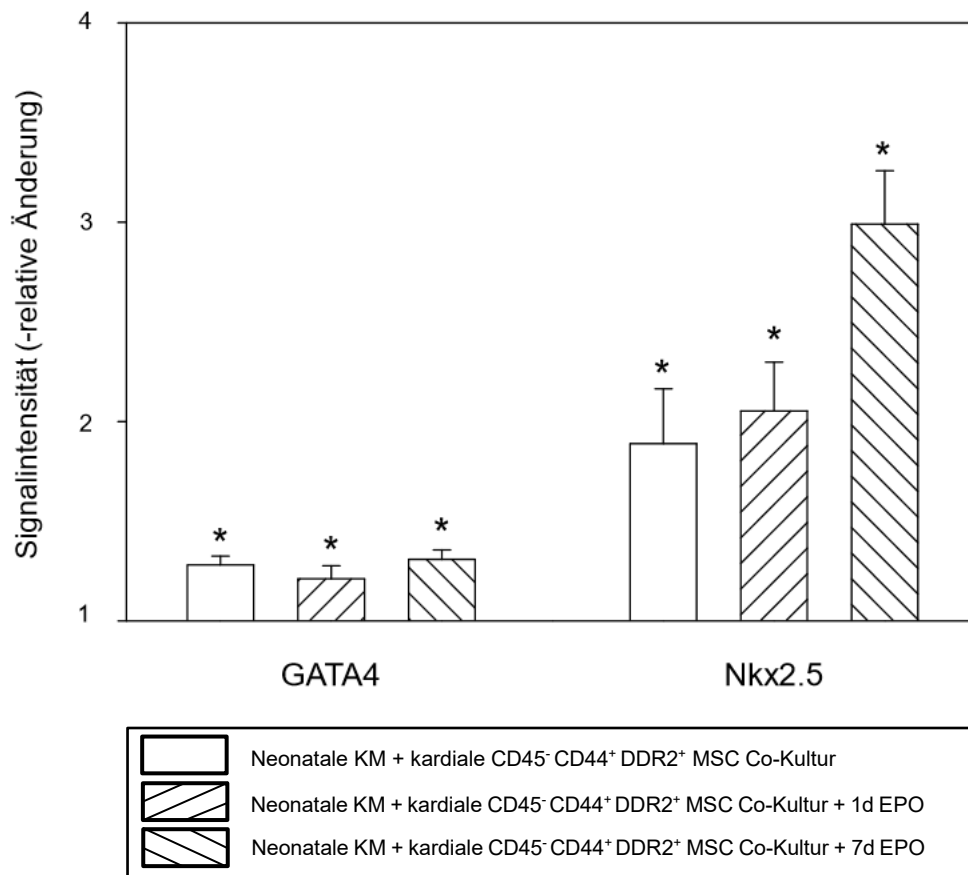


Abb. 4.13: Signalintensitäten der exprimierten kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA4.

Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zeigten nach 7-tägiger Co-Kultur mit murinen neonatalen Kardiomyozyten (KM) eine signifikant erhöhte Expression von GATA4 und Nkx2.5 im Vergleich zur MSC-Monokultur. Eine über 7 Tage (7d) durchgeführte Supplementierung mit EPO förderte die Expression von Nkx2.5.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; $n=4$

* $p \leq 0,05$ versus Monokultur

Die Erkenntnis, dass die ischämisch präkonditionierten CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs die Fähigkeit besitzen, in einer myokardialen Umgebung frühe kardiale Transkriptionsfaktoren zu exprimieren, liefert einen wichtigen Hinweis auf mögliche therapeutische Effekte dieser mesenchymalen Zellen.

4.6 Angiogenese durch CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs

In einem weiteren therapeutischen Modell wurden die proangiogenen Effekte der kardialen MSCs auf Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (*engl.* HUVECs) untersucht. Nach 24-stündiger Co-Kultur mit postischämischen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zeigten HUVECs eine signifikant gesteigerte Angiogenese, in Form einer klaren Bildung von Tubuli und Netzwerken.

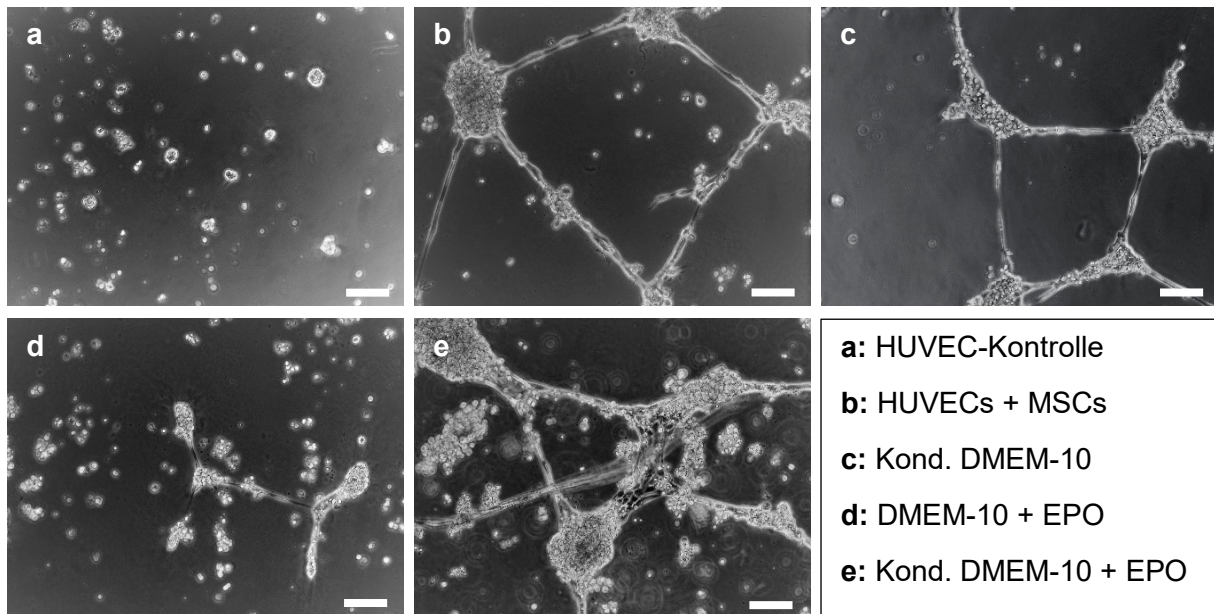


Abbildung 4.14 a-e: Lichtmikroskopische Aufnahme der Tubuli- und Netzwerkbildung der verschiedenen Kultursätze auf Matrigel®. Die Bildung von Zellverzweigungen und -knotenpunkten wurde sowohl durch den direkten Zell-Zell-Kontakt von MSCs und HUVECs (**b**), als auch durch parakrine Faktoren des konditionierten MSC-Mediums (**c**), im Vergleich zur HUVEC-Kontrolle (**a**), gefördert. Eine weitere Supplementierung des konditionierten Mediums mit EPO (**e**) konnte die proangiogenen MSC-Effekte noch unterstützen.
(Carl Zeiss Axiovert 40 CFL Durchlichtmikroskop, 100x)
Maßstabsleiste: 100 µm

Die Bildung von Verzweigungs- und Knotenpunkten erhöhte sich um das 3,4-fache bzw. 4,5-fache im Vergleich zur einer kaum wahrnehmbaren Angiogenese in einer nicht stimulierten HUVEC-Monokultur (=HUVEC-Kontrolle). In den verbleibenden stimulierten HUVEC-Monokulturen wurde die Angiogenese aktiviert. Eingehende Analysen zeigten insbesondere in der mit EPO und MSC-konditioniertem Medium (=Kond. DMEM-10 + EPO) ergänzten HUVEC-Monokultur eine gesteigerte Bildung von Zellverzweigungen und -netzwerken. MSC-konditioniertes Medium (=Kond. DMEM-10) und EPO-supplementiertes Medium (=DMEM-10 + EPO) zeigten eine ähnliche Angiogenese-Induktion in Form von HUVECs-Verzweigungen und Knotennetzwerken im Vergleich zur nicht stimulierten HUVECs-Monokultur.

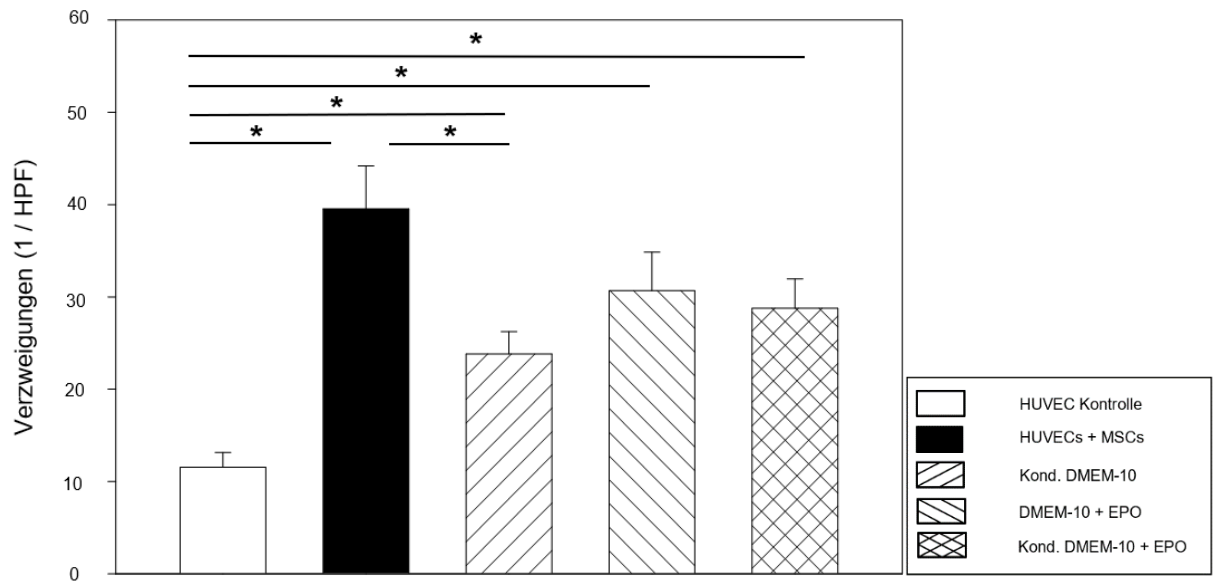


Abbildung 4.15: Gruppenanalyse auf Bildung von Endothel-Verzweigungen im Co-Kultur-Modell der kardialen MSCs mit HUVECs.

Alle Gruppen zeigten im Vergleich zur HUVEC-Kontrolle eine signifikant erhöhte Bildung von Endothelverzweigungen. Die Co-Kultur aus HUVECs und MSCs zeigte im Vergleich zur Kond. DMEM-10 – Gruppe ebenfalls eine signifikant erhöhte Bildung an Endothelverzweigungen.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; $n=5$; * $p \leq 0,05$

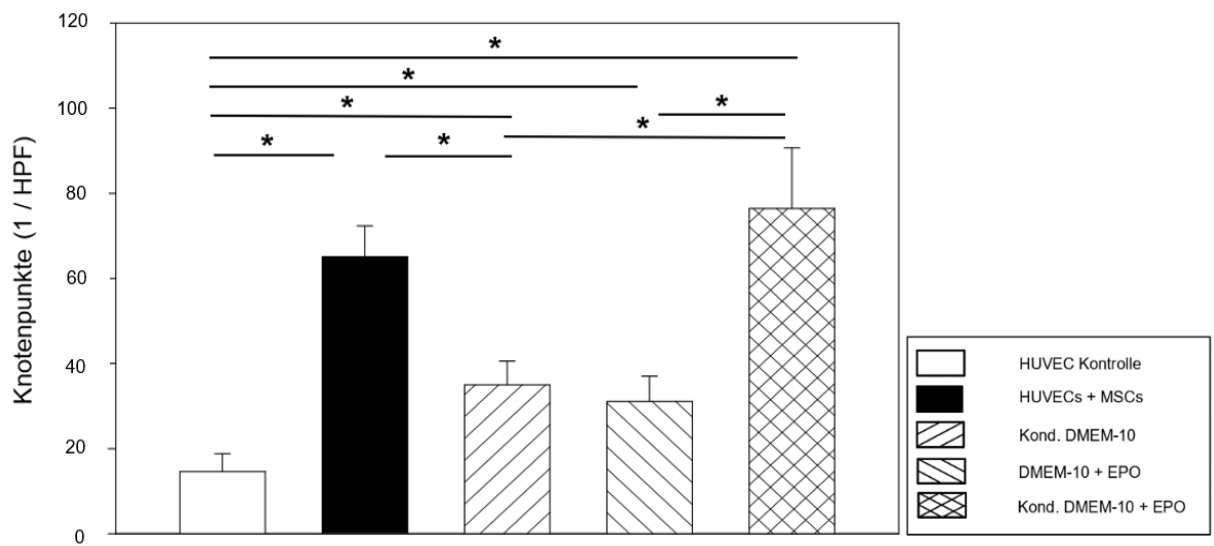


Abbildung 4.16: Gruppenanalyse auf Bildung von Knotenpunkten im Co-Kultur-Modell der kardialen MSCs mit HUVECs.

Alle Gruppen zeigten im Vergleich zur HUVEC-Kontrolle eine signifikant erhöhte Bildung von Knotenpunkten. Darüber hinaus ließ sich eine signifikant erhöhte Bildung von Knotenpunkten in der mit EPO-stimulierten Kond. DMEM-10 – Gruppe im Vergleich zur EPO-stimulierten DMEM-10 – Gruppe und Kond. DMEM-10 – Gruppe nachweisen. Die Co-Kultur aus HUVECs und MSCs zeigte ebenfalls eine Signifikanz gegenüber der konditionierten DMEM-10 – Gruppe.

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; $n=5$; * $p \leq 0,05$

Die EPO-Supplementierung des MSC-konditionierten Mediums zeigte eine Synergie auf die Angiogenese. Dies machte sich in der 2,5-fach verstärkten Bildung von Zellverzweigungen und -knotenpunkten im Vergleich zur nicht stimulierten HUVECs-Monokultur deutlich (siehe Abb. 4.15 und 4.16). In dem MSC-konditioniertem Medium, das mit EPO supplementiert wurde, wurde die Bildung von HUVEC-Netzwerken um das 5,2-fache ($p < 0,001$), 2,2-fache ($p = 0,017$) und 2,5-fache ($p = 0,007$) im Vergleich zur HUVECs-Monokultur, konditioniertem DMEM-10-Gruppe und DMEM-10 + EPO-Gruppe, erhöht (Abb. 4.15 und 4.16).

Der Nachweis des proangiogenen Potentials der $CD45^- CD44^+ DDR2^+$ MSCs liefert einen wichtigen Hinweis bezüglich ihres therapeutischen und regenerativen Effekts nach der Induktion eines Myokardinfarkts.

5. Diskussion

Das Säugetierherz besteht aus unterschiedlichen Zellpopulationen. Die mononukleären Zellen (*engl.* MNCs), darunter mesenchymale Stammzellen (*engl.* MSCs) und kardiale Fibroblasten, bilden dabei einen Großteil der nicht-myozytären Zellfraktion [210, 211]. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass MSCs einen aktiven Beitrag im Heilungsprozess, einschließlich der Fibrose- und Narbenbildung nach einem MI liefern [212, 213]. Die bisher unternommenen Versuche, mittels Transplantation von MSCs, langfristig und konstant positive therapeutische Effekte zu erzielen, erbrachten divergente Ergebnisse [94–98]. Deshalb stellt die Aufklärung von zell- und gewebespezifischen Wechselwirkungen sowie die Regulierung von unterschiedlichen Signalwegen und die Optimierung der Zellverabreichung ein wichtiges Ziel dar, um das Transplantatüberleben, die Immunabstoßung und ein zielgerichtetes *Homing* zu verbessern [99, 214]. Die Gefahr, dass transplantierte Zellen über den Kreislauf vom geplanten Wirkungsort wegtransportiert werden oder infolge des stark inflammatorischen kardialen Mikromilieus apoptotisch werden, mindern den therapeutischen Effekt [215].

Ein vielversprechender Ansatz, der die Aktivierung, das Überleben und die Immunabstoßung regulieren könnte, bietet das Verständnis und die Stimulation von kardial residenten Stammzellnischen und -quellen [106, 216].

In der hier durchgeführten Studie konnte im Rattenmodell anhand durchflusszytometrischer Analysen und Charakterisierungen gezeigt werden, dass es innerhalb einer intrakardialen mesenchymalen Stammzellnische 24 Stunden nach MI zu einer starken Proliferation kam. Bemerkenswerterweise konnten wir eine Methode zur Isolation und Kultivierung einer MNC-Subpopulation etablieren, die im langzeitigen Verlauf auch standardisiert angewendet werden konnte. Diese Zellen erfüllten *in vitro* alle funktionellen Eigenschaften für die Definition von MSCs und zeigten während der Co-Kultivierung mit murinen neonatalen Kardiomyozyten eine Expression früher kardialer Transkriptionsfaktoren. Darüber hinaus zeigten die kardialen MSCs ein ausgeprägtes proangiogenes Potential. Beachtenswert ist die durch Supplementierung mit dem pleiotropen Wachstumsfaktor Erythropoetin geförderte kardiomyogene Differenzierbarkeit, als auch das gesteigerte proangiogene Potential dieser Zellen. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen eine mögliche entscheidende Beteiligung der kardialen MSCs in der Heilungsphase nach einem MI und unterstreichen ihr großes regeneratives Potential.

5.1 Isolation und Kultivierung kardialer früh-postischämischer MNCs

In dieser experimentellen Arbeit ist es uns in erster Linie gelungen, eine Methodik, sowie ein Protokoll für die Isolation und langzeitstabile Kultivierung von MNCs aus dem Rattenherz zu etablieren, so dass die untersuchten Zellpopulationen auf einem standardisierten Weg gewonnen werden konnten.

In den ersten Vorversuchen konnten wir beobachten, wie schwierig es war, eine unmittelbar nach der enzymatischen Isolation mittels FACS sortierte spezifische MNC-Subpopulation langfristig zu kultivieren. Eine schwache Adhärenz und eine geringe Proliferation in der Zellkultur machten eine solche Kultivierung nicht ausführbar. Ein möglicher Grund dafür kann die schnelle Trennung der spezifischen MNC-Subpopulation aus ihrer ursprünglichen mononukleären Zellmatrix sein. Es wurde nachgewiesen, dass alle kardialen Zellen in einer speziellen Umgebung existieren, die zu einer Sicherung des Überlebens und der Funktion beiträgt sowie ihre biologische Aktivität kontrolliert. Die extrazelluläre Matrix (EZM) und die in ihr gespeicherten Wachstumsfaktoren sind ein wesentlicher Bestandteil dieser Mikroumgebung [217].

Ein rasches Rausreißen der zu isolierenden Zellen aus der EZM erfolgte bereits während der enzymatischen Aufarbeitung der kardialen MNC-Fraktion. In dem Ursprung der kardialen Zellen liegt ihre Fähigkeit zur Adhärenz begründet, die durch Strukturen (Integrine) zwischen Zellen und der EZM aufrechterhalten wird. Wie schon in früheren Arbeiten beobachtet, konnten wir auch in unseren Vorversuchen den Misserfolg bei der Adhärenz der „frisch“ sortierten Zielsubpopulation feststellen [218, 219]. Ein Verlust des Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Kontakts induzierte bei bestimmten Zelltypen einen programmierten Zelltod (Apoptose) [220].

Dahingegen konnte gezeigt werden, dass die Gesamtheit an MNCs, die aus dem Rattenherz isoliert wurde, eine ausgeprägte plastische Adhärenz und schnelle Proliferation zeigte, wenn sie direkt in Zellkultur gebracht wurde.

Diese Etablierung und vor allem auch die Standardisierung von Isolations- und Kultivierungsprotokollen sind von zentraler Bedeutung, um neue Erkenntnisse der isolierten Zellen zu gewinnen.

5.2 In der frühen Phase nach dem Myokardinfarkt proliferiert eine CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation

Die Identifizierung und Stimulation von intrakardialen MSC-Nischen bietet einen zentralen Forschungsansatz, um die mesenchymale Stammzelltherapie nach MI zu optimieren. Eine indirekte Methode zur Verbesserung von Stammzelltherapeutika scheint dabei ein detailliertes Verständnis und die Regulation residenter Stammzellnischen zu sein.

Bemerkenswerterweise identifizierte die Vorarbeit von Klopsch *et al.* mittels Immunfluoreszenzfärbung eine intramyokardiale CD29⁺ CD44⁺ CD90⁺ CD105⁺ PDGFRα⁺ DDR2⁺ MSC-Nische, die eine hohe Vimentinexpression zeigte. Diese Nische zeigte vor allem in der „frühen Phase“ nach MI (24 Stunden) eine dynamische Proliferation, insbesondere in der Periinfarkt-Grenzzone [155].

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Nischenlokalisierung bestätigt und weiterführend charakterisiert werden. Die 24 Stunden nach der Operation durchgeführten durchflusszytometri-

schen Analysen auf unterschiedliche MSC-relevante Oberflächenmarker zeigten eine deutliche Reduktion der CD45⁺ Fraktion im früh-ischämischen Myokard, dennoch konnte eine verstärkte Proliferation einer kardialen postischämischen CD45⁺ CD44⁺ DDR2⁺ Subpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe (*Sham*-Gruppe) nachgewiesen werden.

Dominici *et al.* definierten CD45 als einen wichtigen Negativmarker zur Definition von MSCs [128]. Dahingegen stellt CD44 ein anerkanntes und in der Literatur oft zitiertes MSC-relevantes Oberflächenantigen dar, das für die gezielte Isolation der Zellen Anwendung findet [133–135, 194]. Interessanterweise zeigten Klopsch *et al.*, dass Zellen innerhalb der identifizierten Nische zum Teil sowohl Vimentin, als auch DDR2 exprimierten [155]. Vimentin wird als Protein des Zytoskeletts in mesenchymalen Zellen exprimiert [221]. Darüber hinaus konnte es auch in Zellen nachgewiesen werden, die eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben [183]. Die EMT stellt ein reversibles zelluläres Programm dar, das unter anderem eine wichtige Rolle bei der Gastrulation, Gewebemorphogenese und während der Wundheilung spielt [222, 223]. Wagner *et al.* zeigten anhand einer Genexpressionsanalyse, dass einige Gene der Morphogenese und Entwicklung, die auch an der EMT beteiligt sind, stärker in MSCs als in Fibroblasten exprimiert wurden. Die Gene schlossen unter anderem Fibronectin, ECM2, Glypican-4, ID1, NF1B, HOXA5 und HOXB6 ein [224]. Die myokardiale Ischämie, als unmittelbare Folge des MI, stellt einen wichtigen Aktivator der EMT dar [183]. Daher stellte unsere Gruppe um Klopsch *et al.* die Hypothese auf, dass eine frühzeitig vermehrte Vimentininduktion im postischämischen Herzen eine klare Unterscheidung von kardial residenten MSCs und kardialen Fibroblasten ermöglichen könnte [167].

Battula *et al.* berichteten in 2010, dass sich EMT-abgeleitete Zellen funktionell und phänotypisch wie MSCs verhalten. Die Zellen exprimierten relevante MSC-Marker (CD45⁺ und CD44⁺) und zeigten eine multipotente Differenzierungskapazität. Darüber hinaus konnte die Gruppe demonstrieren, dass die Zellen *in vivo* ein ausgeprägtes *Homing* in den Wundbereich zeigten [225]. Damit stellt Vimentin einen wichtigen Marker zur Identifikation von Zellen mit mesenchymalem Charakter dar. Da es jedoch als Protein des Zytoskeletts hauptsächlich intrazellulär exprimiert wird, konnten wir es in der vorliegenden Arbeit nicht für die durchflusszytometrische Charakterisierung und Sortierung unserer Zielzellen nutzen, da hierbei ausschließlich extrazelluläre Signale verwendet werden konnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die extrazelluläre Expression des Discoidin-Domänenrezeptors 2 (*engl.* DDR2; CD167b) für die durchflusszytometrische Charakterisierung und Isolation der MNC-Subpopulation aus dem früh-ischämischen Herzen verwendet. In unseren durchflusszytometrischen Analysen zeigte DDR2 neben CD44 eine starke Überexpression im postischämischen Myokard der MI-Gruppe im Vergleich zu *Sham-Gruppe*. Daher wurden diese Marker für die Isolation der Zielzellpopulation ausgewählt.

Crawford *et al.* wiesen darauf hin, dass Fibroblasten, die im früh-postischämischen Myokard eine starke Proliferation zeigten, von mesenchymalen CD44⁺ DDR2⁺ Progenitorzellen abstammten [197]. DDR2 gilt als spezifischer Marker für kardiale Fibroblasten und möglicherweise frühe kardiale MSCs. Er wird dabei nicht von anderen kardialen Zellpopulationen wie Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Kardiomyozyten exprimiert [197, 226].

Damit zeigt die hier isolierte kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Zellpopulation durch ihr Antigenexpressionsprofil deutliche Hinweise auf eine mesenchymale Herkunft. Die positive Expression von CD44 und DDR2 deutet auf einen kardialen Ursprung hin. Weiterhin konnte durch die Induktion des MI eine deutliche Aktivierung der Proliferation innerhalb dieser intramyokardialen Zellnische, im Vergleich zur *Sham*-Gruppe, beobachtet werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den zuvor mittels Immunfluoreszenzfärbung ausgewerteten kardialen Schnitten. Zusätzlich zeigten diese, dass es neben der ausgeprägten Proliferation der MSC-Cluster im postischämischen Herzen, nur zu einem vereinzelt Auftreten von scheinbar inaktiven MSC-Clustern im Myokard der *Sham*-Gruppe kam [155].

Bereits in 2011 bzw. 2012 berichteten Chong *et al.* [106] und van Wijk *et al.* [65] über kardial residente MSC-Nischen, die sich vor allem im epikardialen Bereich lokalisieren ließen. Sie demonstrierten, dass die Ischämie einen starken Trigger für die Aktivierung und Proliferation innerhalb dieser Nischenlokalisation darstellte, so dass die vom Epikard stammenden MSCs innerhalb der ersten 72 Stunden in die Infarktzone migrierten. Dort konnten sie durch Differenzierung in verschiedene kardiale Zellpopulationen die Regeneration des Herzens nach einem MI fördern [65].

Neben den beschriebenen residenten kardialen Stammzellnischen gibt es jedoch auch weiterhin Hinweise, die für eine wichtige regenerative Beteiligung von Zellen aus dem Knochenmark sprechen [227]. Das Knochenmark als Reservoir von Stamm- und Progenitorzellen kann unterschiedliche Rollen bei der Wundheilung nach einer ischämischen Herzschädigung einnehmen. Dabei wird die Art der differenzierten Zelle von der lokalen Mikroumgebung beeinflusst [227]. Beispielsweise wurde berichtet, dass bis zu einem Viertel aller Myofibroblasten, die nach einem MI im ischämischen Myokard nachgewiesen wurden, von Progenitorzellen aus dem Knochenmark abstammten [212, 227]. Dahingegen stellten Carlson *et al.* fest, dass Fibroblasten, die aus dem ischämischen Myokard isoliert wurden, von mesenchymalen CD44⁺ Progenitorzellen abstammten, denen die Expression des hämatopoetischen Markers CD45, sowie typischer Entzündungsmarker fehlten. Dies deutet daraufhin, dass diese Zellen keinen myeloiden Ursprung zeigten, sondern eher als kardial residente Zellen anzusehen sind [213]. Vielmehr scheinen Fibroblasten, die sich aus myeloiden hämatopoetischen Progenitorzellen differenzieren, eine entscheidende Rolle bei der reaktiven interstitiellen Fibrose im Rahmen einer Ischämie/ Reperfusionsskardiomyopathie (*engl.* I/R) zu spielen. Vorarbeiten zeigten, dass repetitive myokardiale Hypoxiephasen zu einer verlängerten Expression des Monozyten-

Chemoattraktionsproteins-1 (*engl.* MCP-1) und damit zu einer verstärkten Migration einer MCP-1-sensitiven Monozytenpopulation aus dem Knochenmark führten. Dahingegen kam es während einer akut einsetzenden Hypoxie im Rahmen eines MI zu einer schnellen Unterdrückung der Chemokinantwort, einschließlich MCP-1 [228]. Dies führte in der Folge nur zu einer kurzzeitigen Expression von MCP-1. Eine experimentelle Deletion des MCP-1 führte zu einer vollständigen Unterdrückung der fibrotischen Reaktion nach einer Ischämie / Reperusionsphase. Dahingegen konnte bei einem MI, trotz MCP-1 Deletion eine vollständige Narbenbildung beobachtet werden [197].

Weiteres Interesse und Studien zum Verständnis der Rolle des Zusammenspiels zwischen Fibroblasten/Mesenchym und Ischämie, wurde von Crawford *et al.* im Jahr 2012 ebenfalls demonstriert [197]. Sie haben beobachtet, dass Fibroblasten, die stark an der Narbenbildung nach MI beteiligt sind, aus endogenen mesenchymalen Stammzellen hervorgehen. Sie lieferten die Erkenntnis über die Existenz einer CD44⁺ kardial residenten MSC-Population. Diese Zellen exprimierten darüber hinaus primitive Marker (Nanog, TERT und CD34) und spezifische Fibroblastenmarker wie Kollagen I und DDR2 [197]. Diese Resultate unterstützen die hier gezeigten Ergebnisse über die Existenz einer aktiv proliferierenden CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Nische und die Hypothese, dass sie einen wichtigen Beitrag in der Heilungsphase nach MI leisten könnten. Die in dieser Arbeit etablierten und standardisierten Protokolle für die Isolation und Kultivierung dieser MSC-Subpopulation liefern eine wichtige Grundlage, um durch weitere Experimente ein detailliertes Verständnis dieser Zellen zu entwickeln.

Ein genaues Verständnis über die Beteiligung am Heilungsprozess und vor allem die Regulation dieser residenten MSC-Subpopulation, kann zu einer großen Steigerung des therapeutischen Potentials beitragen.

5.3 CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation weist Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen auf

Da es für das Verständnis der zellulären Rolle der identifizierten und isolierten Zellpopulation von großer Bedeutung ist, wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Erkenntnisse über ihren Zellcharakter erbracht. Ein Ziel dieser Arbeit lag in der Isolation und Kultivierung einer mesenchymalen Stammzellpopulation aus dem früh-postischämischen Herzen der Ratte. Anhand der gezeigten Expression von Oberflächenantigenen konnte jedoch lediglich auf einen mononukleären Zellcharakter geschlossen werden.

Die isolierte CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation wies neben der Expression MSC-relevanter Oberflächenantigene, auch entscheidende funktionellen Eigenschaften auf, die den mesenchymalen Stammzellcharakter dieser Zellen belegten.

MSCs besitzen kein spezifisches Oberflächenantigen-Expressionsprofil. Dies führte dazu, dass in der Literatur bislang keine gesicherte Methode zur gezielten durchflusszytometrischen

Aufreinigung von MSCs existiert [229]. Für die Identifikation und Isolation von mesenchymalen Stammzellen wurden 2006 von der internationalen Gesellschaft für Zell- und Gentherapie (*engl.* ISCT) eine Reihe an MSC-relevanten Oberflächenantigenen (siehe Abb. 1.2) vorgeschlagen [128]. Es zeigte sich, dass diese Vorschläge jedoch zu keiner strengen Charakterisierung führten und einer gewissen Flexibilität bedürfen. Seitdem wurden mehrere zusätzliche Marker identifiziert, beispielsweise: STRO-1 [230], CD271 [231], CD200 [232], Gangliosid G2 [233] und CD349 [231], die jedoch ebenfalls keine ausschließliche Expression durch MSCs zeigten. Daher existiert kein einziger Marker bzw. keine begrenzte Anzahl von Markern, die eine MSC-spezifische Isolation ermöglichen würden [229].

Neben der Expression MSC-relevanter Oberflächenmarker spielte daher der Nachweis funktioneller MSC-typischer Eigenschaften eine entscheidende Rolle, um den mesenchymalen Stammzellcharakter der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation zu bestätigen.

5.3.1 CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation bildet fibroblastenähnliche klonogene Vorläufer

Die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation wurde auf die Bildung fibroblastenähnlicher klonogener Vorläufer (*engl.* CFU-F) untersucht, um ein weiteres wichtiges funktionelles MSC-Kriterium zu prüfen. Die Zellen zeigten unabhängig von der Passageanzahl und der ausgesäten Zelldichte die Fähigkeit zur ausgeprägten CFU-F Bildung.

Die Fähigkeit der Koloniebildung, als eine der wichtigsten Eigenschaften zur Identifikation von MSCs, wurde bereits in 1970 von Friedenstein *et al.* beschrieben [205]. Klonogenität beschreibt dabei die Fähigkeit von MSCs dichteunempfindlich zu wachsen, das heißt, aus einer Vorläuferzelle eine Kolonie zu bilden [137]. Diese Fähigkeit, Klone aus einer einzelnen Zelle zu erzeugen, stellt einen formalen Beweis für die Fähigkeit zur Selbsterneuerung dar, diese für Stammzellen charakteristisch ist [234]. Seit längerer Zeit kann dies routinemäßig durch CFU-F-Assays nachgewiesen werden [235]. Bianco *et al.* wiesen jedoch darauf hin, dass ein Koloniewachstum auch beobachtet werden konnte, wenn nicht-klonale Zellen in einer erhöhten Dichte ausgesät wurden. Die erhöhten Zelldichten führten zu nicht interpretierbaren Ergebnissen und es konnte nicht davon ausgegangen werden, dass die ausgesäten Kolonien einen klonalen Charakter besaßen [137]. Auf Grund dieser Einschränkungen in der Aussagekraft wurden für den CFU-F Nachweis im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Zelldichten verwendet, um mögliche Unterschiede erkennen und bewerten zu können. Da hierbei schon sehr niedrige Zelldichten (100 Zellen/cm²) eine ausgeprägte Koloniebildung zeigten (siehe Abb. 4.6), konnte ein klonogenes Potential dieser Zellen angenommen werden.

5.3.2 CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation zeigt eine multipotente Differenzierungskapazität

Der Nachweis der multipotenten Differenzierungskapazität stellt ein weiteres wichtiges ISCT-Kriterium zur Definition von MSCs dar [128]. Die hier isolierte kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation zeigte *in vitro* eine ausgeprägte Fähigkeit zur multipotenten Differenzierbarkeit entlang der mesodermalen Linie. Dabei konnte die Bildung von Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten unabhängig von der Passageanzahl der kultivierten Zellen nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.9, 4.10 und 4.11).

Die Erkenntnis, dass mesenchymale Stammzellen die Eigenschaft besitzen, sich zu Linien mesenchymaler Gewebe zu differenzieren, wurde bereits 1999 von Pittenger *et al.* detailliert beschrieben [194]. Der Nachweis auf multipotente Differenzierbarkeit bietet heute eine anerkannte Methodik, um MSCs als funktionell zu identifizieren. Durch die Unabhängigkeit von MSC-Markern sowie von Gewebe- oder Spezies-Typen bietet die Testung auf multipotente Differenzierbarkeit, zusätzlich zu der durchflusszytometrischen Untersuchung, eine wichtige experimentelle Hilfe zur Charakterisierung der MSC-Subpopulation.

Resümierend erfüllt die in dieser Arbeit isolierte kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation alle von der ISCT vorgeschlagenen Mindestkriterien zur Definition von MSCs [128]. Die Zellen zeigten unter standardisierten Kulturbedingungen (5% CO₂ und 37°C) eine typische Adhärenz an Kunststoffoberflächen. Zudem zeigten sie in durchflusszytometrischen Analysen eine Expression typischer bzw. anerkannter MSC-Oberflächenmarker sowie *in vitro* eine ausgeprägte Potenz zur multipotenten Differenzierung in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten. Damit konnte der mesenchymale Stammzellcharakter dieser isolierten Zellpopulation nachgewiesen werden.

5.4 Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zeigen die Fähigkeit zur kardiomyogenen Differenzierung

Nachdem die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ Zellpopulation durch ihre funktionellen Eigenschaften als MSCs charakterisiert wurden, lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, *in vitro* das Verständnis über eine mögliche Beteiligung dieser Zellen an regenerativen Prozessen nach einem MI zu verbessern. Vorarbeiten beschrieben bereits die Fähigkeit von kardialen Progenitorzellen, eine kardiomyogene Differenzierung zu erfahren. Dabei wiesen diese Studien unter anderem daraufhin, dass das Epikard eine wichtige Quelle für kardiale Progenitorzellen darstellt, die im Rahmen einer epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zur Regeneration nach kardialen Verletzungen beitragen könnten (siehe Abschnitt 1.4.2) [65, 236, 237].

Um eine mögliche kardiomyogene Transdifferenzierung der durch MI präkonditionierten kardialen MSCs zu untersuchen, wurden die Zellen mit neonatalen Kardiomyozyten der Maus co-kultiviert und auf ihr kardiomyogenes Differenzierungspotential untersucht. Zusätzlich wurde

eine ein- und siebentägige Supplementierung mit EPO durchgeführt, um dessen Einfluss auf die kardiomyogene Differenzierung von MSCs zu analysieren.

Bemerkenswerterweise zeigt diese Arbeit, dass die isolierte kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation die Fähigkeit besitzt, in einer siebentägigen Co-Kultur mit murinen neonatalen Kardiomyozyten, die Expression früher kardialer Transkriptionsfaktoren (GATA4 und Nkx2.5) zu steigern. Dies bestätigte vor allem die deutlich erhöhte Expression von Nkx2.5. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation durch ihre kardiomyogene Präkonditionierung, auch unabhängig von einer EPO-Supplementierung, die Fähigkeit besitzt frühe kardiomyogene Transkriptionsfaktoren zu exprimieren. Eine mögliche Ursache dieser Präkonditionierung stellt die Annahme dar, dass diese kardiale MSC-Subpopulation im Rahmen einer ischämisch induzierten EMT aktiv proliferierte [65], wodurch unter anderem ihr kardiomyogenes Transdifferenzierungspotential möglicherweise gefördert wurde [238].

Es ist bekannt, dass die Entwicklung der Kardiomyozyten von einer Vielzahl von Genen innerhalb eines Netzwerkes beeinflusst wird. Nkx2.5 stellt dabei den frühesten Marker des präkardialen Mesoderms dar, aus dem sich das Myokard entwickelt [239]. Yadav und Mishra isolierten kardiale Nkx2.5- und GATA4-positive Stammzellen, die in einem kardiomyozytären Differenzierungsmedium spezifische Kardiomyozytenmarker wie α -Aktinin und Troponin I exprimierten [240]. Des Weiteren zeigten Nkx2.5-exprimierende Progenitorzellen die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierbarkeit in Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen und scheinen somit nicht ausschließlich auf eine kardiale Zelllinie beschränkt zu sein [241].

Bisher wurden zahlreiche biochemische Induktoren beschrieben, die *in vitro* zu einer gezielten kardiomyogenen Transdifferenzierung von MSCs führten [140, 242–245]. *In vivo* scheint jedoch die Mikroumgebung des Myokards selbst in der Lage zu sein, Zellsignale und Zellprogramme zu induzieren, die zu einer kardialen Differenzierung führen könnten [143]. So konnten Orlic *et al.* bereits 2001 zeigen, dass MSCs aus dem Knochenmark bei lokaler Transplantation in das früh-ischämische Myokard die Fähigkeit besitzen funktionelle Kardiomyozyten und Gefäßstrukturen zu bilden [81]. Diese Erkenntnis konnte in der Folge durch weitere Tiermodelle bestätigt werden [246–248]. Diese Resultate unterstützen unsere Annahme, dass das ischämische Myokard mitsamt seiner Mikroumgebung ein entscheidender präkonditionierender Faktor der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation sein könnte und damit auch ihr weiteres Zellschicksal nachhaltig beeinflussen könnte.

Das Ziel, der in dieser Arbeit durchgeführten Co-Kultivierung von MSCs mit murinen neonatalen Kardiomyozyten, lag in erste Linie in der Herstellung einer vereinfachten kardialen Mikroumgebung in einem *in vitro*-Modell. Einige Vorarbeiten demonstrierten, dass MSCs durch solche Co-Kultur-Modelle in der Lage sind, kardial-spezifische Proteine wie beispielsweise Troponin I [249], α -Aktinin [249], MEF-2C [249], Nkx2.5 [201] und GATA4 [201] zu exprimieren

sowie teilweise auch kardial Aktionspotentiale zu erzeugen [250]. Andere berichteten, dass eine Co-Kultivierung mit Kardiomyozyten nicht ausreichte, um eine vollständige Transdifferenzierung in funktionelle Kardiomyozyten zu induzieren. [248, 251].

Neben der oft beschriebenen extrazellulären, parakrinen Kommunikation von MSCs mit der Umgebung [252] scheint jedoch auch eine direkte interzelluläre, metabolische Kommunikation eine wichtige Rolle zu spielen. Diese wird hauptsächlich durch interzelluläre Kanäle (*Gap Junctions*) vermittelt, die aus Connexinen bestehen [253]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass MSCs in Lage sind funktionelle *Gap Junctions* sowohl untereinander, als auch mit Myokardzellen auszubilden [201, 254–256].

Interessanterweise demonstrierten Lemcke *et al.* in einer Studie aus unserem Labor, dass die Ausbildung solcher Zell-Zell-Kontakte innerhalb einer Co-Kultur zwischen MSCs und neonatalen Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle für eine signifikanten Hochregulation von frühen kardialen Transkriptionsfaktoren, im Vergleich zu einer Co-Kultur ohne Zellkontakte, spielte [201]. Dabei zeigten Sie, dass *Gap Junctions*, unter anderem durch die Übertragung von mikro-Boten RNA (miRNA), die zu Veränderungen der Genexpression in der Empfängerzelle führt, zu dieser kardiomyogenen Differenzierung beitrugen [201]. Auch andere Studien zeigten, dass eine effiziente *Gap Junction*-Kopplung zwischen MSCs und Kardiomyozyten erforderlich war, um eine kardiomyogene Differenzierung zu induzieren [257].

Die Erkenntnisse, dass die hier isolierte CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation in Co-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten zu einer kardiomyogenen Differenzierung in der Lage ist, unterstreicht ihr Potential sich in eine kardiale Zellumgebung zu integrieren. Die erhöhte Expression der frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA4 demonstriert ihr regeneratives Potential, welches durch den therapeutischen Ansatz der EPO-Supplementierung noch bekräftigt werden konnte. Ob dieses Potential gleich zu halten ist, wie in eigenen und anderen Vorarbeiten nachgewiesen wurde, ist noch zu klären, da es sich bei der Mehrzahl um aus dem Knochenmark isolierte MSCs handelte und nicht wie in dieser Arbeit um eine kardial residente Subpopulation. Dies zeigt, dass die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation neuartig bzw. anders zu betrachten ist.

Eine Bemerkung wert ist die Arbeit von Rossini *et al.*, diese die kardiale Transplantation von Zellen aus kardialen Gewebe und Knochenmark verglich, die unter anderem mesenchymale Marker wie beispielsweise CD105, CD73, CD29 und CD44 exprimierten. Die kardiale Zellpopulation zeigte dabei eine erhöhte Effizienz sowohl in der Erfassung eines kardiomyogenen Phänotyps, als auch in der Förderung der Angiogenese über parakrine Faktoren [258]. Dies deutet auf einen klinisch relevanten Vorteil von kardial residenten Zellen mesenchymalen Ursprungs im Vergleich zu myeloiden MSCs hin. Dieses Erkenntnis bestärkt die Notwendigkeit einer gezielten Untersuchung und der wissenschaftlichen Fokussierung auf kardial residente Zellen, sowie spezifischer Zellsubpopulationen, wie der vorliegenden CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺

MSC-Subpopulation. Detaillierte Einblicke stellen dabei eine Voraussetzung für die Entwicklung optimaler Strategien für zellbasierter Therapieansätze dar.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs um eine durch myokardiale Ischämie präkonditionierte Subpopulation handelt. Vorherige Arbeiten demonstrierten *in vitro*, dass eine kardiale ischämische Umgebung, in Form eines konditionierten Mediums, die Expression von GATA4, Nkx2.5, sowie des *Gap Junction*-Proteins Connexin 43 (Cx43) in MSCs fördern konnte. [259, 260]. Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die ischämische Präkonditionierung, welche auch unsere kardialen MSCs auszeichnet, einen wichtigen regenerativen und therapeutischen Vorteil für die hier isolierte MSC-Subpopulation bieten könnte.

5.4.1 EPO fördert die kardiomyogene Differenzierung der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation

Anlehnend an die oben ausgeführten Erkenntnisse konnte weiterhin in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit EPO das kardiomyogene Differenzierungspotential der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation zusätzlich noch förderte. Dabei zeigte sich, dass vor allem eine kontinuierliche EPO-Gabe (100 U/ml) über 7 Tage zu einer gesteigerten Expression des frühen kardialen Transkriptionsfaktors Nkx2.5 führte.

Zafiriou *et al.* berichteten, dass kardiale Progenitorzellen EPO-Rezeptoren exprimieren und durch eine EPO-Supplementierung sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* in kardiomyozytenähnliche Zellen differenzierten [261].

Des Weiteren demonstrierte eine Vorarbeit aus unserem Labor, dass eine epikardiale EPO-Applikation nach MI die Expression regenerativer Schlüsselfaktoren erhöhte, sowie den TGF- β /Wnt-Signalweg in intrakardialen MSC-Nischen induzierte [180]. Es ist bekannt, dass über diesen Signalweg die Expression verschiedener EMT-assoziierte Gene induziert wird, die eine kardiomyogene Phänotypisierung der MSCs fördern können [183].

Ein weiterer Mechanismus durch den EPO zur Förderung der kardiomyogenen Differenzierung beitragen könnte, liegt in einer erhöhten Expression von Cx43 [262] und damit in einer verstärkten Ausbildung von *Gap Junctions* begründet. Cx43 stellt das am häufigsten exprimierte *Gap Junction*-Protein in atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten dar [263]. Es konnte gezeigt werden, dass der Wnt-1-Ligand über eine Induktion der Cx43-Expression zur verstärkten Bildung von funktionellen *Gap Junctions* führte. Diese Effekte beruhten vor allem auf einer Wnt-abhängigen Akkumulation von β -Catenin und nachfolgender Transkriptionsaktivierung [264]. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Vorarbeit aus unserem Labor, in der gezeigt wurde, dass eine EPO-Stimulation über eine starke Induktion des Wnt-Signalwegs zu einer erhöhten *de-novo*-Synthese des Wnt-1 Liganden und einer Akkumulation von intrazellulären β -Catenin führte [180]. Wie oben beschrieben zeigten vorherige Arbeiten, dass die Ausbildung

von *Gap Junctions* zwischen Kardiomyozyten und MSCs eine wichtige Voraussetzung für eine kardiomyogene Differenzierung sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* spielte [201, 254, 255].

Die Erkenntnis, dass EPO die kardiomyogene Differenzierung fördern kann unterstreicht das regenerative und therapeutische Potential dieses pleiotropen Wachstumsfaktors.

Erneut zeigt sich hier das Erfordernis einer weiteren Untersuchung der zellulären Zusammenhänge und spezifischen Faktoren, die diese aus dem Myokard stammenden MSC-Subpopulation therapeutisch beeinflussen und ihre Nische *in vivo* regulieren können.

5.5 Kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zeigen ein proangiogenes Potential

Die Neovaskularisierung spielt eine wichtige Rolle in der regenerativen Phase nach einem MI und beeinflusst das therapeutische Ergebnis erheblich. MSCs haben sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* gezeigt, dass sie das Endothelzellwachstum und die Bildung neuer Blutgefäße, vor allem über die Sekretion parakriner Faktoren fördern können [265]. Darüber hinaus sind MSCs auch in der Lage über eine direkte Differenzierung in Endothel- und glatte Muskelzellen die Neoangiogenese zu unterstützen [266].

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine früh-postischämische kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation ein hohes angiogenes Potential besitzt. Dazu wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnur (*engl.* HUVECs) in einer Matrigel®-beschichteten Wellplatte ausgesät und entweder direkt mit MSCs oder einem MSC-konditioniertem Medium über 24 Stunden kultiviert und gegen eine HUVECs-Monokultur verglichen. Darüber hinaus wurde der Einfluss von EPO, durch eine einmalige Zugabe zum MSC-konditioniertem Medium und zur HUVECs-Monokultur untersucht. Da in dieser Studie das konditionierte Medium der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zu einer signifikanten Steigerung der Netzwerkbildung im Vergleich zur HUVECs-Monokultur führte, konnten damit ihre parakrinen Effekte auf die Induktion der Angiogenese nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Arbeiten, die die Freisetzung parakriner proangiogener Faktoren durch MSCs beschrieben [267, 268]. Das Sekretom der MSCs umfasst alle Faktoren, die aktiv und passiv freigesetzt werden. Dazu zählen unter anderem lösliche Proteine (wie Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren), freie Nukleinsäuren und Exosomen [269]. Zou *et al.* zeigten beispielsweise, dass MSC-konditioniertes Medium die Angiogenese und die globale Herzfunktion nach MI fördern konnte [270]. Neuere Erkenntnisse wiesen daraufhin, dass diese proangiogenen Effekte von MSCs vor allem auf der Sekretion von Exosomen beruhen, die proangiogene miRNA's enthalten und Ziele in der Empfängerzelle regulieren [271]. Ein detailliertes Verständnis über den sekretorischen Ablauf der Exosomen und der verschiedenen miRNA's könnten den therapeutischen Effekt von MSCs bei ischämischen Erkrankungen fördern.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Co-Kultivierung von HUVECs und MSCs zu einer signifikant erhöhten Bildung sowohl von Endothelverzweigungen als auch von Knotenpunkten führte, im Vergleich zum MSC-konditionierten Medium. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben den parakrinen Faktoren noch andere Mechanismen existieren, die zu einer Steigerung der Angiogenese beitragen könnten. So berichteten Fan *et al.*, dass MSCs in einer Co-Kultur mit HUVECs über die Expression von Cx43 funktionelle *Gap Junctions* ausbildeten. Sie zeigten, dass über diese Zell-Zell-Kontakte proangiogene miRNA übertragen wurde [272]. Die Unvermeidbarkeit der Bildung von *Gap Junctions* zwischen heterotypischen Zellen beschrieben Crisan *et al.*, da MSCs, die in einer perivaskulären Nische lokalisiert sind, in direktem Kontakt zu endothelialen Zellen stehen [273]. Sie beschrieben, dass perivaskuläre Zellen (Perizyten und Adventitialzellen), die sich entlang von Kapillaren platzieren, das *in vivo* Gegenstück zu MSCs darstellen und aus vielen verschiedenen Organen isoliert werden können [273, 274]. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit mikroskopischen Aufnahmen aus unserem Labor (siehe Abb. 1.4), wo die Co-lokalisierten MSC-Antigene in unmittelbarer Nähe der kardialen Kapillaren detektiert werden konnten. Weiterhin bestätigend für unsere Studie wurde gezeigt, dass perivaskuläre Zellen typische MSC-Marker exprimieren und *in vitro* die Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung zeigten. Dies führte zu der Annahme, dass die Wände von Blutgefäßen eine Reserve an Progenitorzellen beherberge, die einen Ursprung für MSCs und andere adulte Stammzellen darstellen könnte [273]. Zusätzlich beschrieben Stapor *et al.*, dass Perizyten sowohl durch parakrine Effekte, als auch durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit Endothelzellen die Angiogenese und Gefäßreifung stark fördern können [275]. Chen *et al.* konnten diese Erkenntnisse mit myokardialen Perizyten bestätigen. Sie demonstrierten, dass die mittel FACS sortierten Perizyten *in vivo* ein ausgeprägtes perivaskuläres *Homing* zeigten und Moleküle für die interzelluläre Kommunikation mit Endothelzellen exprimierten, beispielsweise Cx43 [276]. Des Weiteren konnten Sie in einem Matrigel®-Angiogenese-Assay *in vitro* nachweisen, dass Perizyten das angiogene Verhalten von Endothelzellen verbesserten, in dem sie an der Bildung von Mikrogefäßen beteiligt waren und eine Stützfunktion auf die neu gebildeten Gefäße ausübten [276].

Das Bewusstsein, dass Perizyten neben parakrinen auch durch direkte zelluläre Wechselwirkungen mit Endothelzellen die Angiogenese fördern können, führt zu der Annahme, dass die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation einen perizytischen Ursprung haben könnte. Andere Studien berichteten über nanotubuläre Strukturen (*tunneling nanotubes*), die als Zell-Zell-Kontakte zwischen MSCs, Endothelzellen und glatten Muskelzellen den Austausch von Zellkomponenten ermöglichen [277, 278]. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass MSCs über diese hochempfindlichen Zell-Zell-Kontakte mit ischämisch geschädigten HUVECs einen mitochondrialen Transfer ermöglichten, der das Zellüberleben und die Angiogenese fördern konnte [278].

5.5.1 EPO fördert synergistisch das parakrine angiogene Potential der kardialen MSC-Subpopulation

Wie in dem Abschnitt 5.4.1 untersucht, wurde im Co-Kultur-Modell von kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs mit HUVECs der therapeutische Ansatz mit EPO untersucht.

Eine Supplementierung des konditionierten MSC-Mediums mit EPO zeigte zusätzlich zur parakrinen Aktivität der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs eine synergistische Stimulation der Angiogenese.

Vorherige Arbeiten demonstrierten bereits, dass EPO eine wichtige Einflussgröße in der durch kardiale Progenitorzellen vermittelten Angiogenese darstellt und dadurch die Rate an Herzinsuffizienz eindämmen konnte [279]. In 2009 zeigten Klopsch *et al.*, dass eine frühe epikardiale EPO-Applikation nach einem MI zu einer verstärkten Angiogenese und Kapillardichte führte [180, 182].

Interessanterweise demonstrierten Mizukami *et al.*, dass MSCs die mit EPO kurzzeitig präkonditioniert wurden, nach der Transplantation *in vivo* eine erhöhte Sekretion von proangiogenen Faktoren (*engl.* SDF-1 und FGF-2) und damit eine verstärkte Angiogenese im ischämischen Myokard zeigten [280]. Diese Erkenntnisse decken sich nicht nur mit früheren Arbeiten aus unserem Labor, sondern auch mit den hier gezeigten Ergebnissen, dass eine EPO-Supplementierung die parakrine proangiogene Aktivität der MSCs auf die Endothelzellen fördern konnte [182, 186]. Eine andere Gruppe zeigte, dass eine Stimulation von MSCs mit EPO zu einem erhöhten Spiegel an abgegebenen Exosomen führte, die miRNA's enthielten und auf parakrinem Weg die Empfängerzellen erreichten [281]. In dieser Studie wurde nicht der Einfluss von EPO auf die proangiogenen Eigenschaften der kardialen MSCs in Co-Kultur mit HUVECs, sprich auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, untersucht. Wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 5.4.1) könnte EPO beispielsweise über eine gesteigerte Expression von Cx43 die Zell-Zell-Kontakte zwischen MSCs und HUVECs fördern.

Mit dem Hintergrund, dass die Zellen sowohl kardiomyogene als auch proangiogene Eigenschaften aufweisen, zeigt unsere Studie eine bedeutsame therapeutische Wirksamkeit der postischämischen kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation. Besonders im Vordergrund liegt zukünftig eine Optimierung der therapeutischen Anwendung sowohl *in vitro*, als auch in anschließenden *in vivo* Experimenten.

5.6 Grenzen und Anmerkungen der Studie

Es sei erwähnt, dass die vorliegende Arbeit keineswegs den Anspruch auf Vollständigkeit in der Charakterisierung der beschriebenen intramyokardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation verfolgt. Die Ergebnisse liefern dabei wichtige Voraussetzungen und Erkenntnisse auf deren Grundlage weitere experimentelle Untersuchungen und Fragestellungen zu klären sind, um das Verständnis sowie die Möglichkeiten der Stimulation der kardial residenten MSC-Nische zu fördern.

Die durchgeführte Studie basierte auf einem akuten Modell des Myokardinfarkts (MI) und wies daher klare Einschränkungen auf. Da die Zellen bereits 24 Stunden nach der Operation aus dem postischämischen Myokard isoliert wurden, beziehen sich die vorliegenden Ergebnisse auf die „frühe“ Phase nach einem MI. Die Arbeit liefert keine Daten bezüglich des MSC-Schicksals in „späteren“ Phasen des Remodelings und einer möglichen Beteiligung an „späteren“ Regenerationsprozessen.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit keine detaillierte Untersuchung des Ursprungs und des Zellschicksals für die aus dem früh-postischämischen Myokard isolierte CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation vorgenommen werden. Wir konnten in unserem Labor jedoch in einer nachfolgenden Arbeit ein Modell für die *in vivo*-Verfolgung einer kardialen Vimentin-induzierten MSC-Population im früh-postischämischen Myokard zeigen [167]. Dazu nutzten wir ein Tamoxifen-induziertes CreER-Modell, das nachfolgend unter der Kontrolle des endogenen Vimentin-Promoters in Vimentin-positiven Zellen das grün fluoreszierende Proteins (GFP) exprierte. Ein postischämischer Vimentin/GFP⁺ MSC-Subtyp der in Vimentin-positiven Zellclustern der Infarktgrenzzone eine Anreicherung zeigte, konnte *in vivo* verfolgt, gezielt genetisch isoliert und anschließend *in vitro* weiterführend charakterisiert werden [167]. Diese Einblicke in das Zellschicksal bauten auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auf und lieferten wichtige Erkenntnisse den reparativen Status dieser intramyokardialen MSC-Nische während der myokardialen Regeneration weiter aufzuklären.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit keine detaillierte Untersuchung von Signalauslösern vorgenommen, die zu einer Aktivierung und frühen Proliferation der intramyokardialen MSC-Nische führten. In vorherigen Arbeiten wurde berichtet, dass Mechanismen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) [183], infiltrierende Makrophagen [282] und hypoxische Zustände mit niedriger Sauerstoffspannung [283] wichtige Regulatoren der Stammzellnische darstellen. Die isolierte kardiale MSC-Subpopulation zeigte in der Co-Kultur mit murinen neonatalen Kardiomyozyten die Fähigkeit zur kardiomyogenen Differenzierbarkeit. Dabei wurde aufgrund des zeitlich begrenzten Intervalls einer stabilen Co-Kultivierung, Tag 7 als Beurteilungszeitpunkt festgelegt. Inwieweit CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs in der Lage sind möglicherweise sogar eine reife kardiomyogene Differenzierung zu erfahren, ist in nachfolgenden *in vitro* und *in vivo* Experimenten zu beantworten.

Zuletzt sei erwähnt, dass sich die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte experimentelle Charakterisierung auf eine ischämisch präkonditionierte CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation (MI-Gruppe) bezog. Weiterführende Analysen und Charakterisierungen der MSC-Population aus *Sham*-Tieren wurden nicht durchgeführt. Inwieweit die ischämische Präkonditionierung einen Einfluss auf funktionelle und therapeutische Eigenschaften der Ziel-MSCs hat, konnte durch diese Studie nicht geklärt werden.

5.7 Resümee und Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebene intramyokardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation überlebte im Infarktgebiet in der „frühen“ Phase nach einer akuten myokardialen Ischämie. Darüber hinaus zeigten die Zellen, innerhalb spezifischer MSC-Cluster, eine aktive Proliferation. Diese Erkenntnisse führen zu der Annahme, dass die isolierte MSC-Subpopulation eine wichtige Rolle zur Optimierung zukünftiger klinischer stammzelltherapeutischer Ansätze (zellbasiert oder indirekt durch Stimulation) nach einem MI spielen könnte.

Vorherige Arbeiten, die MSCs charakterisierten und ihre regenerativen Effekte auf das post-ischämische Myokard nachwiesen, isolierten MSC-Populationen vor allem aus unterschiedlichen extrakardialen Quellen [81, 140–142, 212]. Ein wichtiger Unterschied zu diesen Arbeiten besteht in der kardial residenten Nischenlokalisierung der hier beschriebenen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation. Andere Arbeiten beschrieben bereits eine Lokalisation von MSCs in kardialen Nischen und demonstrierten ihr regeneratives Potential in der frühen Phase nach MI [65, 106]. Es besteht die Hoffnung, dass über tiefere Einblicke in diese kardialen Stammzellnischen zukünftig das Verständnis von Regulationsmechanismen, spezifischen Signalauslösern und zellspezifischen Wirkmechanismen verbessert werden kann. Dies könnte in der Folge dazu beitragen die Aktivatoren der MSC-Nische zu identifizieren, ihr regeneratives Potential während der Heilungsphasen nach MI zu fördern, sowie ihre Rolle beim Zellumsatz, der Myokardregeneration und der Aufrechterhaltung der Homöostase im myokardialen Gewebe weiter zu charakterisieren [284–286]. Diese Erkenntnisse könnten die Möglichkeit einer gezielten Nischen-Stimulation unterstützen.

Die Etablierung und Standardisierung von Isolations- und Kultivierungsprotokollen von CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs aus dem postischämischen Rattenherz liefert jetzt die Möglichkeit diese Population als Referenzzelle für weitere experimentelle Untersuchungen zu nutzen. Die Wichtigkeit der Standardisierung liegt in der Tatsache begründet, dass MSCs eine heterogene Zellpopulation darstellen, die je nach Herkunft Unterschiede in funktionellen und therapeutischen Eigenschaften aufweist [287]. Ein umfassendes Verständnis der funktionellen und therapeutischen Eigenschaften dieser Zellen, sowie die detaillierte Untersuchung einer gezielten Steuerung stellen dabei relevante Voraussetzungen für klinische Ansätze dar.

In unserem Labor werden derzeit große Anstrengungen unternommen, um die Charakterisierung dieser Zellpopulation weiter zu fördern. Es gilt dabei in weiterführenden experimentellen Untersuchungen ihr therapeutisches Potential in Bezug auf mögliche Transdifferenzierungs- und Signalmechanismen sowohl *in vitro*, als auch anschließend *in vivo* zu klären.

In der Vergangenheit wurden Möglichkeiten einer direkten kardialen Reprogrammierung *in vitro* und *in vivo* beschrieben und als eine erfolgsversprechende therapeutische Möglichkeit angesehen [288–290]. Die kardiale CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation könnte eine mögliche interessante Zielpopulation dieser Strategien in Zukunft darstellen. Das Interesse beruht dabei vor allem auf der Vermutung, dass MSCs aus verschiedenen Quellen, unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen, die unter anderem ihr divergentes kardiomyogenes Differenzierungspotential bedingen [290].

Darüber hinaus wird es zukünftig interessant zu beobachten sein, wie eine mögliche zielgerichtete Therapie mit endogenen kardialen MSCs, durch Kombination oder Beeinflussung anderer Faktoren und Therapiestrategien optimiert werden kann [291]. Solche Ansätze, beispielsweise durch mRNA-basierte kardiale Reprogrammierungsstrategien, wurden jüngst in unserem Labor durch Müller *et al.* gezeigt [290].

Es etablierten sich, als Reaktion auf die enttäuschenden Langezeitergebnisse der MSC-Therapie nach MI, neue Therapiestrategien, die eine Verbesserung der therapeutischen Wirksamkeit zum Ziel haben. Neben gezielter genetischer Veränderung, kann auch eine Präkonditionierung mit unterschiedlichen physikalischen Bedingungen, pharmakologischen Wirkstoffen, Kulturbedingungen und Wachstumsfaktoren zu einer Stärkung des therapeutischen Potentials beitragen [260, 292–295]. Wie in dieser und in anderen Arbeiten aus unserem Labor gezeigt, liefert der pleiotrope Wachstumsfaktor Erythropoetin (EPO) unter anderem in der Kombination mit CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs vielversprechende Ansätze um ihre Wirkung zu fördern [180, 182, 186].

Zusammenfassend liefern die Erkenntnisse bezüglich der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs eine bedeutsame wissenschaftliche Grundlage, auf der zukünftige experimentelle Untersuchungen aufbauen können.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen eines Myokardinfarkts (MI) führt eine akut einsetzende Ischämie des Herzmuskels, bei Ausbleiben einer rechtzeitigen Behandlung, zu einem Absterben von etwa einer Milliarde Herzmuskelzellen. In der Folge kommt es zu einer Entzündungsreaktion und der Ausbildung einer kollagenreichen Narbe. Der Verlust an funktionellem Myokardgewebe, mit nachfolgendem ventrikulärem Remodeling, führt zu einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer ischämischen Herzinsuffizienz. Trotz einer bemerkenswerten Entwicklung unterschiedlicher Therapieoptionen auf diesem Gebiet bleibt die limitiert einsetzbare Herztransplantation bislang die einzige kausale Therapieoption.

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte wurde eine Reihe von verschiedenen Stammzelltypen isoliert, charakterisiert und auf ihr regeneratives Potential im Rahmen eines MI untersucht. Dabei stellt die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen (*engl.* MSCs) aufgrund ihrer residenten, multipotenten und regenerativen Eigenschaften einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Dennoch konnten bisherige Therapieversuche, die auf einer Transplantation von MSCs in das postischämische Herz beruhten, keine konstant positiven therapeutischen Ergebnisse liefern. Ein detailliertes Verständnis dieser Zellen scheint erforderlich, um zelltherapeutische Ansätze optimieren zu können, damit sie konstant und langfristig gute Ergebnisse liefern können.

Im Herzen sind kardiale Zellen, einschließlich MSCs, gemeinsam mit residenten Stammzellen und Stützzellen in einer Nische lokalisiert, die durch verschiedene Faktoren stimuliert und reguliert wird. Eine mögliche gezielte Charakterisierung und Stimulation dieser kardialen residenten Stammzellnische bietet einen vielversprechenden Ansatz zur Optimierung MSC-basierter Therapiestrategien.

Die vorliegende Studie bietet erstmalig anhand durchflusszytometrischer Analysen einen Einblick in eine postischämisch aktiv proliferierende CD29⁺ CD44⁺ CD90⁺ CD105⁺ PDGFRα⁺ DDR2⁺ MSC-Nische im Rattenmodell. 24 Stunden, nach künstlicher Induktion eines permanenten MI in der Ratte, wurden mononukleäre Zellen (*engl.* MNC), sowohl aus dem postischämischen Herzen, als auch aus den Herzen der Kontrollgruppe (*Sham*, ohne MI) enzymatisch extrahiert. Des Weiteren konnte mittels durchflusszytometrischer Analyse der MNCs eine intramyokardiale CD29⁺ CD44⁺ CD90⁺ CD105⁺ PDGFRα⁺ DDR2⁺ MSC-Nische identifiziert werden, die zu diesem frühen Zeitpunkt nach MI stark proliferierte. Subfraktionsanalysen demonstrierten nachfolgend, dass eine CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation einen deutlichen Anstieg nach MI, im Vergleich zur *Sham*-Gruppe, zeigte. Es ist in dieser Studie gelungen, ein Protokoll für die Isolation und langzeitstabile Kultivierung dieser MNC-Subpopulation zu etablieren und in der Folge standardisiert anzuwenden. Diese Etablierung liefert eine bemerkenswerte wissenschaftliche Grundlage für die Isolation und langzeitstabile Kultivierung von MNCs

aus dem Rattenherz, die es ermöglicht, in Zukunft auch andere Zellpopulationen zu isolieren und nachfolgend gezielt zu untersuchen.

In vitro zeigte die CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MNC-Subpopulation sowohl die Fähigkeit zur Bildung von fibroblastenähnlichen klonogenen Vorläufern (*engl.* CFU-F), als auch ein ausgeprägtes multipotentes Differenzierungspotential. Damit erfüllten diese kardialen MNCs alle funktionellen MSC-definierenden Kriterien, so dass die Zellen folglich als mesenchymale Stammzellpopulation betrachtet werden kann.

Des Weiteren konnten in dieser Arbeit therapeutische Effekte der kardialen früh-postischämischen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs aufgezeigt werden. Die Zellen zeigten während einer sieben-tägigen Co-Kultivierung mit murinen neonatalen Kardiomyozyten eine erhöhte Expression der frühen kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA4. Darüber hinaus wiesen wir in einem Co-Kultur-Modell ausgeprägte proangiogene Eigenschaften der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation auf Endothelzellen nach. Bemerkenswerterweise konnte eine Supplementierung mit dem pleiotropen Wachstumsfaktor Erythropoetin, sowohl das kardiomyogene Potential, als auch die proangiogenen Fähigkeiten der kardialen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs zusätzlich fördern, was ihr gemeinsames therapeutisches Potential vermuten lässt.

Das nachgewiesene kardiomyogene und proangiogene Potential der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSCs bietet einen wichtigen therapeutischen Ansatz, der durch eine gezielte Steuerung weiter genutzt werden kann. Diese Eigenschaften deuten auf eine mögliche entscheidende Beteiligung dieser kardialen postischämischen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation in der Heilungsphase nach einem MI hin und unterstreichen ihr großes regeneratives Potential.

Der in dieser Arbeit gegebene Einblick in eine funktionelle mesenchymale Stammzellnische, sowie die Etablierung von Protokollen zur Isolation und Kultivierung einer ischämisch präkonditionierten MSC-Subpopulation liefern eine wichtige wissenschaftliche Voraussetzung, um zukünftige experimentelle Versuche und therapeutische Ansätze zu optimieren sowie ein detaillierteres Verständnis dieser MSCs, als auch ihrer Nischenlokalisation zu entwickeln. Dabei steht die CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation zukünftig als Referenzzelle für weitere experimentelle Studien zur Verfügung.

7. Thesen

1. Die koronare Herzkrankheit und ihre Folgen gehören in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen und gehen trotz enormer Fortschritte in der Behandlung oftmals mit einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität und einer gesteigerten Letalität einher.
2. Mesenchymale Stammzellen (*engl.* MSCs) bieten vor allem aufgrund ihrer immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften ein großes Potential zu Therapie der ischämischen Herzinsuffizienz.
3. Ein detaillierter Einblick und die Stimulation von kardial residenten MSC-Nischen stellt einen wichtigen Forschungsansatz dar, um das therapeutische Ergebnis einer MSC-Therapie nach einem Myokardinfarkt zu verbessern.
4. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das adulte Rattenherz über eine residente mesenchymale Stammzellpopulation verfügt, die sich innerhalb einer intramyokardialen Nische lokalisiert.
5. Eine myokardiale Ischämie im Rahmen eines Myokardinfarkts stellt einen starken Aktivator der Proliferation innerhalb einer identifizierten intramyokardialen CD29⁺ CD44⁺ CD90⁺ CD105⁺ PDGFR α ⁺ DDR2⁺ MSC-Nische im Rattenherz dar.
6. Im früh-postischämischen Myokard der Ratte zeigte eine CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ Zellsubpopulation eine starke Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe.
7. Die in dieser Arbeit etablierte Methodik zur gezielten Isolation und durchflusszytometrischen Sortierung von mononukleären Zellen aus dem Rattenherz liefert eine wichtige Grundvoraussetzung zur weiteren Charakterisierung dieser intramyokardialen Zellen.
8. Eine Kultivierung der isolierten mononukleären Zellen, über 1-2 Passagen vor der durchflusszytometrischen Sortierung, stellt eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche langfristige Kultivierung der Zielzellpopulation dar.
9. Die isolierte kardiale postischämische CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ Zellsubpopulation zeigt klare Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen.

10. Der Nachweis der ausgeprägten proangiogenen Effekte und des kardiomyogenen Differenzierungspotentials der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation liefert wichtige Erkenntnisse über das regenerative Potential dieser Zellen.
11. Erythropoetin fördert, durch eine Steigerung der proangiogenen Effekte und des kardiomyogenen Differenzierungspotentials, das regenerative Potential der CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation.
12. Die zukünftige Verfügbarkeit der kardialen postischämischen CD45⁻ CD44⁺ DDR2⁺ MSC-Subpopulation als Referenzzelle, liefert eine wichtige Voraussetzung für weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Obrastzow W.P., S. N.D. Zur Kenntnis der Thrombose der Koronararterien des Herzens. *Zeitschrift für Klinische Medizin* 1910, 71, 116–132.
- [2] Working Group on Ischaemic Heart Disease Registers. 1971. *Ischaemic heart disease registers; report of the Fifth Working Group, including a second revision of the operating protocol*, Copenhagen, Denmark.
- [3] Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., and White, H. D. 2019. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European heart journal* 40, 3, 237–269.
- [4] Weltgesundheitsorganisation, R. f. E. 2012. Leading causes of death in Europe Fact Sheet (Ger).
- [5] Statistisches Bundesamt. Statistisches Jahrbuch 2019, 129–132.
- [6] Herold, G. 2019. *Innere Medizin 2019*. Herold, Gerd, Köln, 237–248.
- [7] Müller-Riemenschneider, F., Andersohn, F., and Willich, S. N. 2010. Trends in age-standardised and age-specific mortality from ischaemic heart disease in Germany. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 99, 9, 545–551.
- [8] Gößwald, A., Schienkiewitz, A., Nowossadeck, E., and Busch, M. A. 2013. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland: Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56, 5-6, 650–655.
- [9] Löwel, H., Meisinger, C., Heier, M., and Hörmann, A. 2005. The population-based acute myocardial infarction (AMI) registry of the MONICA/KORA study region of Augsburg. *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 67 Suppl 1, S31-7.
- [10] Kuch, B., Heier, M., Scheidt, W. von, Kling, B., Hoermann, A., and Meisinger, C. 2008. 20-year trends in clinical characteristics, therapy and short-term prognosis in acute myocardial infarction according to presenting electrocardiogram: the MONICA/KORA AMI Registry (1985-2004). *Journal of internal medicine* 264, 3, 254–264.
- [11] WM Blankesteyn E. Creemers E. Lutgens JPM Cleutjens MJAP Daemen JFM Smits. 2001. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*, 173, 75–82.
- [12] Prugger, C., Heidrich, J., Wellmann, J., Dittrich, R., Brand, S.-M., Telgmann, R., Breithardt, G., Reinecke, H., Scheld, H., Kleine-Katthöfer, P., Heuschmann, P. U., and Keil,

- U. 2012. Trends in cardiovascular risk factors among patients with coronary heart disease: results from the EUROASPIRE I, II, and III surveys in the Münster region. *Deutsches Arzteblatt international* 109, 17, 303–310.
- [13] Frangogiannis, N. G. 2012. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation research* 110, 1, 159–173.
- [14] Lewis, E. F., Moye, L. A., Rouleau, J. L., Sacks, F. M., Arnold, J. M. O., Warnica, J. W., Flaker, G. C., Braunwald, E., and Pfeffer, M. A. 2003. Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *Journal of the American College of Cardiology* 42, 8, 1446–1453.
- [15] Weil, B. R. and Neelamegham, S. 2019. Selectins and Immune Cells in Acute Myocardial Infarction and Post-infarction Ventricular Remodeling: Pathophysiology and Novel Treatments. *Frontiers in immunology* 10, 300.
- [16] Braunwald, E. 2013. Heart failure. *JACC. Heart failure* 1, 1, 1–20.
- [17] Erdmann, E. 2011. *Klinische Kardiologie. Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. Springer, Berlin, New York, 15–19.
- [18] Blum, H. E. and Müller-Wieland, D. 2018. *Klinische Pathophysiologie*. Thieme, Stuttgart, 732–739.
- [19] Steffel, J., Lüscher, T. F., and Brunckhorst, C. 2011. *Herz-Kreislauf*. Springer, Heidelberg, 47–62.
- [20] Ertl, G. and Frantz, S. 2005. Healing after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 66, 1, 22–32.
- [21] Frangogiannis, N. G. 2008. The immune system and cardiac repair. *Pharmacological research* 58, 2, 88–111.
- [22] Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M. J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A. L. P., Crea, F., Goudevenos, J. A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M. J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., and Widimský, P. 2018. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 39, 2, 119–177.
- [23] Neumann, F. J., Sousa-Uva, M., Ahlsson, A., Alfonso, F., Banning, A. P., Benedetto, U., Byrne, R. A., Collet, J.-P., Falk, V., Head, S. J., Juni, P., Kastrati, A., Koller, A., Kristensen, S. D., Niebauer, J., Richter, D. J., Seferović, P. M., Sibbing, D., Stefanini, G. G., Windecker, S., Yadav, R., and Zembala, M. O. 2018. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Kardiologia polska* 76, 12, 1585–1664.

- [24] Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., Bax, J. J., Borger, M. A., Brotons, C., Chew, D. P., Gencer, B., Hasenfuss, G., Kjeldsen, K., Lancellotti, P., Landmesser, U., Mehilli, J., Mukherjee, D., Storey, R. F., and Windecker, S. 2016. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal* 37, 3, 267–315.
- [25] Braunwald, E. 1997. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *The New England journal of medicine* 337, 19, 1360–1369.
- [26] Felker, G. M., Shaw, L. K., and O'Connor, C. M. 2002. A standardized definition of ischemic cardiomyopathy for use in clinical research. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 2, 210–218.
- [27] Albakri, A. 2018. Ischemic heart failure: A review of clinical status and meta-analysis of diagnosis and clinical management methods. *Clin Med Invest* 3, 4.
- [28] Hamm, W., Rizas, K., and Bauer, A. 2015. Ischämische Kardiomyopathie. Marker des autonomen Tonus. *Herzschrittmachertherapie & Elektrophysiologie* 26, 1, 12–16.
- [29] Carrel, T., Englberger, L., Martinelli, M. V., Takala, J., Boesch, C., Sigurdadottir, V., Gygax, E., Kadner, A., and Mohacsi, P. 2012. Continuous flow left ventricular assist devices: a valid option for heart failure patients. *Swiss medical weekly* 142, w13701.
- [30] Klose, G., Ed. 1989. *Arteriosklerose. Molekulare und zelluläre Mechanismen Sicherheit von Prävention und Therapie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [31] Kittleson, M. M. and Kobashigawa, J. A. 2017. Cardiac Transplantation: Current Outcomes and Contemporary Controversies. *JACC. Heart failure* 5, 12, 857–868.
- [32] 2019. *Jahresbericht 2018. Ogan spende und Transplantation in Deutschland*. Deutsche Stiftung Organtransplantation, Frankfurt am Main.
- [33] Huang, S. and Frangogiannis, N. G. 2018. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *British journal of pharmacology* 175, 9, 1377–1400.
- [34] Cheng, Y. and Rong, J. 2018. Macrophage Polarization as a Therapeutic Target in Myocardial Infarction. *Current drug targets* 19, 6, 651–662.
- [35] Chen, Z., Chen, L., Zeng, C., and Wang, W. E. 2018. Functionally Improved Mesenchymal Stem Cells to Better Treat Myocardial Infarction. *Stem cells international* 2018, 7045245.
- [36] Becker, R. O., Chapin, S., and Sherry, R. 1974. Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians. *Nature* 248, 5444, 145–147.

- [37] Poss, K. D., Wilson, L. G., and Keating, M. T. 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science (New York, N.Y.)* 298, 5601, 2188–2190.
- [38] Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. A., Richardson, J. A., Olson, E. N., and Sadek, H. A. 2011. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, N.Y.)* 331, 6020, 1078–1080.
- [39] Talman, V. and Ruskoaho, H. 2016. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell and tissue research* 365, 3, 563–581.
- [40] Mallory GK, White PD, Salcedo-Salgar J. 1939. The speed of healing of myocardial infarction. A study of the pathologic anatomy in seventy-two cases. *Am Heart J*, 18, 647.
- [41] Nishibori, M. 2018. HMGB1 as a representative DAMP and anti-HMGB1 antibody therapy. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica* 151, 1, 4–8.
- [42] Xia, C., Braunstein, Z., Toomey, A. C., Zhong, J., and Rao, X. 2017. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Frontiers in immunology* 8, 1908.
- [43] Prabhu, S. D. and Frangogiannis, N. G. 2016. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research* 119, 1, 91–112.
- [44] Lugin, J., Parapanov, R., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Feihl, F., Waeber, B., Müller, O., Vergely, C., Zeller, M., Tardivel, A., Schneider, P., Pacher, P., and Liaudet, L. 2015. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194, 2, 499–503.
- [45] Lin, L. and Knowlton, A. A. 2014. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. *Life sciences* 100, 1, 1–8.
- [46] Haan, J. J. de, Smeets, M. B., Pasterkamp, G., and Arslan, F. 2013. Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators of inflammation* 2013, 206039.
- [47] Karin, M. and Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity. *Annual review of immunology* 18, 621–663.
- [48] Frangogiannis, N. G. 2014. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature reviews. Cardiology* 11, 5, 255–265.
- [49] Horckmans, M., Ring, L., Duchene, J., Santovito, D., Schloss, M. J., Drechsler, M., Weber, C., Soehnlein, O., and Steffens, S. 2017. Neutrophils orchestrate post-myocardial infarction healing by polarizing macrophages towards a reparative phenotype. *European heart journal* 38, 3, 187–197.
- [50] Leuschner, F., Rauch, P. J., Ueno, T., Gorbato, R., Marinelli, B., Lee, W. W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., Sena, B., Chudnovskiy, A., Panizzi, P., Keliher, E., Higgins, J. M., Libby, P., Moskowitz, M. A., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Weissleder,

- R., and Nahrendorf, M. 2012. Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *The Journal of experimental medicine* 209, 1, 123–137.
- [51] Virag, J. I. and Murry, C. E. 2003. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *The American journal of pathology* 163, 6, 2433–2440.
- [52] Majmudar, M. D., Keliher, E. J., Heidt, T., Leuschner, F., Truelove, J., Sena, B. F., Gorbato, R., Iwamoto, Y., Dutta, P., Wojtkiewicz, G., Courties, G., Sebas, M., Boro-dovsky, A., Fitzgerald, K., Nolte, M. W., Dickneite, G., Chen, J. W., Anderson, D. G., Swirski, F. K., Weissleder, R., and Nahrendorf, M. 2013. Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* 127, 20, 2038–2046.
- [53] Dang, M. A., Batra, A., Freise, I., Kühl, A., Erben, U., and Siegmund, B. 2014. Polari-sierte Makrophagen verändern ihren Phänotyp entsprechend des lokalen Zytokin-Mili-eus. *Z Gastroenterol* 52, 08.
- [54] Mouton, A. J., DeLeon-Pennell, K. Y., Rivera Gonzalez, O. J., Flynn, E. R., Freeman, T. C., Saucerman, J. J., Garrett, M. R., Ma, Y., Harmancey, R., and Lindsey, M. L. 2018. Mapping macrophage polarization over the myocardial infarction time continuum. *Basic research in cardiology* 113, 4, 26.
- [55] O'Rourke, S. A., Dunne, A., and Monaghan, M. G. 2019. The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Frontiers in cardiovas-cular medicine* 6, 101.
- [56] Ma, Y., Iyer, R. P., Jung, M., Czubryt, M. P., and Lindsey, M. L. 2017. Cardiac Fib-roblast Activation Post-Myocardial Infarction: Current Knowledge Gaps. *Trends in phar-macological sciences* 38, 5, 448–458.
- [57] van den Borne, S. W. M., Diez, J., Blankesteyn, W. M., Verjans, J., Hofstra, L., and Na-rula, J. 2010. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. *Nature reviews. Cardiology* 7, 1, 30–37.
- [58] Fishbein, M. C., Maclean, D., and Maroko, P. R. 1978. Experimental myocardial infarc-tion in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *The American journal of pathology* 90, 1, 57–70.
- [59] Laflamme, M. A. and Murry, C. E. 2011. Heart regeneration. *Nature* 473, 7347, 326–335.
- [60] Poolman, R. A. and Brooks, G. 1998. Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30, 10, 2121–2135.

- [61] Cui, B., Zheng, Y., Sun, L., Shi, T., Shi, Z., Wang, L., Huang, G., and Sun, N. 2018. Heart Regeneration in Adult Mammals after Myocardial Damage. *Acta Cardiologica Sinica* 34, 2, 115–123.
- [62] Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kassar-Hara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., and Anversa, P. 2003. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 6, 763–776.
- [63] Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogórek, B., Ferreira-Martins, J., Goichberg, P., Rondon-Clavo, C., Sanada, F., D'Amario, D., Rota, M., Del Monte, F., Orlic, D., Tisdale, J., Leri, A., and Anversa, P. 2010. Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circulation research* 107, 2, 305–315.
- [64] Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B. A., Druid, H., Jovinge, S., and Frisén, J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)* 324, 5923, 98–102.
- [65] van Wijk, B., Gunst, Q. D., Moorman, A. F. M., and van den Hoff, M. J. B. 2012. Cardiac regeneration from activated epicardium. *PloS one* 7, 9, e44692.
- [66] Santini, M. P., Forte, E., Harvey, R. P., and Kovacic, J. C. 2016. Developmental origin and lineage plasticity of endogenous cardiac stem cells. *Development (Cambridge, England)* 143, 8, 1242–1258.
- [67] Müller, P., Lemcke, H., and David, R. 2018. Stem Cell Therapy in Heart Diseases - Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 48, 6, 2607–2655.
- [68] Kolios, G. and Moodley, Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases* 85, 1, 3–10.
- [69] Smith, A. J., Lewis, F. C., Aquila, I., Waring, C. D., Nocera, A., Agosti, V., Nadal-Ginard, B., Torella, D., and Ellison, G. M. 2014. Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit⁺ cardiac stem cells from the adult mouse and rat heart. *Nature protocols* 9, 7, 1662–1681.
- [70] Hodgkinson, C. P., Bareja, A., Gomez, J. A., and Dzau, V. J. 2016. Emerging Concepts in Paracrine Mechanisms in Regenerative Cardiovascular Medicine and Biology. *Circulation research* 118, 1, 95–107.
- [71] Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)* 282, 5391, 1145–1147.

- [72] Talkhabi, M., Aghdami, N., and Baharvand, H. 2016. Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art. *Life sciences* 145, 98–113.
- [73] Caspi, O., Huber, I., Kehat, I., Habib, M., Arbel, G., Gepstein, A., Yankelson, L., Aronson, D., Beyar, R., and Gepstein, L. 2007. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *Journal of the American College of Cardiology* 50, 19, 1884–1893.
- [74] Cai, J., Yi, F.-F., Yang, X.-C., Lin, G.-S., Jiang, H., Wang, T., and Xia, Z. 2007. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy* 9, 3, 283–291.
- [75] Min, J.-Y., Yang, Y., Sullivan, M. F., Ke, Q., Converso, K. L., Chen, Y., Morgan, J. P., and Xiao, Y.-F. 2003. Long-term improvement of cardiac function in rats after infarction by transplantation of embryonic stem cells. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 125, 2, 361–369.
- [76] van Laake, L. W., Passier, R., Monshouwer-Kloots, J., Verkleij, A. J., Lips, D. J., Freund, C., den Ouden, K., Ward-van Oostwaard, D., Korving, J., Tertoolen, L. G., van Echteld, C. J., Doevendans, P. A., and Mummery, C. L. 2007. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes survive and mature in the mouse heart and transiently improve function after myocardial infarction. *Stem cell research* 1, 1, 9–24.
- [77] Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Parouchev, A., Cacciapuoti, I., Al-Daccak, R., Benhamouda, N., Blons, H., Agbulut, O., Tosca, L., Trouvin, J.-H., Fabreguettes, J.-R., Bellamy, V., Charron, D., Tartour, E., Tachdjian, G., Desnos, M., and Larghero, J. 2018. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 71, 4, 429–438.
- [78] Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., Trouvin, J.-H., Fabreguettes, J.-R., Bellamy, V., Guillemain, R., Suberbielle Boissel, C., Tartour, E., Desnos, M., and Larghero, J. 2015. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European heart journal* 36, 30, 2011–2017.
- [79] Lo, B. and Parham, L. 2009. Ethical issues in stem cell research. *Endocrine reviews* 30, 3, 204–213.
- [80] Bittner, R. E., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Höger, H., Elbe-Bürger, A., and Wachtler, F. 1999. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anatomy and embryology* 199, 5, 391–396.

- [81] Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A., and Anversa, P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 6829, 701–705.
- [82] Dimmeler, S. and Zeiher, A. M. 2009. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 113, 3, 155–160.
- [83] Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölscher-mann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, D. G., Hamm, C. W., Süselbeck, T., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. 2006. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine* 355, 12, 1210–1221.
- [84] Huikuri, H. V., Kervinen, K., Niemelä, M., Ylitalo, K., Säily, M., Koistinen, P., Savolainen, E.-R., Ukkonen, H., Pietilä, M., Airaksinen, J. K. E., Knuuti, J., and Mäkitallio, T. H. 2008. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *European heart journal* 29, 22, 2723–2732.
- [85] Traverse, J. H., Henry, T. D., Ellis, S. G., Pepine, C. J., Willerson, J. T., Zhao, D. X. M., Forder, J. R., Byrne, B. J., Hatzopoulos, A. K., Penn, M. S., Perin, E. C., Baran, K. W., Chambers, J., Lambert, C., Raveendran, G., Simon, D. I., Vaughan, D. E., Simpson, L. M., Gee, A. P., Taylor, D. A., Cogle, C. R., Thomas, J. D., Silva, G. V., Jorgenson, B. C., Olson, R. E., Bowman, S., Francescon, J., Geither, C., Handberg, E., Smith, D. X., Baraniuk, S., Piller, L. B., Loghin, C., Aguilar, D., Richman, S., Zierold, C., Bettencourt, J., Sayre, S. L., Vojvodic, R. W., Skarlatos, S. I., Gordon, D. J., Ebert, R. F., Kwak, M., Moyé, L. A., and Simari, R. D. 2011. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *JAMA* 306, 19, 2110–2119.
- [86] Pätälä, T., Lehtinen, M., Vento, A., Schildt, J., Sinisalo, J., Laine, M., Hämmäinen, P., Nihtinen, A., Alitalo, R., Nikkinen, P., Ahonen, A., Holmström, M., Lauerma, K., Pöyhkä, R., Kupari, M., Kankuri, E., and Harjula, A. 2014. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in ischemic heart failure: a prospective, controlled, randomized, double-blind study of cell transplantation combined with coronary bypass. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 33, 6, 567–574.
- [87] Jeevanantham, V., Butler, M., Saad, A., Abdel-Latif, A., Zuba-Surma, E. K., and Dawn, B. 2012. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 126, 5, 551–568.

- [88] Jong, R. de, Houtgraaf, J. H., Samiei, S., Boersma, E., and Duckers, H. J. 2014. Intra-coronary stem cell infusion after acute myocardial infarction: a meta-analysis and update on clinical trials. *Circulation. Cardiovascular interventions* 7, 2, 156–167.
- [89] Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.-D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schümichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., and Steinhoff, G. 2003. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet (London, England)* 361, 9351, 45–46.
- [90] Ahmadi, H., Baharvand, H., Ashtiani, S. K., Soleimani, M., Sadeghian, H., Ardekani, J. M., Mehrjerdi, N. Z., Kouhkan, A., Namiri, M., Madani-Civi, M., Fattahi, F., Shahverdi, A., and Dizaji, A. V. 2007. Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Current neurovascular research* 4, 3, 153–160.
- [91] Yerebakan, C., Kaminski, A., Westphal, B., Donndorf, P., Glass, A., Liebold, A., Stamm, C., and Steinhoff, G. 2011. Impact of preoperative left ventricular function and time from infarction on the long-term benefits after intramyocardial CD133(+) bone marrow stem cell transplant. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 142, 6, 1530-9.e3.
- [92] Ahmadi, H., Farahani, M. M., Kouhkan, A., Moazzami, K., Fazeli, R., Sadeghian, H., Namiri, M., Madani-Civi, M., Baharvand, H., and Aghdami, N. 2012. Five-year follow-up of the local autologous transplantation of CD133+ enriched bone marrow cells in patients with myocardial infarction. *Archives of Iranian medicine* 15, 1, 32–35.
- [93] Steinhoff, G., Nesteruk, J., Wolfien, M., Kundt, G., Börgermann, J., David, R., Garbade, J., Große, J., Haverich, A., Hennig, H., Kaminski, A., Lotz, J., Mohr, F.-W., Müller, P., Oostendorp, R., Ruch, U., Sarikouch, S., Skorska, A., Stamm, C., Tiedemann, G., Wagner, F. M., and Wolkenhauer, O. 2017. Cardiac Function Improvement and Bone Marrow Response -: Outcome Analysis of the Randomized PERFECT Phase III Clinical Trial of Intramyocardial CD133+ Application After Myocardial Infarction. *EBioMedicine* 22, 208–224.
- [94] Kanelidis, A. J., Premer, C., Lopez, J., Balkan, W., and Hare, J. M. 2017. Route of Delivery Modulates the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction: A Meta-Analysis of Preclinical Studies and Clinical Trials. *Circulation research* 120, 7, 1139–1150.
- [95] Karantalis, V., DiFede, D. L., Gerstenblith, G., Pham, S., Symes, J., Zambrano, J. P., Fishman, J., Pattany, P., McNiece, I., Conte, J., Schulman, S., Wu, K., Shah, A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schwarz, R., Feigenbaum, G., Mushtaq, M., Suncion, V. Y., Lardo, A. C., Borrello, I., Mendizabal, A., Karas, T. Z., Byrnes, J., Lowery, M., Held-

- man, A. W., and Hare, J. M. 2014. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circulation research* 114, 8, 1302–1310.
- [96] Gao, L. R., Pei, X. T., Ding, Q. A., Chen, Y., Zhang, N. K., Chen, H. Y., Wang, Z. G., Wang, Y. F., Zhu, Z. M., Li, T. C., Liu, H. L., Tong, Z. C., Yang, Y., Nan, X., Guo, F., Shen, J. L., Shen, Y. H., Zhang, J. J., Fei, Y. X., Xu, H. T., Wang, L. H., Tian, H. T., Liu, D. Q., and Yang, Y. 2013. A critical challenge: dosage-related efficacy and acute complication intracoronary injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *International journal of cardiology* 168, 4, 3191–3199.
- [97] Chullikana, A., Majumdar, A. S., Gottipamula, S., Krishnamurthy, S., Kumar, A. S., Prakash, V. S., and Gupta, P. K. 2015. Randomized, double-blind, phase I/II study of intravenous allogeneic mesenchymal stromal cells in acute myocardial infarction. *Cytotherapy* 17, 3, 250–261.
- [98] Heldman, A. W., DiFede, D. L., Fishman, J. E., Zambrano, J. P., Trachtenberg, B. H., Karantalis, V., Mushtaq, M., Williams, A. R., Suncion, V. Y., McNiece, I. K., Ghersin, E., Soto, V., Lopera, G., Miki, R., Willens, H., Hendel, R., Mitrani, R., Pattany, P., Feigenbaum, G., Oskoue, B., Byrnes, J., Lowery, M. H., Sierra, J., Pujol, M. V., Delgado, C., Gonzalez, P. J., Rodriguez, J. E., Bagno, L. L., Rouy, D., Altman, P., Foo, C. W. P., da Silva, J., Anderson, E., Schwarz, R., Mendizabal, A., and Hare, J. M. 2014. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 311, 1, 62–73.
- [99] Bagno, L., Hatzistergos, K. E., Balkan, W., and Hare, J. M. 2018. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Cardiovascular Disease: Progress and Challenges. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26, 7, 1610–1623.
- [100] Zwetsloot, P. P., Gremmels, H., Assmus, B., Koudstaal, S., Sluijter, J. P. G., Zeiher, A. M., and Chamuleau, S. A. J. 2016. Responder Definition in Clinical Stem Cell Trials in Cardiology: Will the Real Responder Please Stand Up? *Circulation research* 119, 4, 514–518.
- [101] Becher, U. M., Tiyerili, V., Skowasch, D., Nickenig, G., and Werner, N. 2011. Personalized cardiac regeneration by stem cells-Hype or hope? *The EPMA journal* 2, 1, 119–130.
- [102] Weinberger, F., Mehrkens, D., Friedrich, F. W., Stubbendorff, M., Hua, X., Müller, J. C., Schrepfer, S., Evans, S. M., Carrier, L., and Eschenhagen, T. 2012. Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circulation research* 110, 10, 1303–1310.

- [103] Riley, P. R. and Smart, N. 2009. Thymosin beta4 induces epicardium-derived neovascularization in the adult heart. *Biochemical Society transactions* 37, Pt 6, 1218–1220.
- [104] van Berlo, J. H., Kanisicak, O., Maillet, M., Vagnozzi, R. J., Karch, J., Lin, S.-C. J., Middleton, R. C., Marbán, E., and Molkentin, J. D. 2014. c-kit⁺ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature* 509, 7500, 337–341.
- [105] Uchida, S., Gaspari, P. de, Kostin, S., Jenniches, K., Kilic, A., Izumiya, Y., Shiojima, I., Grosse Kreymborg, K., Renz, H., Walsh, K., and Braun, T. 2013. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem cell reports* 1, 5, 397–410.
- [106] Chong, J. J. H., Chandrakanthan, V., Xaymardan, M., Asli, N. S., Li, J., Ahmed, I., Hefernan, C., Menon, M. K., Scarlett, C. J., Rashidianfar, A., Biben, C., Zoellner, H., Colvin, E. K., Pimanda, J. E., Biankin, A. V., Zhou, B., Pu, W. T., Prall, O. W. J., and Harvey, R. P. 2011. Adult cardiac-resident MSC-like stem cells with a proepicardial origin. *Cell stem cell* 9, 6, 527–540.
- [107] Bolli, R., Tang, X.-L., Sanganalmath, S. K., Rimoldi, O., Mosna, F., Abdel-Latif, A., Jneid, H., Rota, M., Leri, A., and Kajstura, J. 2013. Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 128, 2, 122–131.
- [108] Zwetsloot, P. P., Végh, A. M. D., Jansen of Lorkeers, S. J., van Hout, G. P. J., Currie, G. L., Sena, E. S., Gremmels, H., Buikema, J. W., Goumans, M.-J., Macleod, M. R., Doevendans, P. A., Chamuleau, S. A. J., and Sluijter, J. P. G. 2016. Cardiac Stem Cell Treatment in Myocardial Infarction: A Systematic Review and Meta-Analysis of Preclinical Studies. *Circulation research* 118, 8, 1223–1232.
- [109] Bolli, R., Chugh, A. R., D'Amario, D., Loughran, J. H., Stoddard, M. F., Ikram, S., Beache, G. M., Wagner, S. G., Leri, A., Hosoda, T., Sanada, F., Elmore, J. B., Goichberg, P., Cappetta, D., Solankhi, N. K., Fahsah, I., Rokosh, D. G., Slaughter, M. S., Kajstura, J., and Anversa, P. 2011. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet (London, England)* 378, 9806, 1847–1857.
- [110] Ishigami, S., Ohtsuki, S., Eitoku, T., Ousaka, D., Kondo, M., Kurita, Y., Hirai, K., Fukushima, Y., Baba, K., Goto, T., Horio, N., Kobayashi, J., Kuroko, Y., Kotani, Y., Arai, S., Iwasaki, T., Sato, S., Kasahara, S., Sano, S., and Oh, H. 2017. Intracoronary Cardiac Progenitor Cells in Single Ventricle Physiology: The PERSEUS (Cardiac Progenitor Cell Infusion to Treat Univentricular Heart Disease) Randomized Phase 2 Trial. *Circulation research* 120, 7, 1162–1173.

- [111] Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 5, 861–872.
- [112] Rikhtegar, R., Pezeshkian, M., Dolati, S., Safaie, N., Afrasiabi Rad, A., Mahdipour, M., Nouri, M., Jodati, A. R., and Yousefi, M. 2019. Stem cells as therapy for heart disease: iPSCs, ESCs, CSCs, and skeletal myoblasts. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 109, 304–313.
- [113] Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., and Terzic, A. 2010. Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine. *Nature reviews. Cardiology* 7, 12, 700–710.
- [114] Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., and Sawa, Y. 2012. Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 126, 11 Suppl 1, S29-37.
- [115] Gao, L., Gregorich, Z. R., Zhu, W., Mattapally, S., Oduk, Y., Lou, X., Kannappan, R., Borovjagin, A. V., Walcott, G. P., Pollard, A. E., Fast, V. G., Hu, X., Lloyd, S. G., Ge, Y., and Zhang, J. 2018. Large Cardiac Muscle Patches Engineered From Human Induced-Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cells Improve Recovery From Myocardial Infarction in Swine. *Circulation* 137, 16, 1712–1730.
- [116] Carpenter, L., Carr, C., Yang, C. T., Stuckey, D. J., Clarke, K., and Watt, S. M. 2012. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that provide protection following myocardial infarction in the rat. *Stem cells and development* 21, 6, 977–986.
- [117] Yan, B., Abdelli, L. S., and Singla, D. K. 2011. Transplanted induced pluripotent stem cells improve cardiac function and induce neovascularization in the infarcted hearts of db/db mice. *Molecular pharmaceuticals* 8, 5, 1602–1610.
- [118] Singla, D. K., Long, X., Glass, C., Singla, R. D., and Yan, B. 2011. Induced pluripotent stem (iPS) cells repair and regenerate infarcted myocardium. *Molecular pharmaceuticals* 8, 5, 1573–1581.
- [119] Yoshihara, M., Hayashizaki, Y., and Murakawa, Y. 2017. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem cell reviews and reports* 13, 1, 7–16.
- [120] Nombela-Arrieta, C., Ritz, J., and Silberstein, L. E. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 2, 126–131.
- [121] Wysoczynski, M., Guo, Y., Moore, J. B., Muthusamy, S., Li, Q., Nasr, M., Li, H., Nong, Y., Wu, W., Tomlin, A. A., Zhu, X., Hunt, G., Gumpert, A. M., Book, M. J., Khan, A.,

- Tang, X.-L., and Bolli, R. 2017. Myocardial Reparative Properties of Cardiac Mesenchymal Cells Isolated on the Basis of Adherence. *Journal of the American College of Cardiology* 69, 14, 1824–1838.
- [122] Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., and Keiliss-Borok, I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 17, 4, 331–340.
- [123] Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 9, 5, 641–650.
- [124] Owen, M. 1988. Marrow stromal stem cells. *Journal of cell science. Supplement* 10, 63–76.
- [125] Dennis, J. E., Merriam, A., Awadallah, A., Yoo, J. U., Johnstone, B., and Caplan, A. I. 1999. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14, 5, 700–709.
- [126] Bianco, P. and Gehron Robey, P. 2000. Marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation* 105, 12, 1663–1668.
- [127] Caplan, A. I. 2010. What's in a name? *Tissue engineering. Part A* 16, 8, 2415–2417.
- [128] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 4, 315–317.
- [129] Zimmerlin, L., Donnenberg, V. S., Rubin, J. P., and Donnenberg, A. D. 2013. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 83, 1, 134–140.
- [130] Kaiser, S., Hackanson, B., Follo, M., Mehlhorn, A., Geiger, K., Ihorst, G., and Kapp, U. 2007. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy* 9, 5, 439–450.
- [131] Lv, F.-J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. C., and Leung, V. Y. L. 2014. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32, 6, 1408–1419.
- [132] Uder, C., Brückner, S., Winkler, S., Tautenhahn, H.-M., and Christ, B. 2018. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 93, 1, 32–49.
- [133] Sági, B., Maraghechi, P., Urbán, V. S., Hegyi, B., Szigeti, A., Fajka-Boja, R., Kudlik, G., Németh, K., Monostori, E., Gócsa, E., and Uher, F. 2012. Positional identity of murine

- mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem cells and development* 21, 5, 814–828.
- [134] Shen, J., Tsai, Y.-T., Dimarco, N. M., Long, M. A., Sun, X., and Tang, L. 2011. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. *Scientific reports* 1, 67.
- [135] Harting, M., Jimenez, F., Pati, S., Baumgartner, J., and Cox, C. 2008. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 10, 3, 243–253.
- [136] Futami, I., Ishijima, M., Kaneko, H., Tsuji, K., Ichikawa-Tomikawa, N., Sadatsuki, R., Muneta, T., Arikawa-Hirasawa, E., Sekiya, I., and Kaneko, K. 2012. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal cells from the mouse synovium. *PloS one* 7, 9, e45517.
- [137] Bianco, P., Robey, P. G., and Simmons, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell* 2, 4, 313–319.
- [138] Ganguly, P., El-Jawhari, J. J., Burska, A. N., Ponchel, F., Giannoudis, P. V., and Jones, E. A. 2019. The Analysis of In Vivo Aging in Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Using Colony-Forming Unit-Fibroblast Assay and the CD45^{low}CD271⁺ Phenotype. *Stem cells international* 2019, 5197983.
- [139] Golpanian, S., Wolf, A., Hatzistergos, K. E., and Hare, J. M. 2016. Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiological reviews* 96, 3, 1127–1168.
- [140] Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A. I. 1995. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle & nerve* 18, 12, 1417–1426.
- [141] Yerebakan, C., Sandica, E., Prietz, S., Klopsch, C., Ugurlucan, M., Kaminski, A., Abdija, S., Lorenzen, B., Boltze, J., Nitzsche, B., Egger, D., Barten, M., Furlani, D., Ma, N., Vollmar, B., Liebold, A., and Steinhoff, G. 2009. Autologous umbilical cord blood mononuclear cell transplantation preserves right ventricular function in a novel model of chronic right ventricular volume overload. *Cell transplantation* 18, 8, 855–868.
- [142] Gaebel, R., Furlani, D., Sorg, H., Polchow, B., Frank, J., Bieback, K., Wang, W., Klopsch, C., Ong, L.-L., Li, W., Ma, N., and Steinhoff, G. 2011. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PloS one* 6, 2, e15652.
- [143] Szaraz, P., Gratch, Y. S., Iqbal, F., and Librach, C. L. 2017. In Vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 126.
- [144] Pei, Z., Zeng, J., Song, Y., Gao, Y., Wu, R., Chen, Y., Li, F., Li, W., Zhou, H., and Yang, Y. 2017. In vivo imaging to monitor differentiation and therapeutic effects of

- transplanted mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Scientific reports* 7, 1, 6296.
- [145] Rangappa, S., Entwistle, J. W. C., Wechsler, A. S., and Kresh, J. Y. 2003. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 126, 1, 124–132.
- [146] Hare, J. M., Fishman, J. E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D. L., Zambrano, J. P., Suncion, V. Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P. V., Brinker, J. A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schulman, I. H., Byrnes, J., Mendizabal, A. M., Lowery, M. H., Rouy, D., Altman, P., Wong Po Foo, C., Ruiz, P., Amador, A., da Silva, J., McNiece, I. K., Heldman, A. W., George, R., and Lardo, A. 2012. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow–derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308, 22, 2369–2379.
- [147] Pankajakshan, D. and Agrawal, D. K. 2014. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *Journal of biomedical technology and research* 1, 1.
- [148] Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A. L., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.-L., Tse, H.-F., Fu, Q.-L., and Lian, Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease* 7, e2062.
- [149] Caplan, A. I. and Dennis, J. E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry* 98, 5, 1076–1084.
- [150] Windmolders, S., Boeck, A. de, Koninckx, R., Daniëls, A., Wever, O. de, Bracke, M., Hendrikx, M., Hensen, K., and Rummens, J.-L. 2014. Mesenchymal stem cell secreted platelet derived growth factor exerts a pro-migratory effect on resident Cardiac Atrial appendage Stem Cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 66, 177–188.
- [151] Zhang, Z., Yang, J., Yan, W., Li, Y., Shen, Z., and Asahara, T. 2016. Pretreatment of Cardiac Stem Cells With Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Enhances Myocardial Repair. *Journal of the American Heart Association* 5, 1.
- [152] Kfoury, Y. and Scadden, D. T. 2015. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell stem cell* 16, 3, 239–253.
- [153] Mazhari, R. and Hare, J. M. 2007. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 4 Suppl 1, S21-6.
- [154] Hatzistergos, K. E., Quevedo, H., Oskouei, B. N., Hu, Q., Feigenbaum, G. S., Margitich, I. S., Mazhari, R., Boyle, A. J., Zambrano, J. P., Rodriguez, J. E., Dulce, R., Pattany, P. M., Valdes, D., Revilla, C., Heldman, A. W., McNiece, I., and Hare, J. M.

2010. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation research* 107, 7, 913–922.
- [155] Klopsch, C., Skorska, A., Ludwig, M., Gaebel, R., Lemcke, H., Kleiner, G., Beyer, M., Vollmar, B., David, R., and Steinhoff, G. 2017. Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 58, 5-6, 341–353.
- [156] Carmona, R., Guadix, J. A., Cano, E., Ruiz-Villalba, A., Portillo-Sánchez, V., Pérez-Pomares, J. M., and Muñoz-Chápuli, R. 2010. The embryonic epicardium: an essential element of cardiac development. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 8, 2066–2072.
- [157] Pérez-Pomares, J. M. and La Pompa, J. L. de. 2011. Signaling during epicardium and coronary vessel development. *Circulation research* 109, 12, 1429–1442.
- [158] Pérez-Pomares, J. M., Macías, D., García-Garrido, L., and Muñoz-Chápuli, R. 1998. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Developmental biology* 200, 1, 57–68.
- [159] Cai, C.-L., Martin, J. C., Sun, Y., Cui, L., Wang, L., Ouyang, K., Yang, L., Bu, L., Liang, X., Zhang, X., Stallcup, W. B., Denton, C. P., McCulloch, A., Chen, J., and Evans, S. M. 2008. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454, 7200, 104–108.
- [160] Bargehr, J., Ong, L. P., Colzani, M., Davaapil, H., Hofsteen, P., Bhandari, S., Gambardella, L., Le Novère, N., Iyer, D., Sampaziotis, F., Weinberger, F., Bertero, A., Leonard, A., Bernard, W. G., Martinson, A., Figg, N., Regnier, M., Bennett, M. R., Murry, C. E., and Sinha, S. 2019. Epicardial cells derived from human embryonic stem cells augment cardiomyocyte-driven heart regeneration. *Nature biotechnology* 37, 8, 895–906.
- [161] Gittenberger-de Groot, A. C., Winter, E. M., and Poelmann, R. E. 2010. Epicardium-derived cells (EPDCs) in development, cardiac disease and repair of ischemia. *Journal of cellular and molecular medicine* 14, 5, 1056–1060.
- [162] Smits, A. M., Dronkers, E., and Goumans, M.-J. 2018. The epicardium as a source of multipotent adult cardiac progenitor cells: Their origin, role and fate. *Pharmacological research* 127, 129–140.
- [163] Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., and Nieto, M. A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 5, 871–890.
- [164] Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G., and Poss, K. D. 2006. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 3, 607–619.

- [165] Yadav, S. K. and Mishra, P. K. 2018. Isolation, Characterization and Differentiation of Mouse Cardiac Progenitor Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1842, 183–191.
- [166] Barile, L., Chimenti, I., Gaetani, R., Forte, E., Miraldi, F., Frati, G., Messina, E., and Giacomello, A. 2007. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine* 4 Suppl 1, S9-S14.
- [167] Klopsch, C., Gaebel, R., Lemcke, H., Beyer, M., Vasudevan, P., Fang, H.-Y., Quante, M., Vollmar, B., Skorska, A., David, R., and Steinhoff, G. 2018. Vimentin-Induced Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate in the Acute Ischemic Myocardium. *Cells, tissues, organs* 206, 1-2, 35–45.
- [168] Smits, A. M., van Vliet, P., Metz, C. H., Korfage, T., Sluijter, J. P., Doevendans, P. A., and Goumans, M.-J. 2009. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nature protocols* 4, 2, 232–243.
- [169] Song, L., Webb, N. E., Song, Y., and Tuan, R. S. 2006. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 7, 1707–1718.
- [170] Mendez, M. G., Kojima, S.-I., and Goldman, R. D. 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24, 6, 1838–1851.
- [171] Zhou, B. and Pu, W. T. 2011. Epicardial epithelial-to-mesenchymal transition in injured heart. *Journal of cellular and molecular medicine* 15, 12, 2781–2783.
- [172] Koul, D., Dhar, S., Chen-Scarabelli, C., Guglin, M., and Scarabelli, T. M. 2007. Erythropoietin: new horizon in cardiovascular medicine. *Recent patents on cardiovascular drug discovery* 2, 1, 5–12.
- [173] Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 12, 5510–5514.
- [174] Jelkmann, W. 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological reviews* 72, 2, 449–489.
- [175] Jelkmann, W. and Wagner, K. 2004. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Annals of hematology* 83, 11, 673–686.
- [176] Fisher, J. W. 2003. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 228, 1, 1–14.

- [177] Paffett-Lugassy N, Z. L. I. 2002. Epo-EpoR signaling not required for cardiovascular or neural development. *Blood.*, 100, 2277.
- [178] Parsa, C. J., Matsumoto, A., Kim, J., Riel, R. U., Pascal, L. S., Walton, G. B., Thompson, R. B., Petrofski, J. A., Annex, B. H., Stamler, J. S., and Koch, W. J. 2003. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *The Journal of clinical investigation* 112, 7, 999–1007.
- [179] Zhang, D., Zhang, F., Zhang, Y., Gao, X., Li, C., Yang, N., and Cao, K. 2007. Combining erythropoietin infusion with intramyocardial delivery of bone marrow cells is more effective for cardiac repair. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation* 20, 2, 174–183.
- [180] Klopsch, C., Skorska, A., Ludwig, M., Lemcke, H., Maass, G., Gaebel, R., Beyer, M., Lux, C., Toelk, A., Müller, K., Maschmeier, C., Rohde, S., Mela, P., Müller-Hilke, B., Jockenhoevel, S., Vollmar, B., Jaster, R., David, R., and Steinhoff, G. 2018. Intramyocardial angiogenetic stem cells and epicardial erythropoietin save the acute ischemic heart. *Disease models & mechanisms* 11, 6.
- [181] Zwezdaryk, K. J., Coffelt, S. B., Figueroa, Y. G., Liu, J., Phinney, D. G., LaMarca, H. L., Florez, L., Morris, C. B., Hoyle, G. W., and Scandurro, A. B. 2007. Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 35, 4, 640–652.
- [182] Klopsch, C., Furlani, D., Gäbel, R., Li, W., Pittermann, E., Ugurlucan, M., Kundt, G., Zingler, C., Titze, U., Wang, W., Ong, L.-L., Wagner, K., Li, R.-K., Ma, N., and Steinhoff, G. 2009. Intracardiac injection of erythropoietin induces stem cell recruitment and improves cardiac functions in a rat myocardial infarction model. *Journal of cellular and molecular medicine* 13, 4, 664–679.
- [183] Gonzalez, D. M. and Medici, D. 2014. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science signaling* 7, 344, re8.
- [184] Nishita, M., Hashimoto, M. K., Ogata, S., Laurent, M. N., Ueno, N., Shibuya, H., and Cho, K. W. 2000. Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 6771, 781–785.
- [185] Furlani, D., Klopsch, C., Gäbel, R., Ugurlucan, M., Pittermann, E., Klee, D., Wagner, K., Li, W., Wang, W., Ong, L. L., Nizze, H., Titze, U., Lützow, K., Lendlein, A., Steinhoff, G., and Ma, N. 2008. Intracardiac erythropoietin injection reveals antiinflammatory potential and improved cardiac functions detected by Forced Swim Test. *Transplantation proceedings* 40, 4, 962–966.
- [186] Gäbel, R., Klopsch, C., Furlani, D., Yerebakan, C., Li, W., Ugurlucan, M., Ma, N., and Steinhoff, G. 2009. Single high-dose intramyocardial administration of erythropoietin

- promotes early intracardiac proliferation, proves safety and restores cardiac performance after myocardial infarction in rats. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery* 9, 1, 20-5; discussion 25.
- [187] Prunier, F., Pfister, O., Hadri, L., Liang, L., Del Monte, F., Liao, R., and Hajjar, R. J. 2007. Delayed erythropoietin therapy reduces post-MI cardiac remodeling only at a dose that mobilizes endothelial progenitor cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292, 1, H522-9.
- [188] Lipsic, E., van der Meer, P., Henning, R. H., Suurmeijer, A. J. H., Boddeus, K. M., van Veldhuisen, D. J., van Gilst, W. H., and Schoemaker, R. G. 2004. Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion. *Journal of cardiovascular pharmacology* 44, 4, 473–479.
- [189] Müller-Ehmsen, J., Krausgrill, B., Burst, V., Schenk, K., Neisen, U. C., Fries, J. W. U., Fleischmann, B. K., Hescheler, J., and Schwinger, R. H. G. 2006. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 41, 5, 876–884.
- [190] Zhang, D., Zhang, F., Zhang, Y., Gao, X., Li, C., Ma, W., and Cao, K. 2007. Erythropoietin enhances the angiogenic potency of autologous bone marrow stromal cells in a rat model of myocardial infarction. *Cardiology* 108, 4, 228–236.
- [191] Copland, I. B., Jolicoeur, E. M., Gillis, M.-A., Cuerquis, J., Eliopoulos, N., Annabi, B., Calderone, A., Tanguay, J.-F., Ducharme, A., and Galipeau, J. 2008. Coupling erythropoietin secretion to mesenchymal stromal cells enhances their regenerative properties. *Cardiovascular research* 79, 3, 405–415.
- [192] Ott, I., Schulz, S., Mehilli, J., Fichtner, S., Hadamitzky, M., Hoppe, K., Ibrahim, T., Martinoff, S., Massberg, S., Laugwitz, K.-L., Dirschinger, J., Schwaiger, M., Kastrati, A., and Schmig, A. 2010. Erythropoietin in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized, double-blind trial. *Circulation. Cardiovascular interventions* 3, 5, 408–413.
- [193] Voors, A. A., Belonje, A. M. S., Zijlstra, F., Hillege, H. L., Anker, S. D., Slart, R. H. J. A., Tio, R. A., van 't Hof, A., Jukema, J. W., Peels, H. O. J., Henriques, J. P. S., Berg, J. M. ten, Vos, J., van Gilst, W. H., and van Veldhuisen, D. J. 2010. A single dose of erythropoietin in ST-elevation myocardial infarction. *European heart journal* 31, 21, 2593–2600.
- [194] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* 284, 5411, 143–147.

- [195] Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., and Prockop, D. J. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7, 3213–3218.
- [196] Farahani, R. M. and Xaymardan, M. 2015. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology. *Stem cells international* 2015, 362753.
- [197] Crawford, J. R., Haudek, S. B., Cieslik, K. A., Trial, J., and Entman, M. L. 2012. Origin of developmental precursors dictates the pathophysiologic role of cardiac fibroblasts. *Journal of cardiovascular translational research* 5, 6, 749–759.
- [198] Mildmay-White, A. and Khan, W. 2017. Cell Surface Markers on Adipose-Derived Stem Cells: A Systematic Review. *Current stem cell research & therapy* 12, 6, 484–492.
- [199] L Ramos, T., Sánchez-Abarca, L. I., Muntión, S., Preciado, S., Puig, N., López-Ruano, G., Hernández-Hernández, Á., Redondo, A., Ortega, R., Rodríguez, C., Sánchez-Guijo, F., and del Cañizo, C. 2016. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell communication and signaling : CCS* 14, 2.
- [200] Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Dai, J., and Lue, T. F. 2013. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. *Histology and histopathology* 28, 9, 1109–1116.
- [201] Lemcke, H., Gaebel, R., Skorska, A., Voronina, N., Lux, C. A., Petters, J., Sasse, S., Zarniko, N., Steinhoff, G., and David, R. 2017. Mechanisms of stem cell based cardiac repair-gap junctional signaling promotes the cardiac lineage specification of mesenchymal stem cells. *Scientific reports* 7, 1, 9755.
- [202] Lemcke, H., Peukert, J., Voronina, N., Skorska, A., Steinhoff, G., and David, R. 2016. Applying 3D-FRAP microscopy to analyse gap junction-dependent shuttling of small antisense RNAs between cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 98, 117–127.
- [203] Voronina, N., Lemcke, H., Wiekhorst, F., Kühn, J.-P., Rimmbach, C., Steinhoff, G., and David, R. 2016. Non-viral magnetic engineering of endothelial cells with microRNA and plasmid-DNA-An optimized targeting approach. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 12, 8, 2353–2364.
- [204] Gaebel, R., Ma, N., Liu, J., Guan, J., Koch, L., Klopsch, C., Gruene, M., Toelk, A., Wang, W., Mark, P., Wang, F., Chichkov, B., Li, W., and Steinhoff, G. 2011. Patterning human stem cells and endothelial cells with laser printing for cardiac regeneration. *Bio-materials* 32, 35, 9218–9230.

- [205] Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 3, 4, 393–403.
- [206] Baxa, C. A., Sha, R. S., Buelt, M. K., Smith, A. J., Matarese, V., Chinander, L. L., Boundy, K. L., and Bernlohr, D. A. 1989. Human adipocyte lipid-binding protein: purification of the protein and cloning of its complementary DNA. *Biochemistry* 28, 22, 8683–8690.
- [207] Gundberg, C. M., Hauschka, P. V., Lian, J. B., and Gallop, P. M. 1984. Osteocalcin: isolation, characterization, and detection. *Methods in enzymology* 107, 516–544.
- [208] Schedlich, L. J., Flanagan, J. L., Crofts, L. A., Gillies, S. A., Goldberg, D., Morrison, N. A., and Eisman, J. A. 1994. Transcriptional activation of the human osteocalcin gene by basic fibroblast growth factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 9, 2, 143–152.
- [209] Rassow, J. 2012. *Duale Reihe Biochemie*. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart, 395.
- [210] Doppler, S. A., Carvalho, C., Lahm, H., Deutsch, M.-A., Dreßen, M., Puluca, N., Lange, R., and Krane, M. 2017. Cardiac fibroblasts: more than mechanical support. *Journal of thoracic disease* 9, Suppl 1, S36-S51.
- [211] Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K., and Baudino, T. A. 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 293, 3, H1883-91.
- [212] Möllmann, H., Nef, H. M., Kostin, S., Kalle, C. von, Pilz, I., Weber, M., Schaper, J., Hamm, C. W., and Elsässer, A. 2006. Bone marrow-derived cells contribute to infarct remodelling. *Cardiovascular research* 71, 4, 661–671.
- [213] Carlson, S., Trial, J., Soeller, C., and Entman, M. L. 2011. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction. *Cardiovascular research* 91, 1, 99–107.
- [214] Barnett, P. and van den Hoff, M. J. B. 2011. Cardiac regeneration: different cells same goal. *Medical & biological engineering & computing* 49, 7, 723–732.
- [215] van Vliet, P., Sluijter, J. P. G., Doevendans, P. A., and Goumans, M.-J. 2007. Isolation and expansion of resident cardiac progenitor cells. *Expert review of cardiovascular therapy* 5, 1, 33–43.
- [216] Chen, S., Shimoda, M., Chen, J., and Grayburn, P. A. 2013. Stimulation of adult resident cardiac progenitor cells by durable myocardial expression of thymosin beta 4 with ultrasound-targeted microbubble delivery. *Gene therapy* 20, 2, 225–233.
- [217] Ju, H. and Dixon, I. M. C. 1995. Cardiac Extracellular Matrix and its Role in the Development of Heart Failure. In *Mechanisms of Heart Failure*, P. K. Singal, I. M. C. Dixon, R.

- E. Beamish and N. S. Dhalla, Eds. *Developments in Cardiovascular Medicine*. Springer US, Boston, MA, 75–90. DOI=10.1007/978-1-4615-2003-0_7.
- [218] Grossmann, J. 2002. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 7, 3, 247–260.
- [219] Valentijn, A. J., Zouq, N., and Gilmore, A. P. 2004. Anoikis. *Biochemical Society transactions* 32, Pt3, 421–425.
- [220] Frisch, S. M. and Ruoslahti, E. 1997. Integrins and anoikis. *Current opinion in cell biology* 9, 5, 701–706.
- [221] Evans, R. M. 1998. Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 20, 1, 79–86.
- [222] Kalluri, R. and Weinberg, R. A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 6, 1420–1428.
- [223] Nieto, M. A. 2009. Epithelial-Mesenchymal Transitions in development and disease: old views and new perspectives. *The International journal of developmental biology* 53, 8-10, 1541–1547.
- [224] Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., and Ho, A. D. 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology* 33, 11, 1402–1416.
- [225] Battula, V. L., Evans, K. W., Hollier, B. G., Shi, Y., Marini, F. C., Ayyanan, A., Wang, R.-Y., Briskin, C., Guerra, R., Andreeff, M., and Mani, S. A. 2010. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 28, 8, 1435–1445.
- [226] Goldsmith, E. C., Hoffman, A., Morales, M. O., Potts, J. D., Price, R. L., McFadden, A., Rice, M., and Borg, T. K. 2004. Organization of fibroblasts in the heart. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 230, 4, 787–794.
- [227] van Amerongen, M. J., Bou-Gharios, G., Popa, E., van Ark, J., Petersen, A. H., van Dam, G. M., van Luyn, M. J. A., and Harmsen, M. C. 2008. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute functionally to scar formation after myocardial infarction. *The Journal of pathology* 214, 3, 377–386.
- [228] Dewald, O., Ren, G., Duerr, G. D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., Tincey, S., Michael, L. H., Entman, M. L., and Frangogiannis, N. G. 2004. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *The American journal of pathology* 164, 2, 665–677.

- [229] Pevsner-Fischer, M., Levin, S., and Zipori, D. 2011. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem cell reviews and reports* 7, 3, 560–568.
- [230] Kolf, C. M., Cho, E., and Tuan, R. S. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy* 9, 1, 204.
- [231] Bühring, H.-J., Battula, V. L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., and Vogel, W. 2007. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1106, 262–271.
- [232] Delorme, B., Ringe, J., Gallay, N., Le Vern, Y., Kerboeuf, D., Jorgensen, C., Rosset, P., Sensebé, L., Layrolle, P., Häupl, T., and Charbord, P. 2008. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111, 5, 2631–2635.
- [233] Martinez, C., Hofmann, T. J., Marino, R., Dominici, M., and Horwitz, E. M. 2007. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* 109, 10, 4245–4248.
- [234] La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., Di Stefano, A., Giannuzzi, P., Marasà, L., Cappello, F., Zummo, G., and Farina, F. 2009. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochemistry and cell biology* 131, 2, 267–282.
- [235] Mensing, N., Gasse, H., Hambruch, N., Haeger, J.-D., Pfarrer, C., and Staszky, C. 2011. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC veterinary research* 7, 42.
- [236] Smart, N., Bollini, S., Dubé, K. N., Vieira, J. M., Zhou, B., Davidson, S., Yellon, D., Riegler, J., Price, A. N., Lythgoe, M. F., Pu, W. T., and Riley, P. R. 2011. De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474, 7353, 640–644.
- [237] Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S. M., Domian, I., Rivera-Feliciano, J., Jiang, D., Gise, A. von, Ikeda, S., Chien, K. R., and Pu, W. T. 2008. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454, 7200, 109–113.
- [238] Gise, A. von and Pu, W. T. 2012. Endocardial and epicardial epithelial to mesenchymal transitions in heart development and disease. *Circulation research* 110, 12, 1628–1645.
- [239] Kasahara, H., Ueyama, T., Wakimoto, H., Liu, M. K., Maguire, C. T., Converso, K. L., Kang, P. M., Manning, W. J., Lawitts, J., Paul, D. L., Berul, C. I., and Izumo, S. 2003. Nkx2.5 homeoprotein regulates expression of gap junction protein connexin 43 and

- p sarcomere organization in postnatal cardiomyocytes.
- Journal of molecular and cellular cardiology*
- 35, 3, 243–256.
- [240] Yadav, S. K. and Mishra, P. K. 2019. Isolation, Characterization, and Differentiation of Cardiac Stem Cells from the Adult Mouse Heart. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 143.
- [241] Christoforou, N., Miller, R. A., Hill, C. M., Jie, C. C., McCallion, A. S., and Gearhart, J. D. 2008. Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *The Journal of clinical investigation* 118, 3, 894–903.
- [242] Cai, X., Nomura-Kitabayashi, A., Cai, W., Yan, J., Christoffels, V. M., and Cai, C.-L. 2011. Myocardial Tbx20 regulates early atrioventricular canal formation and endocardial epithelial-mesenchymal transition via Bmp2. *Developmental biology* 360, 2, 381–390.
- [243] Kattman, S. J., Witty, A. D., Gagliardi, M., Dubois, N. C., Niapour, M., Hotta, A., Ellis, J., and Keller, G. 2011. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell stem cell* 8, 2, 228–240.
- [244] Skerjanc, I. S. 1999. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends in cardiovascular medicine* 9, 5, 139–143.
- [245] Xing, Y., Lv, A., Wang, L., and Yan, X. 2012. The combination of angiotensin II and 5-azacytidine promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular biochemistry* 360, 1-2, 279–287.
- [246] Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., and Kessler, P. D. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 1, 93–98.
- [247] Shen, H., Wang, Y., Zhang, Z., Yang, J., Hu, S., and Shen, Z. 2015. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regenerative Therapy: Optimization of Cell Differentiation Strategy. *Stem cells international* 2015, 524756.
- [248] Siegel, G., Krause, P., Wöhrle, S., Nowak, P., Ayturan, M., Kluba, T., Brehm, B. R., Neumeister, B., Köhler, D., Rosenberger, P., Just, L., Northoff, H., and Schäfer, R. 2012. Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells express cardiomyogenic proteins but do not exhibit functional cardiomyogenic differentiation potential. *Stem cells and development* 21, 13, 2457–2470.
- [249] He, X.-Q., Chen, M.-S., Li, S.-H., Liu, S.-M., Zhong, Y., McDonald Kinkaid, H. Y., Lu, W.-Y., Weisel, R. D., and Li, R.-K. 2010. Co-culture with cardiomyocytes enhanced the myogenic conversion of mesenchymal stromal cells in a dose-dependent manner. *Molecular and cellular biochemistry* 339, 1-2, 89–98.

- [250] Lagostena, L., Avitabile, D., Falco, E. de, Orlandi, A., Grassi, F., Iachininoto, M. G., Ragonè, G., Fucile, S., Pompilio, G., Eusebi, F., Pesce, M., and Capogrossi, M. C. 2005. Electrophysiological properties of mouse bone marrow c-kit⁺ cells co-cultured onto neonatal cardiac myocytes. *Cardiovascular research* 66, 3, 482–492.
- [251] Rose, R. A., Jiang, H., Wang, X., Helke, S., Tsoporis, J. N., Gong, N., Keating, S. C. J., Parker, T. G., Backx, P. H., and Keating, A. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26, 11, 2884–2892.
- [252] Williams, A. R. and Hare, J. M. 2011. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation research* 109, 8, 923–940.
- [253] Decrock, E., Vinken, M., Vuyst, E. de, Krysko, D. V., D'Herde, K., Vanhaecke, T., Vandenameele, P., Rogiers, V., and Leybaert, L. 2009. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell death and differentiation* 16, 4, 524–536.
- [254] Valiunas, V., Doronin, S., Valiuniene, L., Potapova, I., Zuckerman, J., Walcott, B., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Brink, P. R., and Cohen, I. S. 2004. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *The Journal of physiology* 555, Pt 3, 617–626.
- [255] Beeres, S. L. M. A., Atsma, D. E., van der Laarse, A., Pijnappels, D. A., van Tuyn, J., Fibbe, W. E., Vries, A. A. F. de, Ypey, D. L., van der Wall, E. E., and Schalij, M. J. 2005. Human adult bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *Journal of the American College of Cardiology* 46, 10, 1943–1952.
- [256] Pijnappels, D. A., Schalij, M. J., van Tuyn, J., Ypey, D. L., Vries, A. A. F. de, van der Wall, E. E., van der Laarse, A., and Atsma, D. E. 2006. Progressive increase in conduction velocity across human mesenchymal stem cells is mediated by enhanced electrical coupling. *Cardiovascular research* 72, 2, 282–291.
- [257] Ramkisoensing, A. A., Pijnappels, D. A., Swildens, J., Goumans, M. J., Fibbe, W. E., Schalij, M. J., Vries, A. A. F. de, and Atsma, D. E. 2012. Gap junctional coupling with cardiomyocytes is necessary but not sufficient for cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30, 6, 1236–1245.
- [258] Rossini, A., Frati, C., Lagrasta, C., Graiani, G., Scopece, A., Cavalli, S., Musso, E., Baccarin, M., Di Segni, M., Fagnoni, F., Germani, A., Quaini, E., Mayr, M., Xu, Q., Barbuti, A., DiFrancesco, D., Pompilio, G., Quaini, F., Gaetano, C., and Capogrossi, M. C.

2011. Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin. *Cardiovascular research* 89, 3, 650–660.
- [259] Ramesh, B., Bishi, D. K., Rallapalli, S., Arumugam, S., Cherian, K. M., and Guhathakurta, S. 2012. Ischemic cardiac tissue conditioned media induced differentiation of human mesenchymal stem cells into early stage cardiomyocytes. *Cytotechnology* 64, 5, 563–575.
- [260] Carvalho, J. L., Braga, V. B. A., Melo, M. B., Campos, A. C. D. A., Oliveira, M. S., Gomes, D. A., Ferreira, A. J., Santos, R. A. S., and Goes, A. M. 2013. Priming mesenchymal stem cells boosts stem cell therapy to treat myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine* 17, 5, 617–625.
- [261] Zafiriou, M. P., Noack, C., Unsöld, B., Didie, M., Pavlova, E., Fischer, H. J., Reichardt, H. M., Bergmann, M. W., El-Armouche, A., Zimmermann, W.-H., and Zelarayan, L. C. 2014. Erythropoietin responsive cardiomyogenic cells contribute to heart repair post myocardial infarction. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32, 9, 2480–2491.
- [262] Chua, S., Leu, S., Lin, Y.-C., Sheu, J.-J., Sun, C.-K., Chung, S.-Y., Chai, H.-T., Lee, F.-Y., Kao, Y.-H., Wu, C.-J., Chang, L.-T., Ko, S.-F., and Yip, H.-K. 2011. Early erythropoietin therapy attenuates remodeling and preserves function of left ventricle in porcine myocardial infarction. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 59, 3, 574–586.
- [263] Lampe, P. D. and Lau, A. F. 2004. The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 7, 1171–1186.
- [264] Ai, Z., Fischer, A., Spray, D. C., Brown, A. M., and Fishman, G. I. 2000. Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *The Journal of clinical investigation* 105, 2, 161–171.
- [265] Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S. E. 2004. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation research* 94, 5, 678–685.
- [266] Gu, W., Hong, X., Potter, C., Qu, A., and Xu, Q. 2017. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 24, 1.
- [267] Gallina, C., Turinetti, V., and Giachino, C. 2015. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem cells international* 2015, 765846.
- [268] Zhao, L., Johnson, T., and Liu, D. 2017. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem cell research & therapy* 8, 1, 125.

- [269] Beer, L., Mildner, M., and Ankersmit, H. J. 2017. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: when regulatory affairs meet basic science. *Annals of translational medicine* 5, 7, 170.
- [270] Zuo, S., Jones, W. K., Li, H., He, Z., Pasha, Z., Yang, Y., Wang, Y., Fan, G.-C., Ashraf, M., and Xu, M. 2012. Paracrine effect of Wnt11-overexpressing mesenchymal stem cells on ischemic injury. *Stem cells and development* 21, 4, 598–608.
- [271] Gong, M., Yu, B., Wang, J., Wang, Y., Liu, M., Paul, C., Millard, R. W., Xiao, D.-S., Ashraf, M., and Xu, M. 2017. Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget* 8, 28, 45200–45212.
- [272] Fan, X., Teng, Y., Ye, Z., Zhou, Y., and Tan, W.-S. 2018. The effect of gap junction-mediated transfer of miR-200b on osteogenesis and angiogenesis in a co-culture of MSCs and HUVECs. *Journal of cell science* 131, 13.
- [273] Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H.-J., Giacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J., and Péault, B. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 3, 3, 301–313.
- [274] Crisan, M., Corselli, M., Chen, W. C. W., and Péault, B. 2012. Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 12, 2851–2860.
- [275] Stapor, P. C., Sweat, R. S., Dashti, D. C., Betancourt, A. M., and Murfee, W. L. 2014. Pericyte dynamics during angiogenesis: new insights from new identities. *Journal of vascular research* 51, 3, 163–174.
- [276] Chen, C.-W., Okada, M., Proto, J. D., Gao, X., Sekiya, N., Beckman, S. A., Corselli, M., Crisan, M., Saparov, A., Tobita, K., Péault, B., and Huard, J. 2013. Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31, 2, 305–316.
- [277] Vallabhaneni, K. C., Haller, H., and Dumler, I. 2012. Vascular smooth muscle cells initiate proliferation of mesenchymal stem cells by mitochondrial transfer via tunneling nanotubes. *Stem cells and development* 21, 17, 3104–3113.
- [278] Liu, K., Ji, K., Guo, L., Wu, W., Lu, H., Shan, P., and Yan, C. 2014. Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvascular research* 92, 10–18.
- [279] Hoch, M., Fischer, P., Stapel, B., Missol-Kolka, E., Sekkali, B., Scherr, M., Favret, F., Braun, T., Eder, M., Schuster-Gossler, K., Gossler, A., Hilfiker, A., Balligand, J.-L.,

- Drexler, H., and Hilfiker-Kleiner, D. 2011. Erythropoietin preserves the endothelial differentiation capacity of cardiac progenitor cells and reduces heart failure during anticancer therapies. *Cell stem cell* 9, 2, 131–143.
- [280] Mizukami, T., Iso, Y., Sato, C., Sasai, M., Spees, J. L., Toyoda, M., Umezawa, A., Miyazaki, A., and Suzuki, H. 2016. Priming with erythropoietin enhances cell survival and angiogenic effect of mesenchymal stem cell implantation in rat limb ischemia. *Regenerative therapy* 4, 1–8.
- [281] Wang, Y., Lu, X., He, J., and Zhao, W. 2015. Influence of erythropoietin on microvesicles derived from mesenchymal stem cells protecting renal function of chronic kidney disease. *Stem cell research & therapy* 6, 100.
- [282] Freytes, D. O., Kang, J. W., Marcos-Campos, I., and Vunjak-Novakovic, G. 2013. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 114, 1, 220–229.
- [283] Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. 2010. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell* 7, 2, 150–161.
- [284] Leri, A., Rota, M., Hosoda, T., Goichberg, P., and Anversa, P. 2014. Cardiac stem cell niches. *Stem cell research* 13, 3 Pt B, 631–646.
- [285] Steinhoff, G., Nesteruk, J., Wolfien, M., Große, J., Ruch, U., Vasudevan, P., and Müller, P. 2017. Stem cells and heart disease - Brake or accelerator? *Advanced drug delivery reviews* 120, 2–24.
- [286] Vizoso, F. J., Eiro, N., Costa, L., Esparza, P., Landin, M., Diaz-Rodriguez, P., Schneider, J., and Perez-Fernandez, R. 2019. Mesenchymal Stem Cells in Homeostasis and Systemic Diseases: Hypothesis, Evidences, and Therapeutic Opportunities. *International journal of molecular sciences* 20, 15.
- [287] Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S.-J., Jeon, H. B., Choi, S. J., Kim, S. W., Yang, Y. S., Oh, W., and Chang, J. W. 2013. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International journal of molecular sciences* 14, 9, 17986–18001.
- [288] Miyamoto, K., Akiyama, M., Tamura, F., Isomi, M., Yamakawa, H., Sadahiro, T., Murooka, N., Kojima, H., Haginiwa, S., Kurotsu, S., Tani, H., Wang, L., Qian, L., Inoue, M., Ide, Y., Kurokawa, J., Yamamoto, T., Seki, T., Aeiba, R., Yamagishi, H., Fukuda, K., and Ieda, M. 2018. Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell stem cell* 22, 1, 91-103.e5.
- [289] Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., and Srivastava, D. 2010. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142, 3, 375–386.

- [290] Mueller, P., Wolfien, M., Ekat, K., Lang, C. I., Koczan, D., Wolkenhauer, O., Hahn, O., Peters, K., Lang, H., David, R., and Lemcke, H. 2020. RNA-Based Strategies for Cardiac Reprogramming of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Cells* 9, 2.
- [291] Soler-Botija, C., Bagó, J. R., and Bayes-Genis, A. 2012. A bird's-eye view of cell therapy and tissue engineering for cardiac regeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1254, 57–65.
- [292] Li, W., Ma, N., Ong, L.-L., Nesselmann, C., Klopsch, C., Ladilov, Y., Furlani, D., Piechaczek, C., Moebius, J. M., Lützow, K., Lendlein, A., Stamm, C., Li, R.-K., and Steinhoff, G. 2007. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 8, 2118–2127.
- [293] Ji, S. T., Kim, H., Yun, J., Chung, J. S., and Kwon, S.-M. 2017. Promising Therapeutic Strategies for Mesenchymal Stem Cell-Based Cardiovascular Regeneration: From Cell Priming to Tissue Engineering. *Stem cells international* 2017, 3945403.
- [294] Wei, Z. Z., Zhu, Y.-B., Zhang, J. Y., McCrary, M. R., Wang, S., Zhang, Y.-B., Yu, S.-P., and Wei, L. 2017. Priming of the Cells: Hypoxic Preconditioning for Stem Cell Therapy. *Chinese medical journal* 130, 19, 2361–2374.
- [295] Hahn, J.-Y., Cho, H.-J., Kang, H.-J., Kim, T.-S., Kim, M.-H., Chung, J.-H., Bae, J.-W., Oh, B.-H., Park, Y.-B., and Kim, H.-S. 2008. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 51, 9, 933–943.
-

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Häufigste Todesursachen in Deutschland 2017	12
Abbildung 1.2:	Humane MSC-Kriterien	23
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung der Entwicklung epikardialer Zelllinien durch EMT und MET	27
Abbildung 1.4:	Intramyokardiale mesenchymale Stammzellnische mit Expression typischer MSC-Oberflächenmarker	28
Abbildung 3.1:	Lagerung der intubierten Ratte auf dem Operationstisch	42
Abbildung 3.2:	Fadenführung bei der Ligation des RIVA.....	43
Abbildung 3.3:	Abgeblasstes ischämisches Myokard im Versorgungsgebiet des RIVA.....	43
Abbildung 3.4:	Protokoll zur Isolation von MNCs aus dem Rattenherz.....	45
Abbildung 3.5:	Schematische Darstellung der Zelldichte in der CFU-F Analyse ...	49
Abbildung 3.6:	Schematische Darstellung des Protokolls zur funktionalen Identifizierung mesenchymaler Stammzellen der Ratte.....	50
Abbildung 3.7:	Beispielhafte Darstellung der Auswertung eines Endothelzellnetzwerkes (HUVECs) mittels ImageJ-Software	57
Abbildung 4.1:	Durchflusszytometrische-Analyse der verschiedenen MNC-Subpopulationen 24 Stunden nach der Operation.....	59
Abbildung 4.2:	Repräsentative Gating Strategie einer durchflusszytometrischen Analyse kardialer MNC Fraktion 24h post OP	60
Abbildung 4.3:	Repräsentative durchflusszytometrische Darstellungen der kardialen Zielsubpopulationen 24h nach operativem Eingriff	61
Abbildung 4.4:	Ausgangssituation der Koloniebildung in Abhängigkeit der Zelldichte	63
Abbildung 4.5:	Lichtmikroskopische Darstellung der zelldichteabhängigen CFU-F Bildung	63
Abbildung 4.6:	Übersichtsaufnahme der CFU-F Bildung bei verschiedenen Zelldichten	64
Abbildung 4.7:	Kontrastaufnahme der kardialen CD45 ⁻ CD44 ⁺ DDR2 ⁺ Zellen vor der Induktion der multipotenten Differenzierung	65
Abbildung 4.8:	Kontrastaufnahme der adipogen differenzierten MSCs	65
Abbildung 4.9:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der adipogen differenzierten MSCs.....	66

Abbildung 4.10:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der osteogen differenzierten MSCs.....	66
Abbildung 4.11:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der chondrogen differenzierten MSCs.....	67
Abbildung 4.12:	Repräsentative Bilder der Immunfärbung für den Expressionsnachweis der kardialen Transkriptionsfaktoren GATA4 und Nkx2.5 in Qtracker®-markierten MSCs	68
Abbildung 4.13:	Signalintensitäten der exprimierten kardialen Transkriptionsfaktoren Nkx2.5 und GATA4	69
Abbildung 4.14:	Lichtmikroskopische Aufnahme der Tubuli- und Netzbildung der verschiedenen Kulturansätze auf Matrigel®.....	70
Abbildung 4.15:	Gruppenanalyse auf Bildung von Endothel-Verzweigungen im Co-Kultur-Modell der kardialen MSCs mit HUVECs	71
Abbildung 4.16:	Gruppenanalyse auf Bildung von Knotenpunkten im Co-Kultur-Modell der kardialen MSCs mit HUVECs	71

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Oberflächenmarker-Expressionsprofil von Nagetier-MSCs	24
Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte und Apparaturen	32
Tabelle 2.2: Verwendete Software mit Typen- und Herstellerbezeichnung	33
Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien mit Typen- und Herstellerbezeichnung	34
Tabelle 2.4: Zusammensetzung von Lösungen und Puffern	35
Tabelle 2.5: Verwendete Zellmedien und Zusammensetzung	36
Tabelle 2.6: Verwendetes Operationsbesteck mit Typen- und Herstellerbezeichnung .	37
Tabelle 2.7: Verwendete Medikamente mit Herstellerbezeichnung	38
Tabelle 2.8: Verwendete Kits mit Inhalt und Herstellerbezeichnung	38
Tabelle 2.9: Verwendete Chemikalien und Antikörper mit Herstellerbezeichnung Und Katalognummer	39
Tabelle 3.1: Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur durchflusszytometrischen Analyse	47
Tabelle 3.2: Antikörper-Mix für die Sortierung im Gesamtvolumen von 100 µl Inkubationspuffer	48
Tabelle 3.3: Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur kardiomyogenen Differenzierung – GATA4	55
Tabelle 3.4: Liste der Antikörper und Arbeitskonzentrationen zur kardiomyogenen Differenzierung – Nkx2.5	55
Tabelle 3.5: Gruppen mit Bezeichnung und Kulturansätzen	56

11. Anhänge

11.1 Danksagung

Ich bedanke mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff, meinem Doktorvater, für die Überlassung dieses äußerst interessanten Forschungsthemas sowie für seine stetige Förderung und Ideengebung. Darüber hinaus danke ich Ihm sehr für die bereichernden wissenschaftlichen Diskussionen und seinem persönlichen Interesse an meiner Doktorarbeit. Die gemeinsamen Gespräche waren für mich stets bereichernd und motivierend, so dass ich diese in sehr guter Erinnerung behalten werde.

Prof. Dr. rer. nat. Robert David möchte ich für seine Unterstützung und Förderung während meiner Zeit im Labor danken. Von der Möglichkeit, meine Experimente und Ergebnisse im Rahmen des „Labor-Meetings“ vorzustellen und weitere Ideen im Team zu diskutieren, habe ich stets profitiert und empfand diese als sehr hilfreich für die Anfertigung dieser Arbeit.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Christian Klopsch für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Durch seine Supervisionen konnte diese Forschungsarbeit erst entstehen. Darüber hinaus danke ich Ihm, dass er mir seine Begeisterung und Überzeugung für dieses spannende Thema vermittelt hat. Das freundschaftlich-kollegiale Verhältnis, seine stetige Förderung und Unterstützung sowie die ausführlichen wissenschaftlichen Diskussionen haben mich stets motiviert und mein wissenschaftliches-Interesse und -Denken gefördert.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. hum. Anna Skorska für Ihre immerwährende Unterstützung, Ihre positive Art und Ihre Hilfestellung während meiner Zeit im Labor. Durch Ihre Expertise und Ihren Perfektionismus auf dem Gebiet der Durchflusszytometrie lieferte Sie eine wichtige Grundlage für diese Arbeit. Ich danke Ihr, dass Sie mir jeder Zeit mit konstruktiver Hilfe zur Seite stand und dass durch das beidseitige Interesse an diesem Forschungsthema eine echte Freundschaft entstanden ist.

Dr. rer. nat. Ralf Gäbel möchte ich für die Unterstützung und Hilfestellung bei den Tierexperimenten danken sowie für die vielen lustigen und interessanten Diskussionen, an die ich mich gerne zurückerinnern werde.

Ferner danke ich Herrn Dr. rer. nat. Heiko Lemcke für seine Hilfe, Tipps und Betreuung im Labor sowie für die konstruktiven Gespräche.

Großer Dank gilt weiterhin Frau Prof. Dr. rer. nat. Müller-Hilke und Herrn Dr. rer. nat. Robby Engelmann aus der *Core Facility* für Zellsortierung und Zellanalyse für die Ermöglichung der gezielten durchflusszytometrischen Sortierung der Zielzellpopulationen sowie für die exzellente und präzise Beratung.

Des Weiteren möchte ich mich beim gesamte Laborteam des FKGO für die ausgesprochen schöne Zeit mit anregenden Gespräche, Ideen und Diskussionen herzlich bedanken. Ich habe mich im Labor stets wohlfühlt und werde immer auf eine großartige Zeit zurückblicken.

Meine tiefe Verbundenheit und Dankbarkeit gilt meiner Freundin, Philien Lauer, für Ihr Verständnis, Ihre hilfreiche Unterstützung und Ihre liebenswürde Art, die mir halfen diese Arbeit zu beenden.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, Jörn und Annett Beyer, die mich mit Ihrer liebevollen und familiären Art jederzeit unterstützten und mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben. Deshalb widme ich Ihnen diese Arbeit.

11.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock anerkenne.

Rostock

08.06.2020

Abgabedatum

Martin Beyer

11.3 Curriculum vitae

Familienname: Beyer
Vorname: Martin
Geburtsdatum: 31.05.1993
Geburtsort: Rostock
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Jörn Beyer und Annett Beyer geb. Böhm
Korrespondenz: Hauptstraße 53, 18239 Satow
Mobil: +49 172 1608342
e-mail: beyer.martin20@googlemail.com

Schulbildung:

2000 – 2004 Grundschule am See, Satow
2004 – 2012 Gymnasium Friderico-Francisceum, Bad Doberan
07/2012 Abitur

Bundesfreiwilligendienst:

10/2012 – 06/2013 Universitätsklinikum Rostock, Abteilung für Innere Medizin

Studium:

10/2013 – 01/2020 Studium der Humanmedizin, Universität Rostock
2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Durchschnittsnote: 2,0)
10/2018 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: gut)
11/2019 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Famulaturen:

03/2016	Herzzentrum Leipzig (Klinik für Herzchirurgie)
02/2017	Dr. med. Andreas Klüter (Hausärztlicher Internist), Bad Doberan
07/2017	Kardiologische Gemeinschaftspraxis am Saarplatz, Rostock
08/2018	Universitätsklinikum Rostock - Klinik für Herzchirurgie

Praktisches Jahr:

1. Tertial	Chirurgie (Herz-, Visceral- & Gefäßchirurgie) - Kantonsspital Luzern
2. Tertial	Herzchirurgie - Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen
3. Tertial	Innere Medizin (Abteilung Nephrologie) - Universitätsklinikum Rostock

Promotion:

seit 2015	Forschungsbereich kardialer Gewebe- und Organersatz (FKGO) Klinik für Herzchirurgie an der Universität Rostock Thema: Isolation, Charakterisierung und Differenzierungspotential von früh-postischämischen mesenchymalen intrakardialen Zellen im Kleintiermodell der Ratte
-----------	---

Arbeitsverhältnisse:

02/2020 – 06/2020	wissenschaftliche Hilfskraft der Universität Rostock (FKGO)
ab 07/2020	Assistenzarzt – Universitäres Herz- und Gefäßzentrum UKE Hamburg Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie

Engagement & Erfahrungen:

06/2011	Teilnahme am Schülerstammzellprojekt (BMFZ, Rostock)
seit 02/2017	Mitglied des Jungen Forums der Deutschen Gesellschaft für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie (DGTHG)
02/2018 – 02/2020	Schritfführer des Jungen Forums der DGTHG
seit 02/2020	Stellvertretender Sprecher des Jungen Forums der DGTHG

Martin Beyer

Satow, den 08.06.2020