

**Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle
Transfusionsmedizin
der Universität Tübingen
Ärztlicher Direktor : Professor Dr. H. Northoff**

**Evaluation des kardiomyogenen
Differenzierungspotentials von mesenchymalen
Stammzellen der Ratte mittels Genexpressionsanalyse**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Annika Kristina Köster
aus Stuttgart**

2011

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1 Myokardinfarkt und Ansätze der Zelltherapie	1
1.2 Mesenchymale Stammzellen	2
1.2.1 Stammzellendefinition.....	2
1.2.2 Geschichte.....	3
1.2.3 Definition und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen	4
1.3 Das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs	6
1.4 Kardiale Applikationen von MSCs	8
1.5 Die Gene kardiales α Actin und kardiales Troponin I	10
1.6 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit.....	10
2 Material und Methodik.....	12
2.1 Material	12
2.1.1 Geräte.....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.3 Chemikalien.....	13
2.2 Methodik.....	16
2.2.1 Tiere	16
2.2.2 Isolation des Knochenmarks.....	16
2.2.3 MSC Isolation, Kultivierung und Klonierung.....	16
2.2.4 Adipogene und osteogene <i>in vitro</i> Differenzierung	17
2.2.5 Kardiomyogene Differenzierungsmedien.....	18
2.2.5.1 5- Azazytidin (Wakitani <i>et al.</i> 1995).....	19
2.2.5.2 5-Aza-2-Deoxyzytidin (Wakitani <i>et al.</i> 1995)	19

2.2.5.3	VEGF + FGF2 + PDGF (Xaymardan <i>et al.</i> 2004).....	20
2.2.5.4	BMP4 (Jamali <i>et al.</i> 2001).....	20
2.2.5.5	Noggin (Yuasa <i>et al.</i> 2005).....	21
2.2.5.6	FGF2+BMP2 (Kawai <i>et al.</i> 2004)	21
2.2.6	RNA Isolierung und Quantifizierung der RNA.....	22
2.2.7	Synthese und Aufreinigung der cDNA	24
2.2.8	Real time PCR mittels LightCycler.....	26
2.2.9	Primer	30
2.2.10	Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{CP}$ Methode	31
2.2.11	DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	33
2.2.12	Sequenzierung	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Kultivierung und Klonierung der MSCs.....	35
3.1.1	Wachstum der unklonierten MSCs	35
3.1.2	Wachstum der klonierten MSCs	36
3.2	Nicht-kardiomyogene Differenzierung der MSCs	37
3.3	RNA-Isolation	38
3.4	Kardiomyogene Differenzierung der MSCs	40
3.4.1	PCR Effizienz.....	40
3.4.2	DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.4.3	Sequenzierung.....	42
3.4.4	Ergebnisse der Berechnung der endogenen mRNA Expression ..	43
3.4.5	Ergebnisse der Berechnung der Induktion.....	47
4	Diskussion.....	53
4.1	Charakterisierung der MSCs	53
4.2	Kardiomyogene Differenzierung der MSCs	53

4.3	Vergleich zwischen unklonierten und klonierten MSCs.....	55
4.4	Schlussfolgerung.....	57
5	Zusammenfassung.....	59
6	Abbildungen und Tabellen.....	62
6.1	Abbildungen	62
6.2	Tabellen	63
7	Literaturverzeichnis	65

VII

Abkürzungsverzeichnis

Aza	5- Azazytidin
d-Aza	5- Aza-2`Deoxyzytidin
bp	Basenpaare
BMP	Bone Morphogenetic Protein
cDNA	Complementary DNA
CP	Crossing Point
DNA	Desoxyribonucleinacid
DTT	1, 4- Dithio-DL-threitol Solution
EPC	Endotheliale Progenitorzelle(n)
ES	Embryonale Stammzelle(n)
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast growth factor
g	Schleuderziffer g (Zentrifuge)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
HPLC	High performance liquid Chromatography
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
M	Molar/ Marker für DNA-Länge
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle(n)
MHC	Myosin – heavy - chain

VIII

MIAMI(s)	Mark- isolierte adulte multilineär-induzierbare Zelle(n)
MLC	Myosin – light -chain
mRNA	Messenger Ribonucleinacid
MSC(s)	Mesenchymale Stammzelle(n)
P	Passage
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PSC(s)	Pluripotente Stammzelle(n)
RNA	Ribonucleinacid
RNAse	Ribonuclease
rpm	rounds per minute
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
T _m	Schmelzpunkt
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Myokardinfarkt und Ansätze der Zelltherapie

Laut der Weltgesundheitsorganisation sind die kardiovaskulären Erkrankungen die häufigsten Todesursachen. Ungefähr 17,5 Millionen Menschen starben 2005 an kardiovaskulären Erkrankungen, dies war die Ursache von 30 % aller Todesfälle. Circa 80% dieser kardiovaskulären Todesfälle traten in Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen auf. Wenn keine adäquaten Maßnahmen getroffen werden, werden 2015 voraussichtlich bis zu 20 Millionen Menschen jährlich an kardiovaskulären Ursachen versterben, hauptsächlich an Herzinfarkten und Schlaganfällen. Im Jahr 2004 war die Koronare Herzkrankheit die häufigste Todesursache (52%) unter den Menschen, die an kardiovaskulären Ursachen starben und verursachte die höchsten direkten und indirekten Kosten in den USA (Rosamond *et al.* 2008). In den letzten Jahrzehnten führte die interventionelle und/oder die pharmakologische Therapie weder der akuten Phase nach dem Myokardinfarkt noch der späten Phase oder der Sekundärprophylaxe zu einem Durchbruch im Patienten-outcome (Antman *et al.* 2008; Cohen *et al.* 2007; Fitchett *et al.* 2004). Alle diese konventionellen therapeutischen Strategien konnten nicht die Regeneration des infarzierten, nekrotischen und schlussendlich narbig umgebauten Myokardgewebes erreichen. Beltrami *et al.* widerlegte 2001 das Dogma, dass das Herz ein postmitotisches Organ sei, aber die klinische Realität zeigt, dass die Proliferations- und Regenerationskapazität der Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt *in situ* limitiert ist. Obwohl einige Studien über einen lokalen Vorläuferzellpool berichten („multipotent cardiac stem cells“), der mutmaßlich in den endogenen Regenerationsprozess des infarzierten Herzens involviert ist (Urbanek *et al.* 2005; Urbanek *et al.* 2006; Bu *et al.* 2009) , führen die auf einen Myokardinfarkt folgenden lokalen Prozesse typischerweise nicht zu einer kompletten Regeneration des infarzierten Gewebes z.B. durch Proliferation der Kardiomyozyten oder ausreichende Neovaskularisierung. Die narbige Reorganisation des geschädigten Myokards scheint der beste Reparaturmechanismus zu sein, den die Evolution hervorgebracht hat. So impliziert der Remodeling- Prozess des post Infarkt Herzens un-

erwünschte Änderungen in der Ultrastruktur des Myokards auf der Genebene, der zellulären Ebene und der extrazellulären Matrixebene (Casaciang-Verzosa *et al.* 2008). Man kann also annehmen, dass die Transplantation von Zellen, die sich in die geschädigte Zone (oder in die umliegenden Areale) einfügen und zu der Bildung eines regenerativen Gewebes beitragen, das dem narbigen Herzgewebe überlegen ist, ein großer Schritt in der Therapie von Herzerkrankungen sein würde. Tatsächlich zeigen mehrere Tierstudien und einige klinische Studien, dass die Applikation aus Knochenmark gewonnener mononukleärer Zellen (Strauer *et al.* 2002; Hamano *et al.* 2001; Assmus *et al.* 2002 und 2006; Schachinger *et al.* 2006), Myoblasten (Menasche *et al.* 2001), endothelialer Vorläuferzellen (EPCs) (Ward *et al.* 2007) oder mesenchymaler Stammzellen (MSCs) (Giordano *et al.* 2007) die Herzfunktion nach einer Myokardischämie verbessern kann. Dank ihres Differenzierungspotentials und ihrer möglichen parakrinen Aktivität zeigen MSCs ein interessantes therapeutisches Potential zur kardialen Applikation, besonders bei der Myokardischämie. Zum jetzigen Zeitpunkt ist der Mechanismus ihres positiven Effektes auf das Herzgewebe jedoch unzureichend geklärt. Einerseits verstehen wir nicht komplett die Biologie der MSCs, andererseits sind ihre Interaktionen mit der komplexen *in vivo* Situation schwer zu untersuchen.

1.2 Mesenchymale Stammzellen

1.2.1 Stammzellendefinition

Die Entwicklung und Differenzierung der Stammzellen kann als ein hierarchisches Modell von der primitivsten totipotenten Stammzelle bis hin zur differenzierten gewebespezifischen monopotenten Stammzelle beschrieben werden: Diese Entwicklung beginnt mit der Zygote als totipotente Zelle, die sowohl die Plazenta wie auch den Embryo bilden kann, und verläuft dann über die Stufe der ersten Blastomere. Dass diese Blastomere bis zum 8-Zell-Stadium **totipotente** Zellen sind, wird durch die Tatsache belegt, dass bei ihrer Teilung zwei oder mehr unabhängige Embryos (monozygote Zwillinge) entstehen können (Tarkowski 1959). Als nächste Entwicklungsstufe wird die Morula, sprich der Blastomer im 32-Zell-Stadium, angesehen. Hierbei handelt es sich um

pluripotente Stammzellen (PSCs), da sie in der Lage sind, zu allen drei Keimblättern Zellen beizutragen, aber nicht die Fähigkeit besitzt den Trophoblasten (mit dem Potential der Generierung eines vollständigen Organismus) zu bilden. Während der Gastrulation entstehen die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Endoderm und somit drei Arten **multipotenter** Stammzellen und auf diese folgen als letzte Entwicklungsstufe die **monopotenten** Stammzellen, die spezifisch für ein Organ oder Gewebe sind. So entstehen aus multipotenten mesodermalen Stammzellen unter anderem hämatopoetische Stammzellen und monopotente Zellen des Skelettmuskels und des Herzens, aus multipotenten endodermalen Stammzellen monopotente Zellen der Leber und des Pankreas und aus multipotenten ektodermalen Stammzellen entstehen monopotente Gehirnzellen, periphere Ganglien, Nerven und Hautgewebe.

1.2.2 Geschichte

Schon vor ca. 130 Jahren vermutete der deutsche Pathologe Conheim wohl als Erster die Existenz einer Zellart, die heute unter anderem als mesenchymale Stammzelle bekannt ist. Seine Arbeit brachte die Möglichkeit auf, dass das Knochenmark die Quelle von Fibroblasten sein könne, die für die Wundheilung Kollagenfasern bereit stellen (Prockop 1997).

Die Entdeckung der MSCs wird Alexander Friedenstein zugeschrieben. 1966 transplantierten Friedenstein *et al.* Knochenmarkzellen in ein geschlossenes System, worauf sich Knochengewebe entwickelte, das nicht durch hämatopoetische Zellen kolonisiert wurde. Drei Jahre zuvor zeigten Petrakova *et al.*, dass über mehrere Wochen Knochengewebe gebildet wird, wenn man Teile des Knochenmarks unter die Nierenkapsel von Mäusen transplantiert. Dieses Knochengewebe wurde aber von hämatopoetischen Zellen kolonisiert. Um zu beweisen, dass sich im Knochenmark sowohl Populationen von hämatopoetischen Vorläuferzellen wie auch osteogene Vorläuferzellen befinden, transplantierten Friedenstein *et al.* 1968 Knochenmarkzellen des elterlichen Mäuse Stammes unter die Nierenkapsel von F1 Hybriden (semi-genidentisch) des selben Stammes. Eine folgende Karyotyp-Analyse zeigte, dass das gebildete Knochengewebe genetisch identisch mit dem elterlichen Stamm

war, die hämatopoetischen Zellen, die in das Knochengewebe eingedrungen waren, waren genetisch identisch mit Zellen des Wirtes. Als nächster Schritt wurde das gebildete Knochengewebe zurück in den elterlichen Stamm transplantiert, wo es sich weiter vermehrte. Die hämatopoetischen Zellen dagegen wurden abgestoßen. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass osteogene und hämatopoetische Zellen aus unterschiedlichen Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen. Dies wiederum postulierte die Existenz einer Zellart aus der osteogene Zellen entstehen können, aber keine hämatopoetischen. In einer weiteren Arbeit 1982 fanden Friedenstein *et al.* heraus, dass sich kultivierte Bindegewebszellen in ihrer Größe, Morphologie und in ihrem Proliferationspotential unterscheiden. Auch die Expression der alkalischen Phosphatase und die Kapazität zur osteogenen Differenzierung *in vivo* waren unterschiedlich. Daraufhin gelang es vielen Forschungsgruppen zu zeigen, dass Knochenmark-Bindegewebszellen zu multi-lineären Differenzierung *in vitro* fähig sind (Beresford *et al.* 1992; Umezawa *et al.* 1992; Dorheim *et al.* 1993; Dennis *et al.* 1999), was auch heute noch ein Kriterium zur Charakterisierung der MSCs ist.

1.2.3 Definition und Charakterisierung von mesenchymalen Stammzellen

Das zunehmende Interesse und die vielen verschiedenen Forschungsgruppen die sich in den letzten zwei Jahrzehnten mit dem Thema MSCs beschäftigt haben, führten zu Zweideutigkeiten und Widersprüchen auf diesem Gebiet. Diese rühren unter anderem daher, dass es keine standardisierte Isolationsmethode der MSCs gibt und es so schwer fällt, die experimentellen Resultate zu vergleichen (Phinney und Prockop 2007). Das sieht man auch an den verschiedenen Bezeichnungen, die es für diese nicht- hämatopoetischen Zellen des adulten Knochenmarkes gibt: Mesenchymale Stammzelle (MSC) (Peister *et al.* 2004; Prockop *et al.* 1997), Multipotente adulte Progenitorzelle (MAPC) (Jiang *et al.* 2002) und Mark- isolierte adulte multiliniär- induzierbare Zelle (MIAMI) (D'Ippolito *et al.* 2004). Die Abkürzung MSCs steht außer für „mesenchymale Stammzelle(n)“ auch noch für den Begriff „Marrow Stromal Cells“. MSCs sind definiert als multipotente Zellen die sich in mesenchymale und in nicht-mesenchymale Linien differenzieren können. Sie sind im Knochenmark lokalisiert und interagieren dort mit hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) (Cham-

berlain *et al.* 2007; Baksh *et al.* 2005; Dorshkind *et al.* 1986; Johnson und Dorshkind 1986). In der letztgenannten Arbeit steht die Abkürzung MSCs für den Begriff „Mesenchymale Stammzelle(n)“, da diese nicht ausschließlich aus Knochenmark isoliert werden können sondern auch aus Gehirn, Milz, Leber, Niere, Lunge, Thymus, Muskeln, Pankreas, Fettgewebe, Aorta, Vena cava, kleinen Gefäßen der Nierenglomeruli und Nabelschnurgefäßen (da Silva *et al.* 2006; Kern *et al.* 2006) verschiedenster Spezies (Menschen, Ratten, Mäuse, Katzen, Hunde, Hasen, Schweine, Paviane) (Javazon *et al.* 2004).

2005 wurde von Horwitz *et al.* die Bezeichnung „multipotent mesenchymal stromal cells“ empfohlen. Weiterführend wurden 2006 von Dominici *et al.* Kriterien zur Charakterisierung und Definition dieser Zellen vorgestellt:

- MSCs müssen plastik- adhärent sein

Die Plastik- Adhärenz ist in der Literatur gut beschrieben und auch einzelne Subpopulationen der MSCs die beschrieben wurden, weisen diese Eigenschaft auf (Colter *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2002).

- ≥ 95 % der MSCs müssen CD 105, CD 73 und CD 90 exprimieren

CD 105 ist auch bekannt unter dem Namen Endoglin und ist ein Typ 1 Membran-Glykoprotein, das Teil des TGF β Rezeptorkomplex ist. CD 73 ist eine 5'Nukleotidase und CD 90 (Thy-1) kommt als membrangebundenes Glykoprotein unter anderem auf der Oberfläche von Fibroblasten und Nervenzellen vor.

- ≤ 2 % der MSCs sollen CD 45, CD 34, CD 14 oder CD 11b, CD 79 α oder CD 19 und HLA- DR Oberflächenmoleküle exprimieren

Hier wird die Nicht-Expression hämatopoetischer Antigene als weiteres Kriterium der MSC-Charakterisierung gesehen. CD 45 ist ein Pan-Leukozyten-Marker, CD 34 markiert primitive hämatopoetische Progenitorzellen und Endothelzellen, CD 14 und CD 11b werden auf Monozyten und Makrophagen exprimiert und CD 79 α und CD 19 sind Marker von B- Zellen.

- MSCs müssen *in vitro* in Osteoblasten, Adipozten und Chondroblasten zu differenzieren sein

Diese Fähigkeit zur drei-liniären mesenchymalen Differenzierung als biologische Eigenschaft stellt die beste funktionelle Identifikationsmöglichkeit der MSCs dar.

Die vorgeschlagene Palette an Antigenen schließt nicht aus, dass auch andere Zellen als die MSCs in dieses Raster passen (Sabatini *et al.* 2005), aber diese Einteilung nach dem Oberflächenphenotyp und den funktionellen Kriterien ist die Beste nach heutigem Wissensstand. Diese Kriterien gelten für humane MSCs. Bei MSCs der Ratte ist die Antigen- Expression nicht gut charakterisiert und die Vorgaben für die humanen MSCs kann man nicht komplett auf die der Ratte übertragen (Tropel *et al.* 2004). Bei MSCs der Ratte kann es z. B. zur Expression von CD 34 kommen, die bei humanen MSCs als Ausschlusskriterium benutzt wird (Peister *et al.* 2004).

1.3 Das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs

Verschiedene Forschungsgruppen konnten Ergebnisse bezüglich der kardiomyogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen publizieren. Hier zeigten sich viele unterschiedliche Ansätze. Im Folgenden werden exemplarisch einige Arbeiten aufgezeigt.

1995 gelang Wakitani *et al.* die *in vitro* Differenzierung von adulten Ratten-MSCs in myogene Zellen durch die Behandlung mit 5- Azazytidin und 5- Aza- 2- Deoxyzytidin. 5- Azazytidin verursacht eine Hypomethylierung von Cytosin in der DNA, die bei der Aktivierung phenotyp-spezifischer Gene eine Rolle spielen könnte. Die Kulturen der Zellen, die 24 Stunden mit 5-Azazytidin oder mit 5-Aza-2-Deoxyzytidin behandelt wurden, zeigten die multinukleäre Morphologie von Myotubuli, eine positive Färbung auf α -Myosin- Antikörper und die Fähigkeit sich zu kontrahieren.

2004 beobachteten Xaymardan *et al.* eine induzierte Expression von PDGF in *in vitro* Kulturen von Knochenmarkszellen der Ratte, in denen sich spontan funktionale Kardiomyozyten gebildet hatten. In weiteren Versuchen zeigte sich,

dass die zusätzliche Gabe von PDGF zu einem Medium mit FGF2 und VEGF die Kinetik der myozytären Entwicklung beschleunigt. FGF2 und VEGF alleine bewirkten Aggregate von spontan schlagenden Zellen in Kulturen von Knochenmarkzellen. Diese Zellen konnten außerdem positiv bezüglich Troponin T gefärbt werden und zeigten auf molekularer Ebene eine Expression von α - und β -MHC sowie Connexin 43.

Ein weiterer Faktor der in der frühen Herzentwicklung der Maus eine Rolle spielt und der eine kardiomyogene Differenzierung bewirken kann (Yuasa *et al.* 2005) ist der BMP-Antagonist Noggin. Belegt wurde die kardiomyogene Differenzierung in dieser Studie durch die Expression kardialer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. GATA 4 und MEF2c:

GATA4 wird im adulten Vertebratenherz, im Dottersackendoderm und in Zellen, die in der Herzformung involviert sind, exprimiert (Molkentin *et al.* 1997).

MEF2c wird bei Mäusen in Herzvorläuferzellen vor der Bildung des lineären Herzschlauches exprimiert.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor ist das Sarkomerprotein MHC (Morkin 2000). MHC mRNA wurde mit der mRNA der anderen oben genannten Transkriptionsfaktoren als Marker der kardiomyogenen Differenzierung in der Studie von Kawai *et al.* 2004 herangezogen. In dieser Studie steigerten die Wachstumsfaktoren FGF2 und BMP2 *in vitro* die kardiomyogene Differenzierung embryonaler Stammzellen, wenn sie in den ersten drei Tagen der Kultur appliziert wurden. Diese Zeit könnte mit den Embryo-Tagen (E) 4-6 korrespondieren, in denen sich die drei Keimblätter formen. Embryonen die ein Defizit an BMP2 aufwiesen, starben zwischen E 7 und 10,5 (Zhang und Bradley 1996).

Ein weiteres Signalmolekül das in der Kardiomyogenese eine Rolle spielt, ist BMP4, das, wie das oben erwähnte BMP2, aus der Familie der β -Wachstumsfaktoren stammt. Einer dieser beiden Faktoren ist nötig und auch ausreichend, um die Transkription von Nkx2.5 und GATA4 zu induzieren (Schultheiss *et al.* 1997, Monzen *et al.* 1999). In ihrer Studie an P19 Zellen (murine embryonale Karzinomzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in Kultur in

Zelltypen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Skerjanc 1999)) fanden Jamali *et al.* 2001 heraus, dass Nkx2.5 alleine die Kardiomyogenese in aggregierten P19 Zellen induzieren konnte, nicht aber bei Zellen, die auf Monolayern gezüchtet wurden. Erst wenn man auf die Monolayer-Zellkulturen zusätzlich zu Nkx2.5 noch BMP4 dazu gab, zeigten sich Kardiomyozyten-Formationen. BMP4 scheint also in der Lage zu sein, die Funktion von Nkx2.5 zu aktivieren.

1.4 Kardiale Applikationen von MSCs

Der Myokardinfarkt führt zum Verlust an Kardiomyozyten, gefolgt von einem pathologischen linksventrikulären Remodeling und einer voranschreitenden Herzinsuffizienz. Die Ziele der zellulären Kardiomyoplastie müssen also sein, Kardiomyozyten zu ersetzen, eine Revaskularisierung zu induzieren und das Remodeling zu verhindern. Dies wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen untersucht:

2005 transplantierten Dai *et al.* allogene MSCs in infarziertes Myokardgewebe. Diese Zellen überlebten 6 Monate. Nach drei Monaten konnte in einer Untersuchung mit dem Konfokalmikroskop gezeigt werden, dass muskelspezifische Marker exprimiert wurden. Schon ab der vierten Woche nach der Transplantation verbesserte sich die linksventrikuläre Funktion, nahm aber ab dem dritten Monat wieder ab. Für die Funktionsverbesserung konnten die muskelspezifischen Marker also nicht ausschlaggebend sein, da sie zu dieser Zeit noch nicht exprimiert wurden. Auch zeigte sich in dieser Studie keine Zunahme der Dicke der Infarkt Narbe. Die Ursache für die Verbesserung der linksventrikulären Funktion konnte in dieser Studie, wie auch in Studien mit transplantierten Knochenmarkzellen (Tomita *et al.* 1999) oder hämatopoetischen Stammzellen (Orlic *et al.* 2001; Agbulut *et al.* 2004; Balsam *et al.* 2004) nicht abschließend geklärt werden. Insgesamt konnte aber gezeigt werden, dass man allogene MSCs in Infarktgewebe transplantieren kann und sie nicht abgestoßen werden. Auch intravenös applizierte MSCs aus Knochenmark von Ratten kolonisieren im Zielorgan, dem infarzierten Myokard, wenn auch nur zu einem kleinen Anteil (Strauer und Komowski 2003). Jiang *et al.* fanden 2005 heraus, dass nach dieser Applikationsform keine MSCs im gesunden Rattenherz zu finden sind. Dies

fürte zu der Vermutung, dass die MSCs gezielt vom verwundeten Gewebe „angelockt“ werden könnten. Dies wiederum könnte darauf beruhen, dass die inflammatorische Reaktion nach einem Myokardinfarkt eine lokale Akkumulation von Mastzellen hervorruft und so die Migration von MSCs initiiert (Frangogiannis *et al.* 2002). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass nach einem Myokardinfarkt Zytokine wie FGF oder Hepatozyten growth factor freigesetzt werden (Vandervelde *et al.* 2005), die auch zur Stammzellvermittelten Reparatur des Myokards beitragen könnten. In einer Studie von Tang *et al.* 2006, in der MSCs intramyokardial in Ratten nach einem Myokardinfarkt appliziert wurden, erhöhte sich bei den so behandelten Tieren das VEGF-Expressionslevel und die Kapillardichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, in der keine MSCs appliziert wurden. Außerdem zeigten sich eine kleinere Infarktausdehnung und eine dickere linksventrikuläre Wand. Die mit MSCs behandelte Gruppe konnte also das Remodeling inhibieren, die Elastizität bewahren, die Herzfunktion verbessern und die Expression extrazellulärer Matrix-Gene wie Kollagen reduzieren (Xu *et al.* 2005). In einer Studie von Hou *et al.* 2007 dagegen zeigte sich nach der intramyokardialen Applikation von humanen, aus Sternum-Knochenmark von Patienten mit koronarer Herzkrankheit gewonnenen MSCs in Ratten mit Myokardinfarkt eine Wandverdickung durch eine gesteigerte Synthese von Kollagen I und II, aber auch eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion.

Auch wenn die direkte Transplantation von Stammzellen in das Myokard die therapeutische Periode zu verkürzen scheint, bleibt dennoch unklar, ob die transplantierten Zellen sich in die gewünschten Kardiomyozyten/ endothelialen Zellen differenzieren oder in andere Zelltypen wie Osteoblasten, Chondroblasten oder Adipozyten. Ein Ansatz, eine ungewollte, nicht-kardiomyogene Differenzierung der MSCs zu verhindern, wäre die MSCs zunächst *in vitro* zu differenzieren und dann eine ausreichende Menge dieser Zellen in das Myokard zu transplantieren. Hattan *et al.* behandelten 2005 MSCs mit 5- Azacytidin bis einige dieser Zellen nach drei Wochen ein spindelförmiges Aussehen zeigten und sich spontan kontrahierten. Diese Zellen wurden dann in ein gesundes Mäuseherz transplantiert und überlebten dort mehr als drei Mona-

te. In der gesamten Zeit traten keine Arrhythmien bei den Mäusen auf. Tomita *et al.* konnten schon 1999 zeigen, dass sich die Funktion des infarzierten Myokards nach Applikation von mit 5-Azacytidin behandelten Knochenmarkzellen verbesserte.

1.5 Die Gene kardiales α Actin und kardiales Troponin I

Troponin I bildet zusammen mit den weiteren Untereinheiten Troponin C und T den regulatorischen Troponin-Komplex der quergestreiften Muskulatur für die kalzium-abhängige Interaktion zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten. Im Gegensatz zum Troponin C unterscheiden sich die kardialen Isoformen der Troponine I und T in ihrer Aminosäuresequenz von denen der Skelettmuskelformen und lassen sich daher selektiv detektieren. Dies macht man sich auch in der Diagnostik des Myokardinfarktes zu Nutze, indem man das Troponin I im Blut bestimmt. Ist dieses erhöht, geht man von einem Untergang von Kardiomyozyten aus, was z. B. durch einen Infarkt bedingt sein kann.

In der Muskelzelle bildet Myosin in Abwesenheit von ATP eine Bindung mit Actin aus. ATP führt nun zur Lösung dieser Bindung und die Spaltung von ATP zu ADP und anorganischem Phosphat durch die ATPase-Aktivität des Myosinkopfes führt daraufhin zu einer Konformationsänderung mit erneuter Bindung des Myosinkopfes an eine benachbarte Actinuntereinheit. Die Freisetzung des anorganischen Phosphats verursacht eine Bewegung im Myosinkopf, diese wird auf das Actinfilament übertragen und führt so zu einer Verschiebung des Actin gegenüber dem Myosin. Am Ende wird ADP freigesetzt, Myosin ist an Actin gebunden und zu erneuter ATP-Aufnahme bereit (Löffler, Basiswissen Biochemie). Auch hier existiert eine kardiomyogenspezifische Form des Aktins, das kardiale α -Aktin. Mutationen in diesem Gen können z. B. die autosomal-dominant vererbte Form der dilatativen Kardiomyopathie verursachen (Seidman *et al.* 2001).

1.6 Ziele und Fragestellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist, den Effekt der unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Differenzierungsmedien auf das kardiomyogene Differenzierungspotential an den gleichen MSC Populationen zu testen, um diesen unter den

gleichen Bedingungen vergleichen zu können. Aufgrund der zu erwartenden Varianz der Differenzierungspotenz wird immer Bezug auf die gleiche Population und die gleiche Passage der undifferenzierten MSCs genommen. Als Vergleichsparameter dient in dieser Arbeit die Expression der mRNA der kardiomyogenspezifischen Gene Troponin I und kardiales Aktin.

Des Weiteren wird in dieser Arbeit auf die Frage eingegangen, wie weit das endogene kardiale Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen ausgeprägt ist, das heißt: exprimieren die MSCs auch ohne Behandlung mit Induktoren kardiomyogene mRNA? Dieses Potential wird mit dem Differenzierungspotential unter den verschiedenen Differenzierungsmedien verglichen, um zu evaluieren, ob die aufwändige und kostenspielige Methode der Differenzierungsmedien einen Vorteil in Hinsicht auf die kardiomyogene Differenzierung bewirken könnte.

Am Beispiel von zwei Differenzierungsmedien soll zudem noch untersucht werden, ob sich das kardiomyogene Differenzierungspotential unklonierter MSCs von dem klonierter MSCs unterscheidet.

Die Methodik, die in dieser Arbeit verwendet werden soll um die Expressionsunterschiede darzustellen, ist die Real time PCR mittels LightCycler-Technologie. Hier ist das Ziel dieser Arbeit die Konzeption und Etablierung einer RT-PCR, die exakt die Gene kardiales Aktin und Troponin I der Ratte amplifiziert. Dazu müssen die Primer für diese Gene gesucht und hergestellt werden und der genaue PCR-Ablauf, u.a. bezüglich des Temperatur-Zeit-Profiles auf diese Primer abgestimmt werden.

2 Material und Methodik

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Adapter UVette®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Brutschränke HERAcell	Heraeus, Osterode, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80°C UF85-300s	Colora Messtechnik, Lorch, Deutschland
Gelkammer Power Pac 300	Biorad, Hemel Hempstead, UK
Inkubations- Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlschrank +4°C	Kirsch, Bosch, Gerlingen, Deutschland
Light Cycler®	Roche, Basel, Schweiz
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Jena, Deutschland
Pipetus akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
REAX Top Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultrospect® 2000	Amersham pharmacia biotech
Waage HF-4000	A&D, Ahrensburg, Deutschland
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Ziegra Eis Machine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Cell Scraper	Corning Inc., Schiphol- Rijk, Niederlande
--------------	---

Cryo.s. Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Einweg Pinzetten	Megro GmbH+Co.KG, Wesel, Deutschland
Falcon® BlueMax Lonical Tube	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Multiwell-Platten	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
LightCycler® Capillaries	Roche, Basel, Schweiz
PCR-Tubes	Roche, Basel, Schweiz
Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safe- Lock Tubes 1,5/ 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Safeseals Tips Premium	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Stripette 5 /10/ 25/ 50ml	Corning Inc., Schiphol- Rijk, Niederlande
UVette®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflasche	Corning Inc., Schiphol- Rijk, Niederlande
2.1.3 Chemikalien	
AccuMax	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Accutase™	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Alcianblau 8GX	Serva, Heidelberg, Deutschland

Alkalische Phosphatase Kit	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Alpha- MEM	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
5-Azacytidin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
5-Aza-2-Deoxycytidin	ICN Biomedicals,
Beta-Glycerolphosphat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BMP2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
BMP4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Molekular Weight Marker XIV	Roche, Basel, Schweiz
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
FGF2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Hematoxylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Indomethacine	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Insulin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Isobutylmethylxanthine	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Isopropanol 60%	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Isopropanol 99%	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Light Cycler® Fast Start DNA	
Master SYBR Green I	Roche, Basel, Schweiz
Mesench. Funkt. Diff. Kit	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Noggin	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Oligo-dT Primer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ölrotpulver	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PBS	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
PDGF	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Penicillin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Streptomycin	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien
TRIS Puffer	Universitätsapotheke Tübingen

VEGF

R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.2 Methodik

2.2.1 Tiere

Vier gesunde, männliche Sprague-Dawley-Ratten (Alter: 12 – 20 Wochen; Körpergewicht : 420 – 530 g) wurden von der Arbeitsgruppe PD Dr. B. Brehm (Universitätsklinikum Tübingen, Klinik für Kardiologie) im Rahmen eines Tierversuchsvorhabens (Genehmigungs-Nr. M1/03) in tiefer Narkose nach intraperitonealer Injektion mit Ketamin (100 mg/ kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/ kg Körpergewicht) getötet und anschließend freundlicherweise zur Knochenexplantation zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Isolation des Knochenmarks

Jeweils die Ober- und Unterschenkelknochen der Tiere wurden ohne Eröffnung des Markraums explantiert sowie von Binde- und Muskelgewebe gereinigt. Unter sterilen Bedingungen wurden nun die Epiphysen der gereinigten Ober- und Unterschenkelknochen entfernt und das komplette Knochenmark mit PBS heraus gewaschen und in PBS gesammelt.

2.2.3 MSC Isolation, Kultivierung und Klonierung

Zunächst wurden die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark mittels der Dichte-Gradienten Technik isoliert: 10 ml Knochenmark wurde in 10 ml PBS resuspendiert, auf 20 ml Lymphoflot[®] gegeben und 20 Minuten bei 1000 g ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleäre Zellfraktion wurde optisch identifiziert (milchig-weißer Ring) und abpipettiert. Nach 2 Waschschritten mit PBS wurden die mononukleären Zellen in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (5% CO₂) in normalem Nährmedium inkubiert. Das normale Nährmedium enthielt Desoxyribonukleotide, Ribonukleotide, Ultra Glutamin 1 (α-MEM), 100 I. U./ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin und 10% FCS. Nach 24 Stunden wurden die nicht adhärenen Zellen verworfen und die adhärenen Zellen weiter kultiviert (Passage 0). Das Nährmedium wurde alle drei Tage gewechselt. Wenn sich die Zellen

subkonfluent (70% des Zellkulturflaschenbodens bewachsen) darstellten, wurden sie mit Accutase™ abgelöst, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und auf zwei neue Zellkulturflaschen in gleicher Zahl verteilt (Passage 1 und höher). Um die Zellen zu zählen wurden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl Accumax™ gemischt. Davon wurden wieder 100 µl abgezogen und in Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gezählt und nach folgender Formel die Zellzahl pro ml berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{Zellzahl}/10 \times 10^5$$

Um die Zellen zu ernten, wurden sie ebenfalls mit 10 ml Accutase™ abgelöst, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und standen dann für weitere Untersuchungen bereit. Um eine möglichst homogene MSC-Population zu gewinnen, wurden die Zellen aus dem Knochenmark der Ratte kloniert (Einzel-Zell-Klonierung). Hierzu wurden sie in so viel Nährmedium suspendiert, dass eine Lösung mit 1 Zelle/ 200 µl entstand. Daraufhin wurden jeweils 200 µl dieser Lösung in jedes Well einer 96-Well-Platte pipettiert und kultiviert (Passage 1). Nach vier Wochen konnten die einzelnen Klone in 6-Well-Platten (Passage 2) und später in 75 cm² Zellkulturflaschen (Passage 3 und höher) überführt werden. Die Zellen, die aus dem Knochenmark der GFP- Ratte gewonnen wurden, wurden nicht kloniert, das weitere Vorgehen der Zellkultur gestaltete sich identisch.

2.2.4 Adipogene und osteogene *in vitro* Differenzierung

Mit der adipogenen und osteogenen *in vitro* Differenzierung wurde das Differenzierungspotential der isolierten Zellen in zwei mesenchymale Linien überprüft. Die Zellen wurden über 21 Tage mit bestimmten Differenzierungsmedien behandelt und danach spezifisch angefärbt. Bei adipogen differenzierten Zellen wurden mittels Ölrot Lipide angefärbt, bei osteogen differenzierten Zellen wurde die alkalische Phosphatase nachgewiesen. Als Kontrollproben wurden jeweils nicht differenzierte MSCs angefärbt.

Das adipogene Medium (nach Ji *et al.* 2004) setzte sich zusammen aus DMEM + 20% FCS mit 1,0 µM Dexamethason, 0,5 mM Isobutylmethylxanthin, 0,2 mM

Indomethacin und 0,01 mg/ ml Insulin. Für die Färbung wurde das Medium entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Dann wurden 2 ml 10%-iges Formalin hinzu gegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit sterilem Wasser abgewaschen. Darauf folgte eine Inkubationszeit von zwei Minuten mit 2 ml 60%-igem Isopropanol. Nach dieser Zeit wurde das Isopropanol entfernt und 2 ml Ölrot Gebrauchslösung (3 Teile Ölrot Stammlösung [300 mg Ölrotpulver + 100 ml 99% Isopropanol] + 2 Teile destilliertes Wasser) für fünf Minuten auf den Zellen belassen. Anschließend konnten die Zellen unter fließendem Wasser gespült und mit Hematoxylin gegengefärbt werden.

Das osteogene Medium (nach Ji *et al.* 2004) enthielt normales Nährmedium mit 10⁻⁸M Dexamethason, 0,2 mM Ascorbinsäure und 10 mM β - Glycerolphosphat. Für die Färbung der alkalischen Phosphatase wurde ein Kit der Firma Cambrex Bio Science benützt: Nachdem das Nährmedium entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen wurden, wurde eine Minute 2 ml Citrat- Fixierungslösung (12,5 ml Citratlösung + 32,5 ml Aceton + 4 ml 37% Formaldehyd) auf die Zellen gegeben und diese danach für 30 Minuten mit 2 ml Alkalifarbstoffgemisch (0,5 ml Natriumnitrit + 0,5 ml FRV- Alkalilösung + 22,5 ml destilliertes Wasser + 0,5 ml Naphtol AS-BI Alkalilösung) gefärbt. Anschließend konnten die Zellen unter fließendem Wasser gespült und mit Hematoxylin gegengefärbt werden.

MSCs sind, neben der *in vitro* Differenzierungspotenz, durch diverse Oberflächenmarker definiert (Dominici *et al.* 2006). Die Evaluation des Oberflächenprofils mittels Durchflusszytometrie erfolgte in einer gesonderten Arbeit.

2.2.5 Kardiomyogene Differenzierungsmedien

Als kardiomyogene Differenzierungsmedien wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Medien eingesetzt, die jeweils einen oder mehrere entscheidende Faktoren für die Kardiogenese/ kardiomyogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen beinhalten, die in der Einleitung dieser Arbeit aufgezeigt wurden.

Bei den unklonierten Zellen wurden neben dem normalen Nährmedium alle im folgenden aufgezählten Differenzierungsmedien benutzt, bei den klonierten Zellen wurden neben dem normalen Nährmedium nur die Medien 5-Aza-2-Deoxyzytidin und VEGF verwendet.

2.2.5.1 5- Azazytidin (Wakitani *et al.* 1995)

Die besten Ergebnisse der Differenzierung von adulten Ratten-MSCs in myogene Zellen erzielten Wakitani *et al.*, wenn die Zellen 24 Stunden mit einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/ L}$ 5- Azazytidin und 10 % FCS behandelt wurden. Nach sieben Tagen zeigten sich lange multinukleäre Zellen, deren Morphologie derer von Ratten-Muskelzellen in Kultur glich. Die Zellen wiesen außerdem spontane Kontraktionen und Kontraktionen nach Acetylcholin-Gabe auf.

Protokoll:

- Zu 490 ml Nährmedium (475 ml α -MEM + 10 ml FCS + 5 ml Penicillin/ Streptomycin) werden 10 ml 5- Azazytidin hinzugegeben
- das Differenzierungsmedium verbleibt 24 Stunden auf den Zellen (kein Medienwechsel)
- Danach wird das Differenzierungsmedium abgewaschen und die Zellen werden mit normalem Nährmedium weiter kultiviert

2.2.5.2 5-Aza-2-Deoxyzytidin (Wakitani *et al.* 1995)

Mit 5-Aza-2-Deoxyzytidin erzielten Wakitani *et al.* die gleichen oder sogar bessere Ergebnisse wie mit 5-Azazytidin, aber bei einer geringeren Konzentration (nur 0,3 $\mu\text{mol/ L}$).

Protokoll:

- Zu 500 ml Nährmedium (411 ml α -MEM + 50 ml FCS + 25 ml Pferdeserum + 5 ml Penicillin/ Streptomycin + 9,1 ml Hydrocortison) werden 342,3 μ l 5-Aza-2-Deoxycytidin gegeben
- das Differenzierungsmedium verbleibt 24 Stunden auf den Zellen (kein Medienwechsel)
- Danach wird das Differenzierungsmedium abgewaschen und die Zellen werden mit normalem Nährmedium weiter kultiviert

2.2.5.3 VEGF + FGF2 + PDGF (Xaymardan *et al.* 2004)

In den Studien von Xaymardan *et al.* mit BMCs von der Maus zeigten sich nach zwei Wochen Aggregate von spontan schlagenden Zellen in den Kulturen, deren Medium mit VEGF und FGF 2 angereichert war. Diese Zellen konnten positiv bezüglich Troponin T gefärbt werden und wiesen in der RT-PCR eine Expression von α und β Myosin-heavy-chain und Connexin 43 auf. Die Zugaben von PDGF-AB zu dem Medium verkürzte die Zeit bis zur α MHC Expression um die Hälfte. Als optimale Konzentrationen stellten sich 5 ng/ml FGF 2, 10 ng/ml VEGF und 10 ng/ml PDGF- AB heraus.

Protokoll:

- Zu 500 ml Nährmedium (IMDM + 10% FCS + 5 ml Penicillin/ Streptomycin) werden 5 μ g VEGF, 2,5 μ g FGF2 und 5 μ g PDGF gegeben
- Das Differenzierungsmedium verbleibt permanent auf den Zellen (Medienwechsel 2 x / Woche)

2.2.5.4 BMP4 (Jamali *et al.* 2001)

Der Transkriptionsfaktor Nkx2.5 reguliert die Transkription muskelspezifischer Gene während der Kardiomyogenese. In der Studie von Jamali *et al.* wurde gezeigt, dass BMP4 in einer Kultur von P19 Zellen nicht nur die Transkription von

Nkx2.5 und GATA4 induzieren kann, sondern auch die Nkx2.5 Funktion aktivieren kann.

Protokoll:

- Zu 100 ml normalem Nährmedium (α -MEM + 10% FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin) werden 10 μ g BMP4 gegeben
- Das Differenzierungsmedium verbleibt für 6 Tage auf den Zellen
- Danach wird das Differenzierungsmedium abgewaschen und die Zellen werden mit normalem Nährmedium weiter kultiviert

2.2.5.5 Noggin (Yuasa *et al.* 2005)

Yuasa *et al.* zeigten in ihrer Studie an ES der Maus, dass eine vorübergehende Expression des BMP-Antagonisten Noggin in der frühen Phase der Herzentwicklung eines Mäuseembryos eine kardiomyogene Differenzierung bewirkt. Als optimale Konzentration für eine kardiomyogene Differenzierung wurden 150 ng/ml Noggin angegeben.

Protokoll:

- Zu 500 ml normalem Nährmedium (α -MEM + 10% FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin) werden 75 μ g Noggin gegeben
- Das Differenzierungsmedium verbleibt für 3 Tage auf den Zellen (kein Medienwechsel)
- Danach wird das Differenzierungsmedium abgewaschen und die Zellen werden mit normalem Nährmedium weiter kultiviert

2.2.5.6 FGF2+BMP2 (Kawai *et al.* 2004)

Die Wachstumsfaktoren FGF2 und BMP2 steigerten *in vitro* die kardiomyogene Differenzierung von ES der Maus, wenn sie in der optimalen Konzentration von 1 ng/ml FGF2 und 0,2 ng/ml BMP2 für drei Tage eingesetzt wurden.

Protokoll:

- Zu 500 ml normalem Nährmedium (α -MEM + 10% FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin) werden 0,5 μ g FGF2 und 0,1 μ g BMP2 gegeben
- Das Differenzierungsmedium verbleibt für 3 Tage auf den Zellen (kein Medienwechsel)
- Danach wird das Differenzierungsmedium abgewaschen und die Zellen werden mit normalem Nährmedium weiter kultiviert

2.2.6 RNA Isolierung und Quantifizierung der RNA

Bei der RNA-Isolierung wurden die Zellen zuerst durch eine Shredder-Säule zerstört, so dass die RNA frei wurde. Diese wurde anschließend mittels Waschschritten auf einer Mini Säule isoliert. Dabei bewirkt die Zugabe von Ethanol, dass die RNA an die Mini Säule bindet. Die Zugabe von RNase-freiem Wasser führt dazu, dass sich die RNA am Ende der Isolationsprozedur wieder von der Säule abwaschen lässt. Zusätzlich wurde noch ein Verdau mittels DNase durchgeführt, um eventuelle minimale DNA-Kontaminationen zu entfernen. Des Weiteren muss beim Arbeiten mit RNA bedacht werden, dass diese nicht so stabil ist wie DNA. So muss genau darauf geachtet werden, dass ein RNase-freier Arbeitsplatz vorliegt und dass auch alle verwendeten Materialien RNase-frei sind, da dieses Enzym sonst die zu isolierende RNA zerstört.

Für die RNA-Isolierung wurde das RNeasy[®] Mini Kit von Qiagen benutzt. Dieses enthält: RLT- Puffer, Puffer RW1, RPE- Puffer und RNase-freies Wasser. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Puffer wird vom Hersteller (Qiagen) nicht angegeben. RLT Puffer ist aber ein stark denaturierender Puffer, der Guanidinisothiocyanat enthält und RNAsen sofort inaktiviert. Für den DNA Verdau werden noch DNase Stammlösung und RDD Puffer benötigt. Auch hier war die genaue Zusammensetzung nicht angegeben.

Protokoll:

- Zellen in RLT Puffer + DTT lysieren und ggf. bei -70°C einfrieren
- eingefrorenes Lysat für 15-20 Minuten im Wasserbad bei 37°C auftauen
- Lysat in Shredder-Säule pipettieren und 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren
- Säule verwerfen, Unterstand mit 1 Volumen 70% -igen Ethanol mischen
- daraus bis zu 700 µl auf Mini-Säule pipettieren, Rest aufbewahren
- Säule 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen, aufbewahrten Rest auf Säule geben
- erneut 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugieren
- Unterstand verwerfen, neues Auffangröhrchen benutzen
- 350 µl Puffer PW1 auf Säule geben, 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugieren
- Unterstand verwerfen
- 10 µl DNase Stocksolution + 70 µl RDD- Puffer in extra tube mischen
- 80 µl dieser Lösung direkt auf die Säulenmembran pipettieren, 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
- danach 350 µl RW1 Puffer auf die Säule geben und 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugieren
- neues Auffangröhrchen benutzen
- 500 µl RPE-Puffer hinzugeben und 15 Sekunden bei 11000 rpm zentrifugieren
- Unterstand verwerfen

- erneut 500 µl RPE-Puffer hinzugeben und diesmal 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren
- Säule auf neues Auffangröhrchen setzten und durch 2-minütiges Zentrifugieren bei 14000 rpm Silicamembran trocknen
- Mini-Säule auf Eppendorf-Röhrchen setzten und 50 µl RNase freies Wasser direkt auf Membran pipettieren
- 2 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen, dann 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugieren
- Unterstand erneut auf Membran geben, 2 Minuten inkubieren und 2 Minuten bei 14000 rpm zentrifugieren

Nach der Isolierung wurde die RNA photometrisch in TRIS Puffer vermessen und die Gesamt-RNA in der Probe bestimmt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Reinheit der Probe gewährleistet war. Daraus konnte wie folgt berechnet werden, wie viel µl der Probe in der reversen Transkription eingesetzt werden musste, um jeweils einen Ausgangswert von 1 µg RNA zu erhalten:

$$\mu\text{g}/\mu\text{l RNA} = \frac{44(\text{TRIS}) \times 17,5(\text{Verdünnungsfaktor}) \times \text{Absorption}}{1000}$$

2.2.7 Synthese und Aufreinigung der cDNA

Um aus der isolierten RNA cDNA herzustellen, wurde das Omniscript® RT Kit benutzt. In diesem Kit ist das Enzym Reverse Transkriptase enthalten, das einzelsträngige RNA in die dazu komplementäre doppelsträngige DNA umschreiben kann. Das Kit enthält des Weiteren einen dNTP Mix, RNase-freies Wasser und RT-Puffer. Zur Initiation musste ein Oligo dT Primer zugeben werden, der komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3`-Ende der mRNA ist, so dass nur diese RNA in DNA umgeschrieben wird. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C war die reverse Transkription beendet.

Protokoll:

RT-Puffer	2 μ l
dNTP Mix	2 μ l
Oligo-dT Primer	1 μ l
Omniskript Reverse Transkriptase	1 μ l
Rnase freies Wasser	variabel
RNA	variabel

Die Menge an Rnase freiem Wasser und RNA wurde so gewählt, dass nach obiger Berechnung 1 μ g RNA eingesetzt wurde und diese beiden Bestandteile eine Menge von 14 μ l ergaben, so dass insgesamt jeder Reaktionsansatz 20 μ l entsprach. Die einstündige Inkubation bei 37°C erfolgte in einem Thermomixer.

Um die so hergestellte cDNA aufzureinigen, wurde das PCR Purification Kit von Qiagen benutzt. Durch dieses Kit können Fragmente zwischen 100 bp und 10 kb von Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymerasen gereinigt werden. Es enthält die Puffer PB und PE, deren genaue Zusammensetzung von Qiagen nicht angegeben wird.

Protokoll:

- Puffer PE mit Ethanol (96-100%) auffüllen
- 5 Einheiten Puffer PB zu einer Einheit der Probe hinzugeben und mischen
- Dieses nun auf eine QIAquick-Säule geben und 30-60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und Säule 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren

- Um die DNA zu eluieren, 50 µl Wasser auf die QIAquick-Membran geben und für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugieren

Die Effizienz der Eluierung hängt vom pH-Wert ab. Die beste Eluierung erhält man bei einem pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5.

2.2.8 Real time PCR mittels LightCycler

Die real time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, in der in etwa 30 bis 40 Zyklen die DNA *in vitro* vervielfältigt werden kann. Diese Zyklen sind nochmals unterteilt in drei Schritte: Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei der die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt wird und somit in zwei Einzelstränge gespalten wird, da die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen solch hohen Temperaturen nicht stand halten können. Der zweite Schritt besteht aus der Primerhybridisierung, wobei hier die Temperatur, bei welcher sich die Primer an die nun einzelsträngige DNA anlagern, von den jeweiligen Primern abhängt. Meistens liegt sie 2-3°C unteren deren Schmelzpunkt. Ist die Temperatur zu hoch, lagern sich die Primer nicht an, ist sie zu niedrig, können sie sich an falsche Stellen anlagern. Im dritten und letzten Schritt beginnt die DNA-Polymerase am 3'-Ende des Primers mit der Elongation. Das Temperaturoptimum dieses Enzymes liegt bei 72°C. So hat sich die DNA-Menge verdoppelt. Da hierdurch mehr Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus zur Verfügung steht, findet in der PCR ein exponentieller Anstieg der Menge der Ziel-DNA statt.

Die real time PCR bietet zusätzlich noch die Möglichkeit der DNA-Quantifizierung, da während jedem Zyklus eine Fluoreszenzmessung stattfindet. Hierzu wurde der interkalierende Farbstoff SYBR Green I eingesetzt, dessen Fluoreszenz-Emission ansteigt, indem er an doppelsträngige DNA bindet. So korreliert die Zunahme der Ziel-DNA mit der Zunahme der Fluoreszenz. Als

Maß für die Quantifizierung der Ausgangsmenge der Ziel-DNA werden die CP (Crossing Point) (Abb. 1) Werte benutzt.

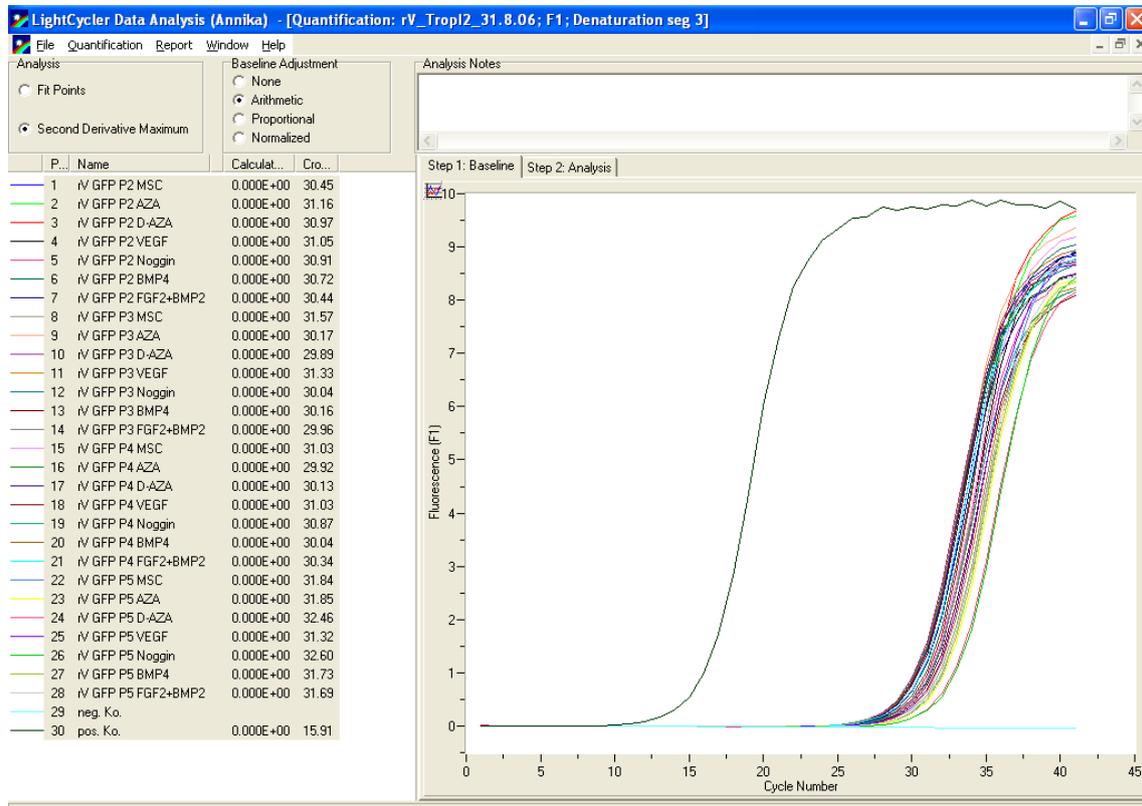


Abb. 1: Darstellung der CPs mittels LightCycler Software

Diese geben die Anzahl der PCR-Zyklen wieder, die für ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau nötig sind. An diesem Punkt befindet sich also in jeder Probe die gleiche Menge neu amplifizierter DNA und wenn man davon ausgeht, dass sich bei jedem Zyklus der PCR die Produktmenge verdoppelt, entspricht ein um eine Einheit höherer CP der halben Menge an ursprünglich eingesetzter cDNA. Durch die Schmelzkurvenanalyse (Abb. 2) am Ende der real time PCR kann die Fragmentlänge der vervielfältigten DNA bestimmt werden. Hierzu wird in kleinen Schritten die Temperatur immer weiter erhöht, bis die DNA in ihre Einzelstränge zerfällt. Da hierbei auch der Farbstoff (SYBR Green I) freigesetzt wird, fällt die Fluoreszenz schlagartig ab. So kann zwischen dem spezifischen Produkt und eventuell gebildeten Primer-Dimeren unterschieden werden, da

diese instabiler sind und der Doppelstrang sich bei einer niedrigeren Temperatur während der Schmelzkurvenanalyse trennt.

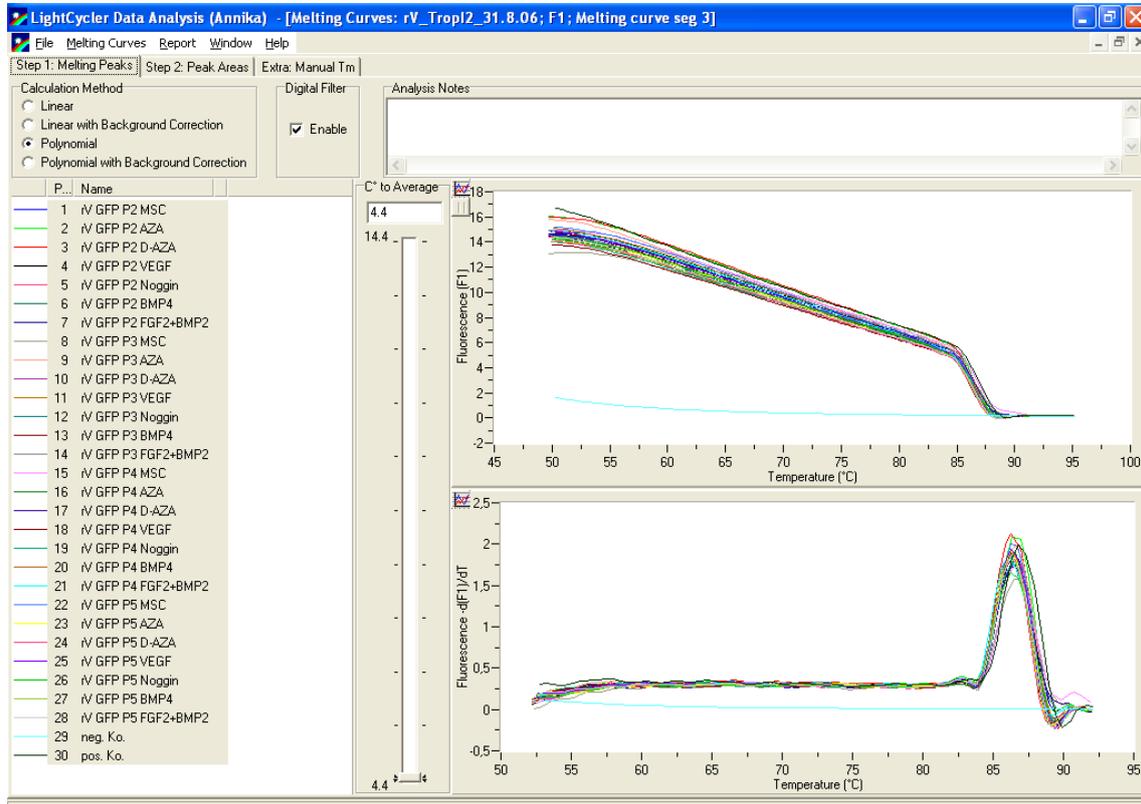


Abb. 2: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse mittels LightCycler Software

Nach intensiven Vorversuchen wurden für die verschiedenen Primer (siehe unten) folgende optimale Temperatur-Zeit-Profile etabliert:

Prä-Inkubation:

Bei Primer GAPDH

95°C für 10 Minuten

Bei Primer Troponin I und α -kardiales Aktin 95°C für 9 Minuten

Amplifizierung in 41 Zyklen:

Denaturierung	95°C für 10 Sekunden
Primerhybridisierung	59°C für 5 Sekunden
Elongation	72°C für 15 Sekunden
Schmelzkurvenanalyse	50°C-99°C bei 0,1°C/sec
Abkühlung	40°C für 30 Sekunden

Für die real time PCR mittels LightCycler wurde das Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit von Roche eingesetzt. Durch verschiedene Vorversuche wurde folgendes optimales Pipettierschema etabliert:

Komponente	Volumen	finale Konzentration
Wasser	11,6 µl	
MgCl ₂	2,4 µl	4 mM
Primer	2,0 µl	jeweils 0,5 µM
Enzym Mastermix	2,0 µl	
cDNA	2,0 µl	

Es wurden für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt, um die Genauigkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Außerdem wurde in jedem PCR-Lauf eine Positiv-Kontrolle mit geprüft. Diese Positiv-Kontrolle bestand aus kommerziell erworbener Rattenherz-RNA der

Firma Stratagene. Die Synthese und Aufreinigung der cDNA gestaltete sich identisch wie bei den anderen Proben.

Um die Effizienz der PCR zu bestimmen, verdünnten wir eine cDNA Probe der Positiv-Kontrolle in 2er Potenzen von 1:2 bis 1: 200000 mit H₂O und erstellten damit jeweils eine Regressionsgerade für jeden Primer (Rasmussen 2001). Hierbei wird die eingesetzte Menge an cDNA in einer logarithmischen Funktion gegen die Zyklenzahl dem CP dargestellt (Abb. 3).

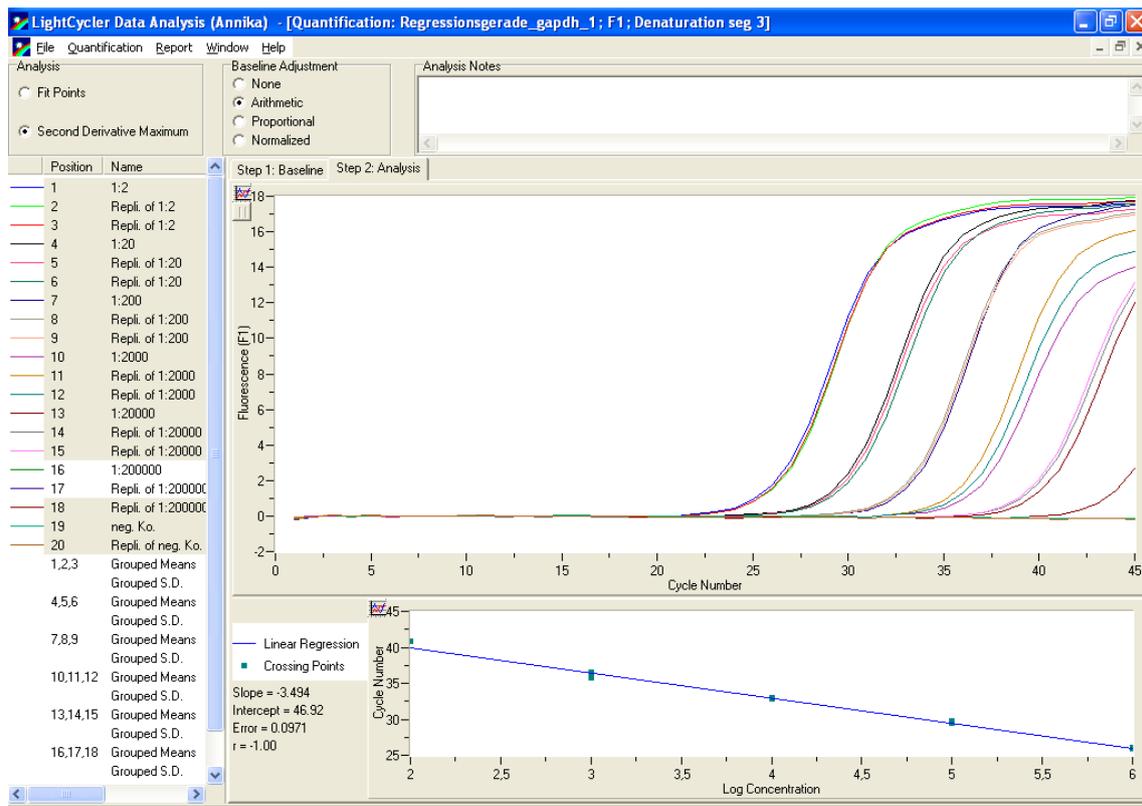


Abb. 3: Darstellung der Regressionsgeraden mittels LightCycler Software

Aus der Steigung dieser Geraden kann man die Effizienz E folgendermaßen berechnen:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

2.2.9 Primer

Die mRNA-codierenden Sequenzen wurden über „PubMed“(U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health, U.S.A.) online recher-

chert (rat GAPDH: NM 17008; rat Troponin I: NM 017144; Rat Alpha-cardiac actin: XM 215801). Die entsprechenden Primersequenzen wurden anschließend online über „Primer3“ (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, U.S.A.) unter Verwendung einer „mispriming library“ ausgesucht. Anschließend wurden die Primer bei der Firma Metabion (D-82152 Martinsried) synthetisiert. Die Primer wurden HPLC-aufgereinigt und lyophilisiert ausgeliefert.

Die Primer wiesen folgende Spezifikationen auf:

GAPDH:

5`-GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA-3` Tm: 55,3°C

5`-TGT GAG GGA GAT GCT CAG TG-3` Tm: 59,4°C

Die Länge des Gens GAPDH beträgt 223 bp.

Alpha-cardiac-actin:

5`-CAC GGC ATT ATC ACC AAC TG-3` Tm: 57,3°C

5`-AAC AAT GCC TGT GGT TCT CC-3` Tm: 57,3°C

Das Gen, das durch diese Primer kodiert wird, hat eine Länge von 240 bp.

Troponin I:

5`-ACG TGG AAG CAA AAG TCA CC-3` Tm: 59,4°C

5`-CCT CCT TCT TCA CCT GCT TG-3` Tm: 57,3°C

Die Länge von Troponin I beträgt 201 bp.

2.2.10 Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{CP}$ Methode

Bei der relativen Quantifizierung wird nicht die absolute Startmenge an DNA bestimmt, sondern es wird die Expression des Zielgens auf ein house keeping Gen bezogen. Als house keeping Gen wurde GAPDH gewählt. Somit wurden z. B. unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen oder Fehler bei der reversen Transkription ausgeglichen, da sie gleichermaßen beide Proben betreffen und

sich in den weiteren Berechnungen aufheben (Normalisierung der Expressions-
ergebnisse)(Rasmussen 2001). In einem weiteren Schritt wird die relative Ex-
pression des Zielgens der behandelten Proben auf eine Kontrolle von nicht be-
handelten Proben bezogen. Hier also die MSCs, die mit kardiomyogenen Diffe-
renzierungsmedien behandelt wurden und als Kontrolle MSCs, die nur norma-
les Nährmedium erhalten hatten. Die genaue Berechnung stellt sich wie folgt
dar:

Im ersten Schritt wird der CP-Wert des house keeping Gens, also des Refe-
renzgens, von dem CP-Wert des Zielgens subtrahiert. Das Ergebnis wird als
 Δ CP angegeben:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen}$$

Danach wird dieser Δ CP Wert der Kontrollen von dem der experimentell be-
handelten Proben subtrahiert. Man erhält den $\Delta\Delta$ CP Wert:

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP Behandlung} - \Delta\text{CP Kontrolle}$$

Um den relativen Expressionsunterschied zwischen der experimentell behan-
delten Probe und der Kontrollprobe, normalisiert zum Referenzgen, zu erhalten,
muss die Ratio berechnet werden (Livak und Schmittgen 2001):

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Bei dieser Art der Berechnung geht man von einer Verdopplung der DNA Men-
ge in jedem Zyklus aus, also von einer optimalen Effizienz. Dies entspricht aber
nicht der Praxis. Deswegen berechneten wir wie oben beschrieben die Effizienz
der jeweiligen PCR und verwendeten das effizienz-korrigierte relative Quantifi-
zierungsmodell (Pfaffl 2001) um die Induktion (Ratio) zu berechnen:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle}-\text{Behandlung})}}$$

Das Ergebnis dieser Berechnung sagt aus, ob das Zielgen unter der Behand-
lung um einen Faktor x hoch (Ratio >1) oder runter (Ratio <1) reguliert wird,
immer im Verhältnis zur Kontrollgruppe, die nicht behandelt wurde.

Das endogene Differenzierungspotential der nicht behandelten MSCs kann man berechnen, indem man die relative Expression berechnet. Diese gibt an, wie viel von einem bestimmten Zielgen im Verhältnis zum Referenzgen (Houskeeping-Gen) innerhalb der Selben Probe vorliegt:

$$\text{Expression} = 2^{-(\text{CP Zielgen} - \text{CP Referenzgen})}$$

Das Ergebnis gibt die Expression des Zielgenes in Vielfachen, bzw. Bruchteilen der Referenzgen-Expression an.

2.2.11 DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der DNA-Gelelektrophorese kann man Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe auftrennen. Diese Methode funktioniert wie ein Sieb, indem ein elektrisches Feld verwendet wird, das die negativ geladenen Nukleinsäurestränge durch das Gel wandern lässt. Dabei können kleinere Moleküle schneller durch die Poren des Gels wandern und befinden sich am Schluss der Elektrophorese näher an der Anode auf dem Gel als große Moleküle. Die Größe der Poren hängt von der Acrylamidkonzentration und dem Vernetzungsgrad ab, im Durchschnitt beträgt sie 3-6 nm.

Nach der Nukleinsäurenamplifikation mittels PCR wurden die dadurch erhaltenen Produkte auf ein 8 %-iges Polyacrylamidgel aufgebracht und für 2 Stunden einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid behandelt und unter UV-Licht fotografiert. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren. Durch diese Interkalation nimmt die Intensität der Fluoreszenz-Emission zu und die einzelnen Banden werden unter UV-Licht sichtbar. Durch eine zusätzlich aufgetragene bp-Leiter (DNA Molecular Weight Marker XIV 100-1500 bp), konnte die Länge des PCR-Produktes in Basenpaaren bestimmt und mit der erwarteten bp-Länge verglichen werden.

2.2.12 Sequenzierung

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu sichern, wurde eine Sequenzierung dieser Produkte bei der Firma 4base lab in Reutlingen durchgeführt

Hierzu sendeten wir jeweils 10 µl der Primer für Troponin I und kardiales Aktin (forward und reverse) und jeweils 10 µl der unaufgereinigten PCR- Produkte ein. Die daraufhin erhaltenen Nucleotid Sequenzen wurden in den Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) eingegeben, um diese mit der Datenbank abzugleichen.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung und Klonierung der MSCs

3.1.1 Wachstum der unklonierten MSCs

Bei den unklonierten MSCs zeigte sich ein sehr heterogenes Wachstumsbild der mit verschiedenen Differenzierungsmedien behandelten Zellen. Daraus resultierten die unterschiedlichen Zellzahlen, die für die Untersuchungen zur Verfügung standen und in folgender Abbildung (Abb. 4) aufgeführt sind. Die Zellzahlen wurden, wie im Kapitel Material und Methodik beschrieben, bei Subkonfluenz erstellt.

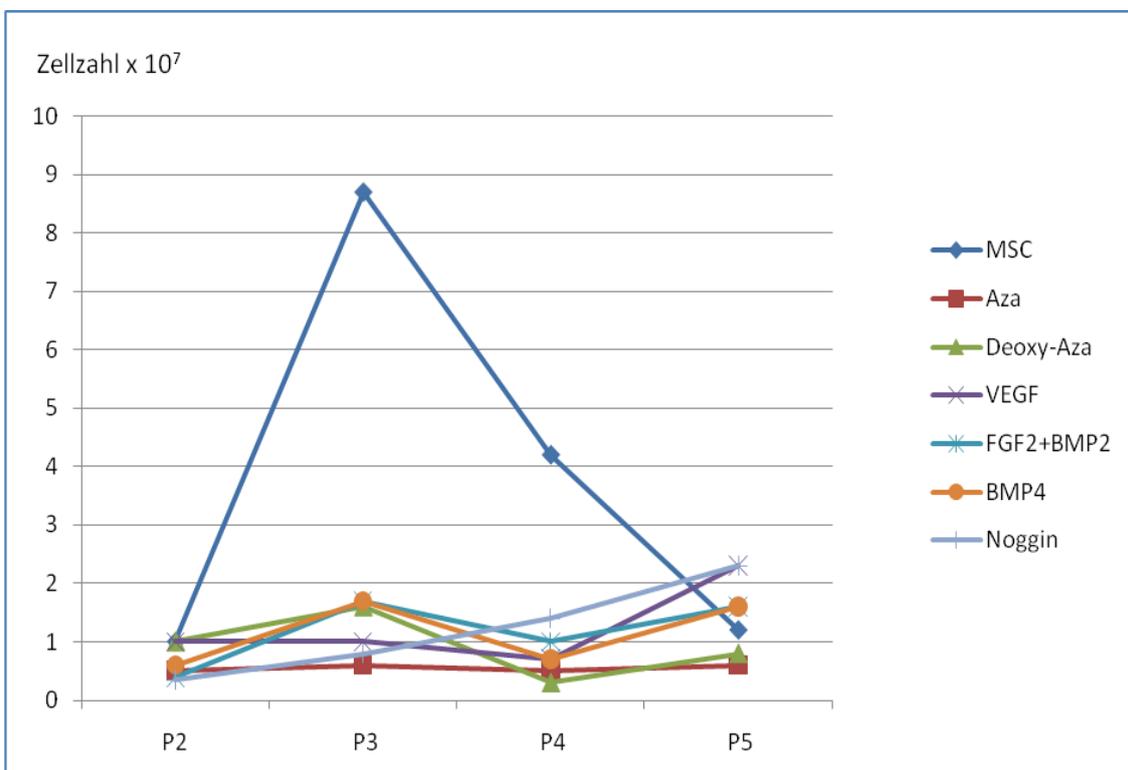


Abb. 4: Gewonnene Zellzahlen der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet (Zellzahl x 10⁷)

Das Wachstumsverhalten der unklonierten, undifferenzierten MSCs zeigte, im Gegensatz zu den unklonierten MSCs, die mit Differenzierungsmedien behandelt wurden, eine Zunahme in den Passagen P3 und P4. Zwischen den unter-

schiedlichen Differenzierungsmedien waren keine wesentlichen Unterschiede zu verzeichnen.

3.1.2 Wachstum der klonierten MSCs

Nach der Klonierung der MSCs zeigte sich nach den ersten Passagen das beste Wachstum bei Klon Nr. 6, so dass wir diesen für die weiteren Untersuchungen auswählten. Initial wurde bei diesem Klon Passage 3 und 5 untersucht, ab Passage 8 wurden Zellen jeder Passage untersucht, ab Passage 13 fiel das Wachstum ab und wir beendeten die Untersuchungen. Die genauen Zahlen der jeweils gewonnenen Zellen sind in der folgenden Abbildung (Abb. 5) aufgeführt.

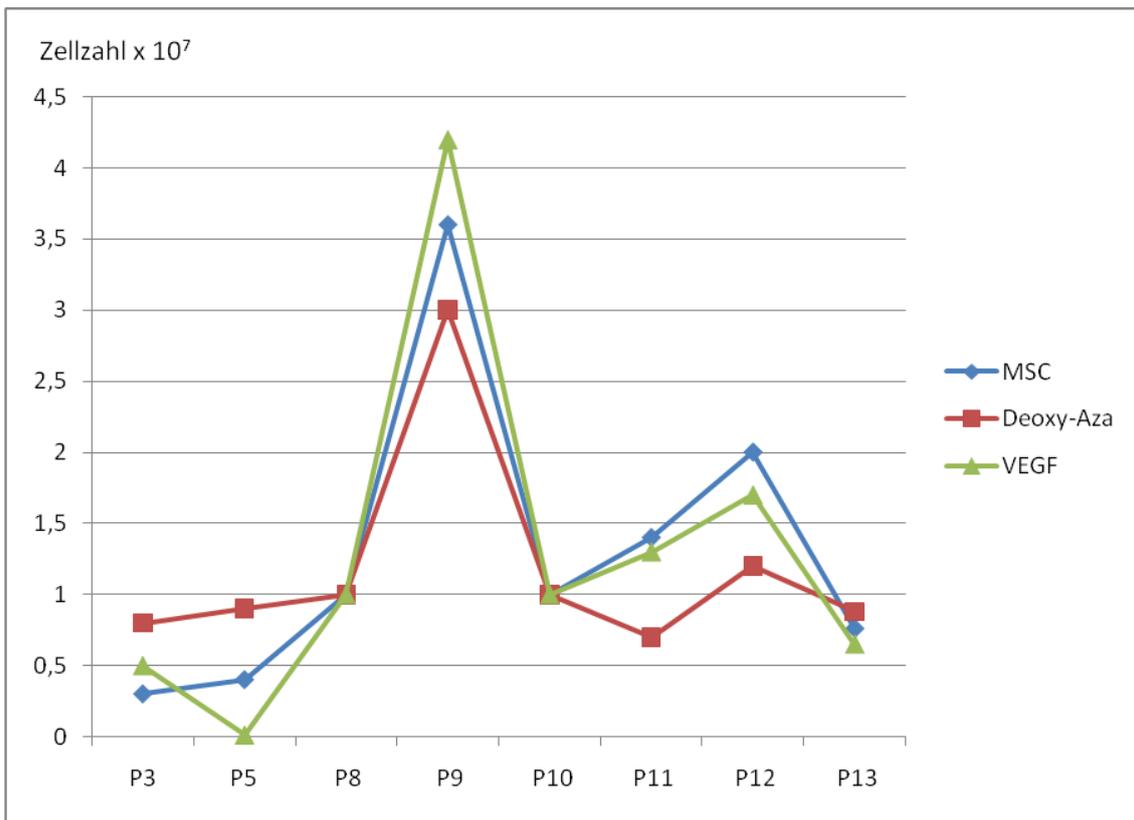


Abb. 5: Gewonnene Zellzahlen der klonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet (Zellzahl x 10⁷)

Das Wachstumsverhalten der klonierten MSCs zeigte ein relativ homogenes Bild. Es zeigte sich sowohl bei den undifferenzierten MSCs, als auch bei den mit Differenzierungsmedien behandelten MSCs eine deutliche Zunahme des Wachstums bei Passage P9 und eine geringere Zunahme bei Passage P12.

Bei Passage P9 konnte die größte Zellzahl unter dem Differenzierungsmedium VEGF festgestellt werden, bei Passage P12 bei den unbehandelten MSCs.

Unter dem Differenzierungsmedium VEGF konnten bei Passage 5 zu wenige Zellen ($0,01 \times 10^7$) gewonnen werden, so dass eine Untersuchung nicht möglich war.

3.2 Nicht-kardiomyogene Differenzierung der MSCs

Nach einer Behandlungsdauer von 21 Tagen mit adipogenem Medium zeigte die Färbung mit Ölrot sowohl der klonierten als auch der unklonierten MSCs eine adipogene Differenzierung, die sich in roten Tropfen äußerte, die Lipid-Vakuolen repräsentieren (Abb. 6).

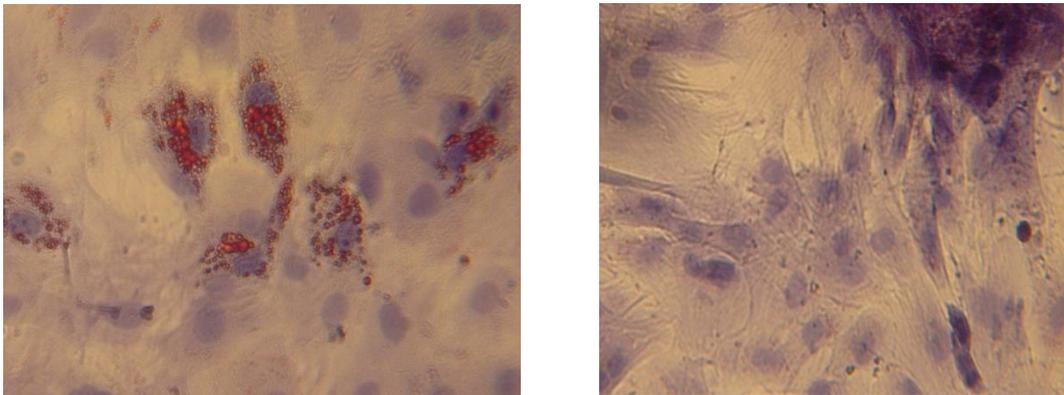


Abb. 6: Adipogen differenzierte MSCs linkes Bild und negativ Kontrolle rechtes Bild

Nach der Behandlung der unklonierten und der klonierten MSCs für 21 Tage mit osteogenem Medium konnte die von den osteogen differenzierten MSCs synthetisierte Alkalische Phosphatase pink-violett angefärbt werden (Abb. 7). Auch die Zellkerne erscheinen hell pink, allerdings ist dies bei stark positiven Zellen oft nicht direkt sichtbar, da die komplette Zelle pink-violett erscheint. Bei der negativ Kontrolle erscheinen die Zellkerne blau aufgrund der Gegenfärbung mittels Hematoxylin.

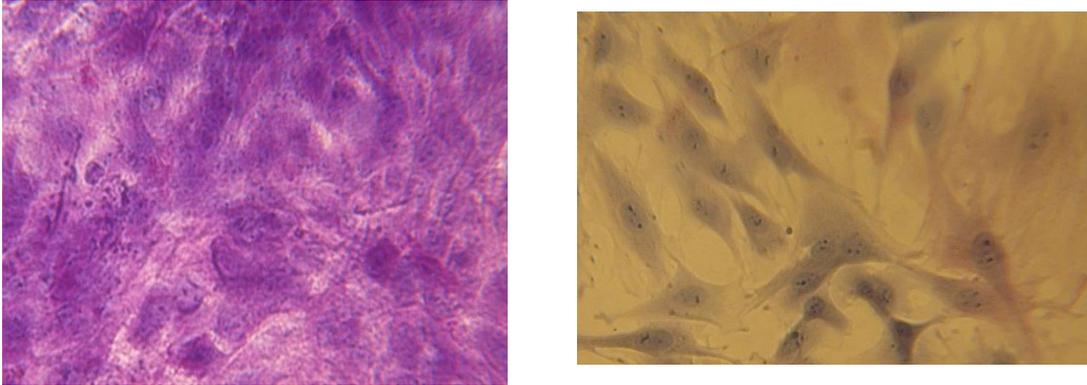


Abb. 7: Osteogen differenzierte MSCs linkes Bild und negativ Kontrolle rechtes Bild

Die Kontrollproben mit nicht differenzierten MSCs wiesen keine der oben genannten charakteristischen Färbungen auf.

Die Evaluation des Oberflächenprofils der MSCs mittels Durchflusszytometrie erfolgte in einer gesonderten Arbeit.

3.3 RNA-Isolation

Die berechneten Gesamt- RNA- Werte pro Probe variierten sowohl bei den klonierten als auch bei den unklonierten Zellen. In Passage 5 VEGF der klonierten MSCs waren zu wenige Zellen vorhanden, um eine Messung durchzuführen. Die genauen Werte sind in den folgenden Tabellen (Tabellen 1 und 2) aufgeführt.

	Passage 2	Passage 3	Passage 4	Passage 5
MSCs, undifferenziert	0,38	1,96	0,37	0,65
Aza	0,37	0,17	0,36	0,27
Deoxy-Aza	0,82	0,65	0,37	0,34
VEGF	0,69	0,14	0,36	0,24
FGF2+BMP2	0,28	0,82	0,71	1,04
BMP4	0,26	0,47	0,5	0,27
Noggin	0,25	0,56	0,39	0,49

Tabelle 1: Gesamt-RNA der jeweiligen Proben der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet (RNA-Menge in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

	MSCs, undifferenziert	Deoxy-Aza	VEGF
Passage 3	0,42	1,46	0,47
Passage 5	0,72	1,28	0
Passage 8	1,63	1,98	2,13
Passage 9	1,22	0,56	1,23
Passage 10	1,91	2,23	1,92
Passage 11	1,9	2,09	1,86
Passage 12	0,37	1,22	1,82
Passage 13	2,4	1,84	1,5

Tabelle 2: Gesamt-RNA der jeweiligen Proben der klonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet (RNA-Menge in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Wie in den Tabellen dargestellt, zeigte sich ein heterogenes Bild bezüglich der Gesamt-RNA der jeweiligen Proben sowohl bei den unklonierten, als auch bei den klonierten MSCs. Die jeweils höchsten Werte konnten bei den undifferenzierten MSCs verzeichnet werden. Bei den unklonierten MSCs war dies der Fall bei Passage 3 (1,96 µg/µl), bei den klonierten MSCs bei Passage13 (2,4 µg/µl).

3.4 Kardiomyogene Differenzierung der MSCs

3.4.1 PCR Effizienz

Bei der Berechnung der PCR-Effizienz mit Hilfe der Regressionsgeraden zeigte sich eine Effizienz von 1,9 bei der PCR mit dem Primer für das Gen GAPDH und jeweils eine Effizienz von 1,8 für die Primer der Gene Troponin I und kardiales Aktin.

3.4.2 DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aller PCR-Produkte, bei denen GAPDH amplifiziert wurde, zeigte sich eine Bande an der erwarteten Stelle. Das Gen GAPDH hat eine Größe von 223 bp.

Sowohl die PCR Produkte bei denen Troponin I (201 bp) amplifiziert wurde, als auch die PCR Produkte, bei denen kardiales Aktin (240 bp) amplifiziert wurde, zeigten eine spezifische Bande an der erwarteten Stelle.

Die jeweiligen Positiv-Kontrollen zeigten ein identisches Bandenmuster wie die Proben. Die Negativ-Kontrollen wiesen keine Banden in der Gelelektrophorese auf.

Der DNA-Längenstandard der benutzt wurde, weist die erste Bande bei 100bp auf, die weiteren Banden folgen in Abständen von jeweils 100bp. Die letzte Bande liegt bei 1500bp.

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 8 und 9,10) exemplarisch gezeigt.

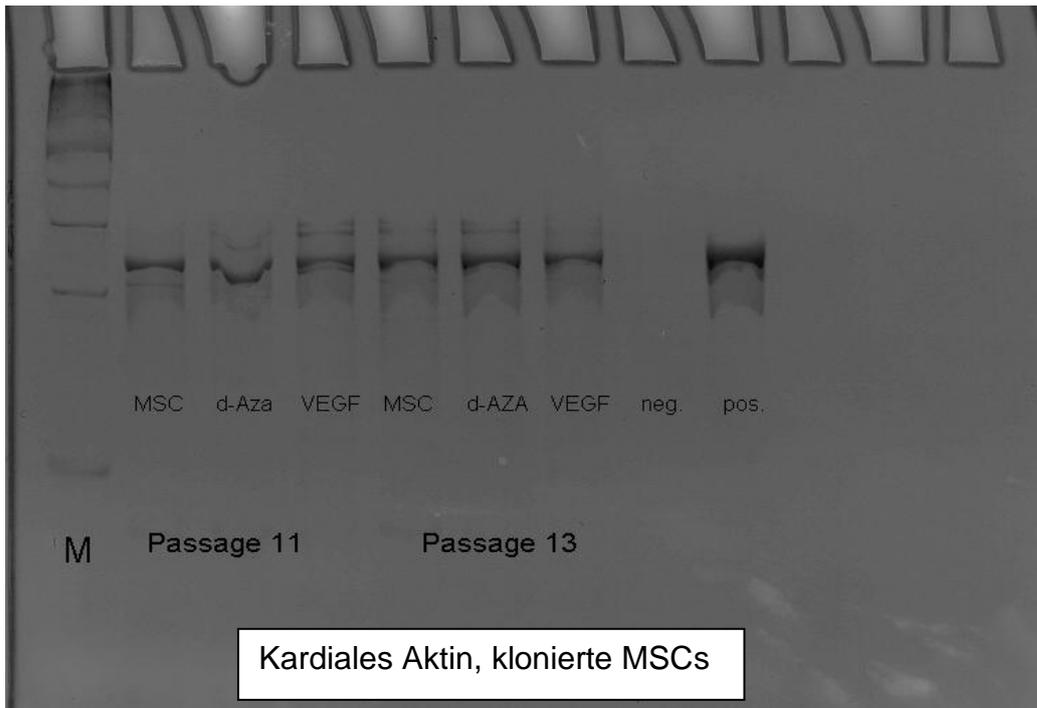


Abb. 8: Bandenmuster der PCR Produkte der klonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen kardiales Aktin amplifiziert wurde

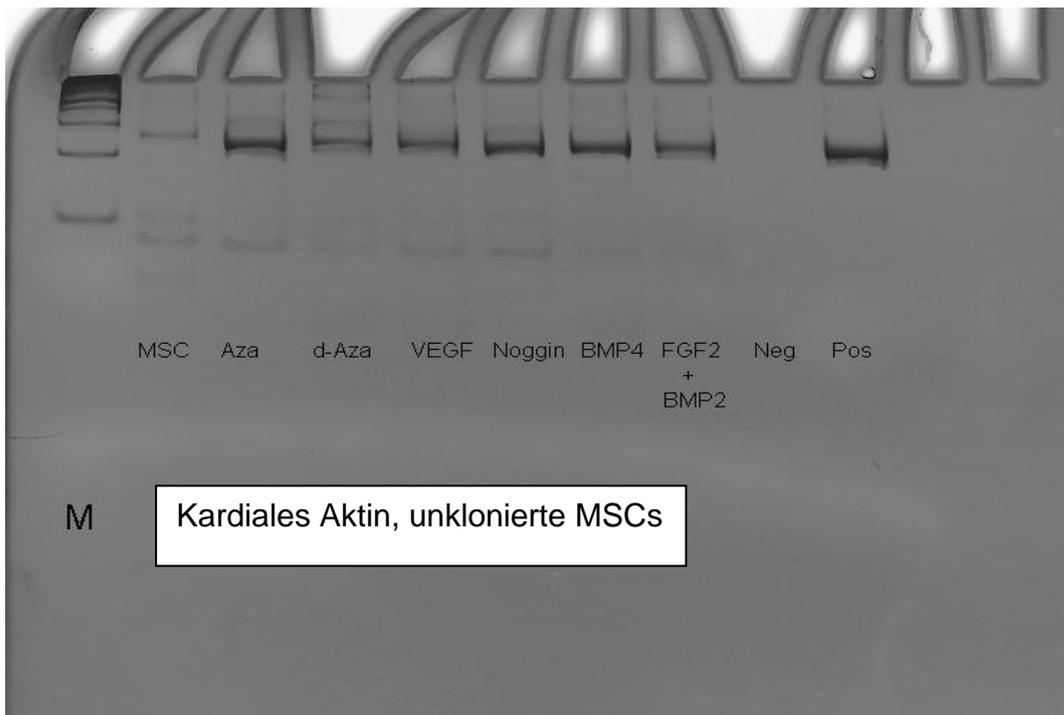


Abb. 9: Bandenmuster der PCR Produkte der unklonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen kardiales Aktin amplifiziert wurde

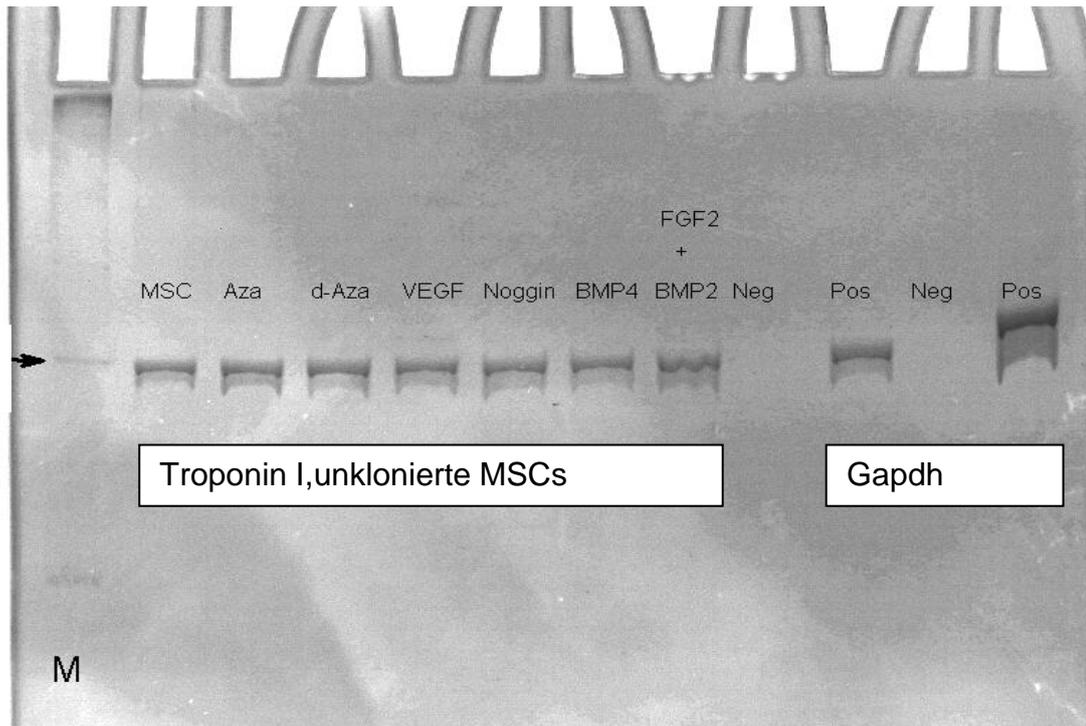


Abb. 10: Bandenmuster der PCR Produkte der unklonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen Troponin I/ Gapdh amplifiziert wurde

3.4.3 Sequenzierung

Wir erhielten von der Firma 4base lab in Reutlingen die Nucleotid-Sequenzen für die Gene Troponin I und kardiales Aktin unserer PCR-Produkte. Diese sind in Tabelle 5 aufgeführt. Diese Sequenzen wurde in den Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) eingegeben und führten bei Troponin I zu einer 99% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus* Troponin I mRNA. Bei kardialem Aktin fand sich eine 100% Übereinstimmung mit *Rattus norvegicus* actin alpha cardiac 1 mRNA.

<p>Troponin I reverse:</p> <p>TCAGGATTCCTTGGCCCGGGTCCCCAGTAGTGCCTGCATCATGGCATCTGC yGAGATTCTCACTCTTCGGAGAGTGGGCCGCTTAACTTGCCACGCAGGTC ATAGATCTTCTGGGTGAGATCTGCAATCTCAGTGATGTTCTTGGTGACTTT</p>
<p>Troponin I forward:</p> <p>AGATTGCAGATCTGACCCAGAAGATCTATGACCTGCGTGGCAAGTTTAAGC GGCCCACTCTCCGAAGAGTGAGAATCTCrGCAGATGCCATGATGCAGGCAC TACTGGGGACCCGGGCCAAGGAATCCTTGGACCTGAGGGCCACCTCAAG CAG</p>
<p>Kardiales Aktin reverse:</p> <p>GCACCGCCTGGATGGCCACATACATGGCAGGCACATTGAAGGTCTCAAAC ATGATCTGTGTCATCTTCTCACGGTTGGCCTTGGGGTTCAGTGGGGCCTCA GTGAGCAGGGTCGGGTGCTCCTCAGGGGCCACACGGAGCTCATTGTAGAA GGTGTGGTGCCAGATCTTCTCCATGTCGTCCCAGTTGGTG</p>
<p>Kardiales Aktin forward:</p> <p>TCTGGCACACACCTTCTACAATGAGCTCCGTGTGGCCCCTGAGGAGCAC CCGACCCTGCTCACTGAGGCCCACTGAACCCCAAGGCCAACCGTGAGAA GATGACACAGATCATGTTTGAGACCTTCAATGTGCCTGCCATGTATGTGGC CATCCAGGCGGTGCTGTCCCTGTACGCTTCTGGGAGAACCA</p>

Tabelle 3: Nucleotid-Sequenzen der PCR-Produkte mit den Primern für kardiales Aktin und Troponin I

3.4.4 Ergebnisse der Berechnung der endogenen mRNA Expression

Die Expression der einzelnen Proben wurde wie oben beschrieben berechnet. In den folgenden Diagrammen sind die Ergebnisse nach klonierten und unklonierten Zellen, sowie nach Passagen geordnet. Als „endogene Expression“ wurde die Expression der kardiomyogenen Gene in den MSCs, die nicht mit Differenzierungsmedium behandelt wurden, bezeichnet.

Die genauen Werte sind aus den folgenden Tabellen (4-7) und Diagrammen (11-14) ersichtlich.

	P2	P3	P4	P5
MSCs, undifferenziert	5,0416E-05	3,9553E-05	0,00017015	1,225E-06

Tabelle 4: Endogene Expression der unklonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH

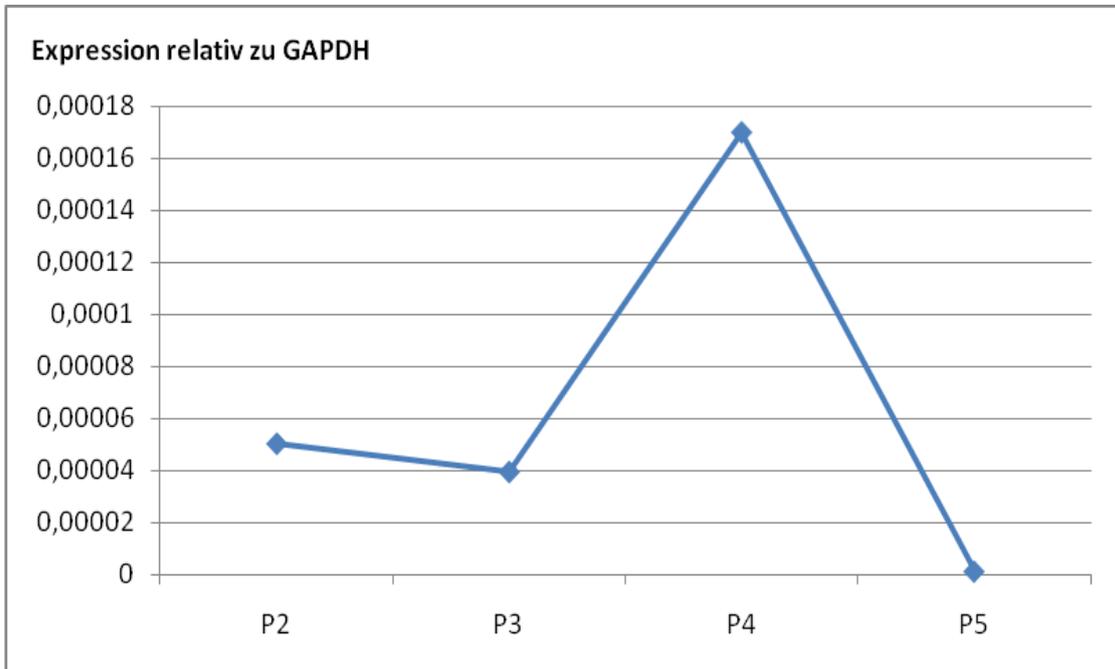


Abb. 11: Endogene Expression der unklonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH

	P2	P3	P4	P5
MSCs, undifferenziert	9,1873E-05	4,8118E-05	0,00016809	3,9977E-05

Tabelle 5: Endogene Expression der unklonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH

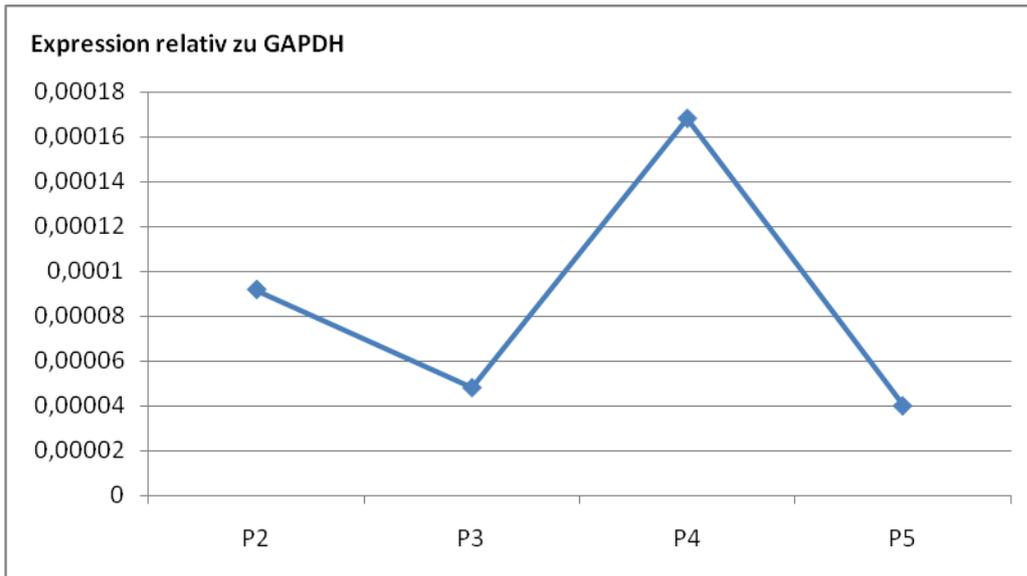


Abb. 12: Endogene Expression der unklonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH

	MSCs, undifferenziert
P3	0,00030422
P5	7,4125E-05
P7	3,7402E-05
P8	2,3023E-05
P9	0,00018857
P10	3,5332E-05
P11	3,7544E-05
P12	0,00041647
P13	8,3484E-05

Tabelle 6: Endogene Expression der klonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH

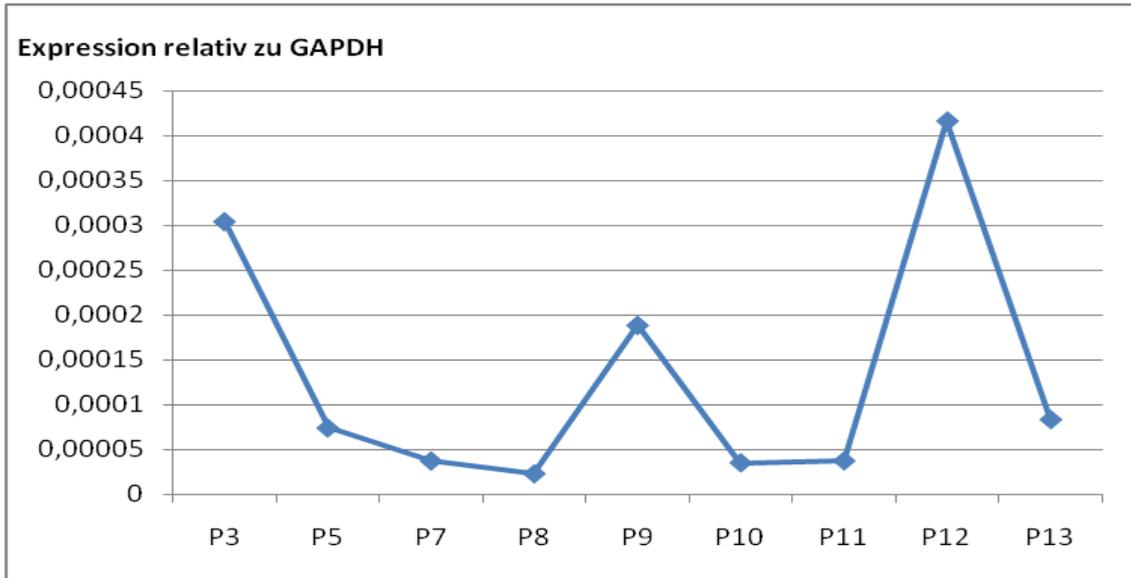


Abb. 13: Endogene Expression der klonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH

	MSCs, undifferenziert
P3	0,00034407
P5	0,00022818
P7	0,00012081
P8	6,814E-05
P9	7,1916E-05
P10	5,3858E-05
P11	6,2278E-05
P12	0,00012862
P13	6,79E-05

Tabelle 7: Endogene Expression der klonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH

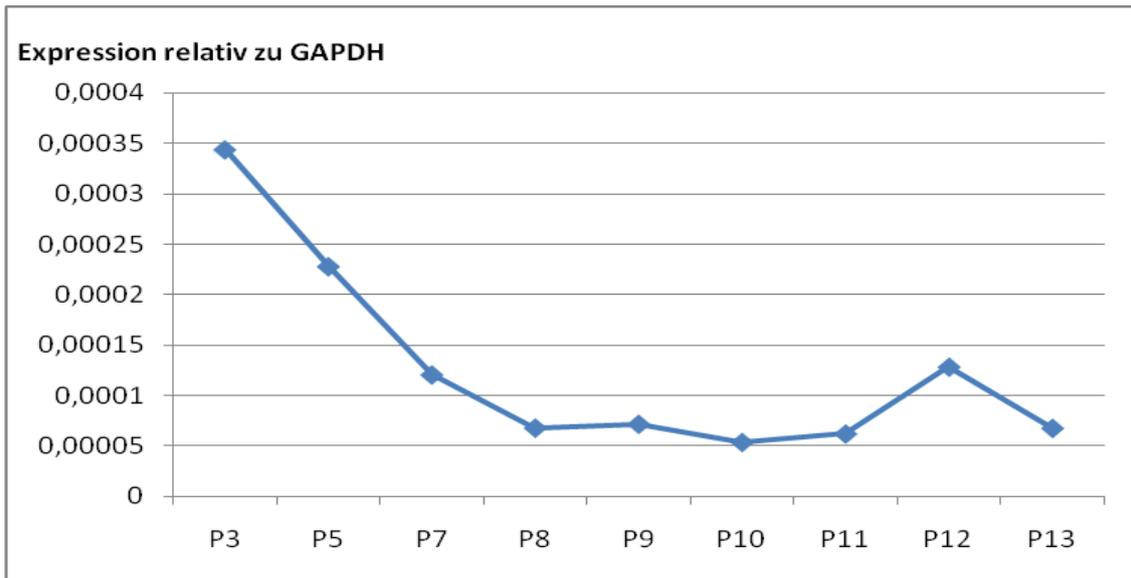


Abb. 14: Endogene Expression der klonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH.

Bei der Berechnung der endogenen Expression der mRNA des jeweiligen Zielgenes relativ zur Expression der mRNA des house-keeping Genes Gapdh zeigte sich bei den unklonierten Zellen sowohl bezüglich des Zielgenes kardiales Aktin als auch bezüglich Troponin I die höchste endogene Expression bei Passage 4.

Bei den klonierten Zellen zeigte sich ein heterogenes Bild. Hier konnte die höchste endogene Expression des Genes kardiales Aktin bei Passage 12 nachgewiesen werden, gefolgt von Passage 3. Bezüglich des Genes Troponin I wurde die höchste endogene Expression bei Passage 3, gefolgt von Passage 5 und 12 gezeigt werden.

3.4.5 Ergebnisse der Berechnung der Induktion

Im Gegensatz zur endogenen Expression beschreibt die Induktion die Expression des Zielgens (relativ zum house keeping Gen GAPDH) in den MSCs, die mit Differenzierungsmedium behandelt wurden immer im Bezug zu den MSCs, die mit Normalmedium behandelt wurden. Hierbei wurde im Besonderen darauf geachtet, die Genexpression in Bezug zu den unbehandelten MSCs der gleichen Passage zu setzen, da, wie oben gezeigt, die endogene Expression un-

terschiedlich sein kann. Die Induktion wurde wie oben beschrieben berechnet. Das Ergebnis dieser Berechnung sagt aus, ob das Zielgen unter der Behandlung um einen Faktor x hoch (Ergebnis >1) oder runter (Ergebnis <1) reguliert wird. Die Werte sind in den Tabellen 8-11 und den Abbildungen 15-18 dargestellt.

	P2	P3	P4	P5
Aza	1,3	1,40	0,47	15,88
D-Aza	1,04	1,18	0,65	5,94
VEGF	0,93	1,2	0,3	4
FGF2+BMP2	0,89	1,23	0,26	2,77
BMP4	1,01	1,1	0,21	45,23
Noggin	1,1	1,56	0,29	16,83

Tabelle 8: Ergebnisse der Induktion des Genes kardiales Aktin der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

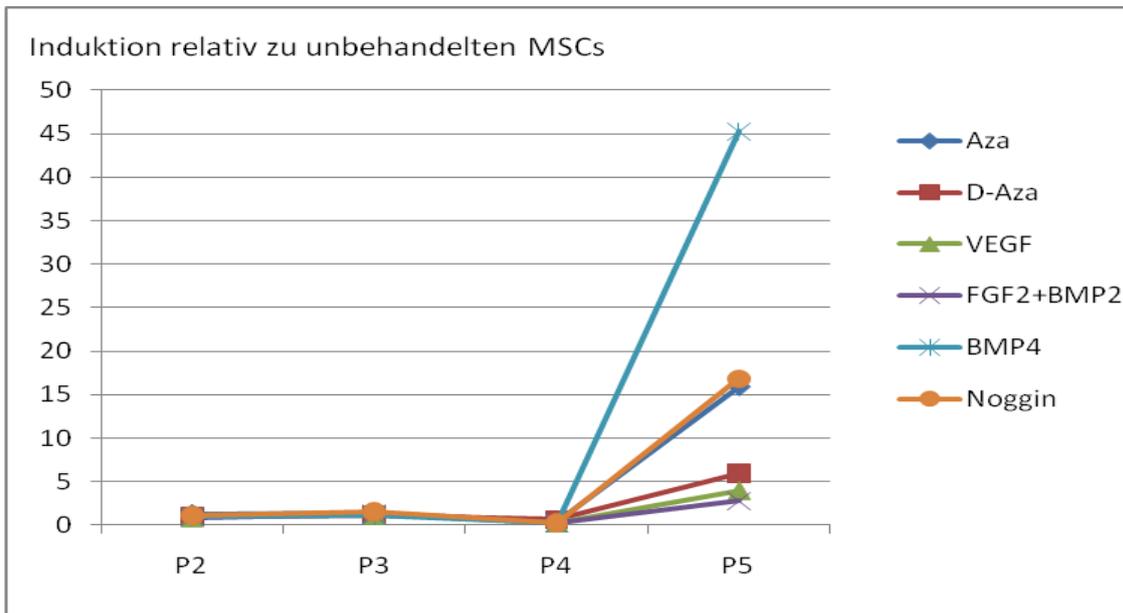


Abb. 15: Darstellung der Induktion des Genes kardiales Aktin der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

	P2	P3	P4	P5
Aza	1,01	1,99	1,05	1,47
D-Aza	0,82	1,86	1,01	1,15
VEGF	0,80	0,88	0,26	0,76
FGF2+BMP2	1,17	1,94	0,61	1,34
BMP4	1,17	1,57	0,56	1,48
Noggin	0,91	1,60	0,62	0,88

Tabelle 9: Ergebnisse der Induktion des Genes Troponin I der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

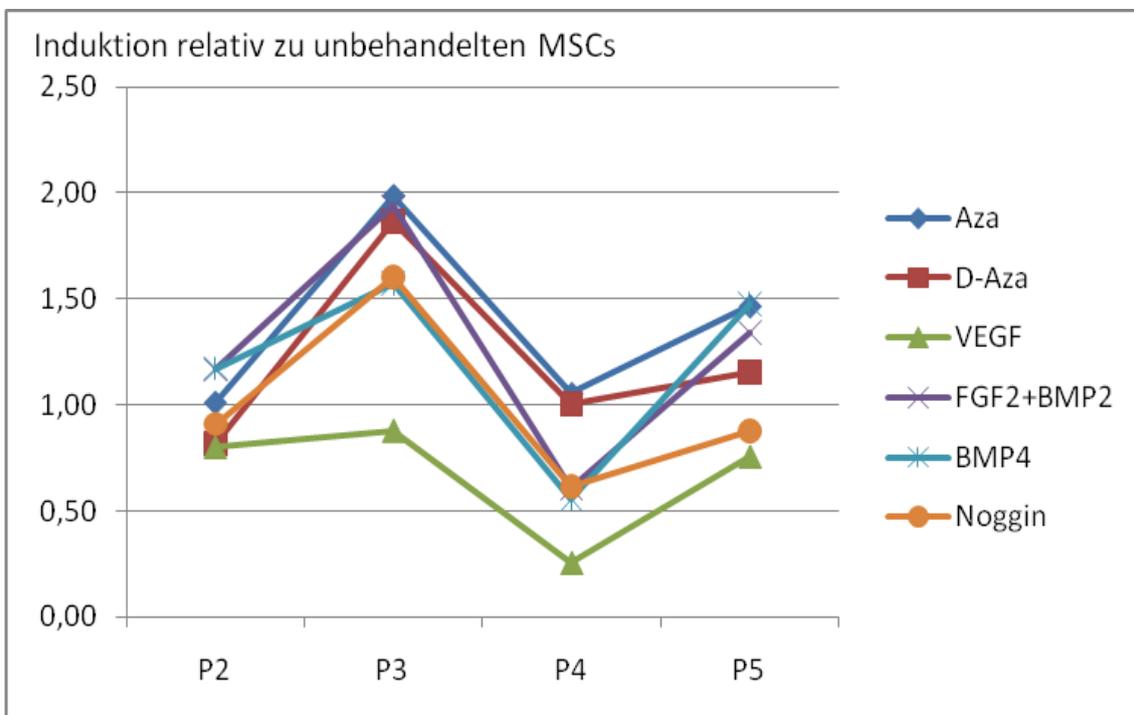


Abb. 16: Darstellung der Induktion des Genes Troponin I der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

	P3	P5	P8	P9	P10	P11	P12	P13
D-Aza	0,71	1,53	1,48	0,91	1,29	1,71	0,90	0,88
VEGF	0,51	0	0,60	0,99	1,13	2,35	0,39	1,50

Tabelle 10: Ergebnisse der Induktion des Genes Troponin I der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

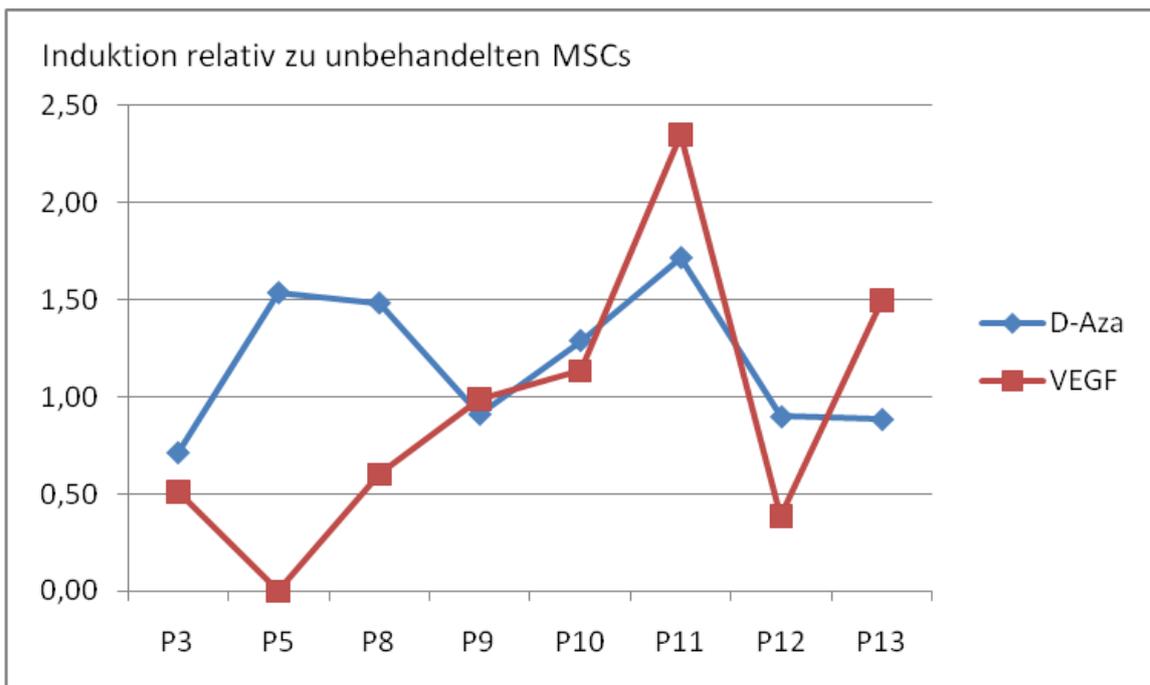


Abb. 17: Darstellung der Induktion des Genes Troponin I der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

	P3	P5	P8	P9	P10	P11	P12	P13
D-Aza	0,53	1,54	0,64	0,86	2,33	1,80	0,47	3,00
VEGF	0,34	0	2,28	0,90	2,10	18,92	0,13	0,92

Tabelle 11: Ergebnisse der Induktion des Genes kardiales Aktin der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

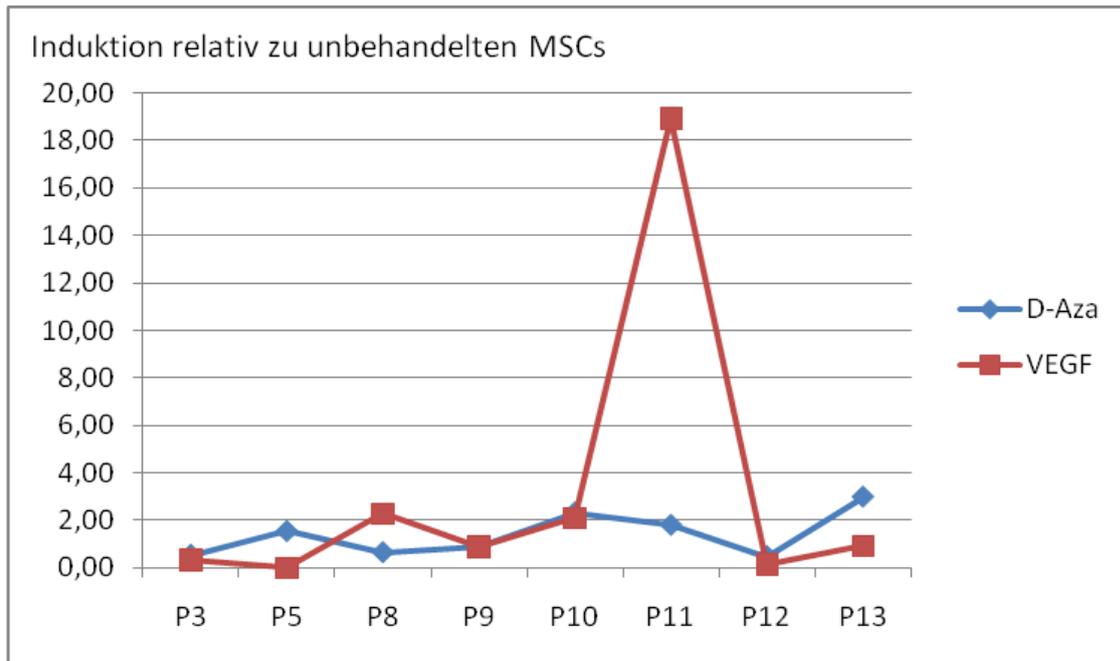


Abb. 18: Darstellung der Induktion des Genes kardiales Aktin der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien

Bei der Berechnung der Induktion der mRNA der jeweiligen Zielgene durch die verschiedenen Differenzierungsmedien relativ zu den undifferenzierten MSCs zeigte sich bei den unklonierten Zellen die höchste Induktion bezüglich des Genes kardiales Aktin bei allen Differenzierungsmedien bei Passage 5. Innerhalb der Medien fand sich die höchste Induktion mit einem Wert von 45,23 durch das Differenzierungsmedium BMP 4. In abnehmender Reihenfolge fanden sich Noggin und Aza, D-Aza, VEGF und mit der niedrigsten Induktion FGF2+BMP2.

Bezüglich des Genes Troponin I zeigte sich auch eine homogene Kurve der Induktion durch die verschiedenen Differenzierungsmedien mit den höchsten Werten bei Passage 3, gefolgt von Passage 5. Hier stellte sich Aza als das effizienteste Medium dar mit einer höchsten Induktion von 1,99 bei Passage 3. Zellen, die mit dem Differenzierungsmedium VEGF behandelt wurden zeigten die niedrigsten Werte.

Die klonierten Zellen wurden nur mit den Differenzierungsmedien VEGF und Aza behandelt wie oben beschrieben und es resultierte bezüglich beider Zielgene (kardiales Aktin und Troponin I) die höchste Induktion der mRNA bei

Passage 11. In beiden Fällen ergab das Medium VEGF die höhere Induktion, die einzelnen Werte waren aber mit 2,35 (Troponin I) und 18,92 (kardiales Aktin) deutlich unterschiedlich.

Insgesamt zeigte sich ein heterogenes Bild der Induktion bezüglich der Passagen und der Medien. Einheitlich war bei den klonierten wie auch den unklonierten Zellen, dass die mRNA des Zielgenes kardiales Aktin jeweils mehr exprimiert wurde, als die mRNA des Genes Troponin I.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der MSCs

Die adipogene sowie die osteogene Färbung der MSCs zeigten nach der entsprechenden adipogenen beziehungsweise osteogenen Differenzierung deutliche positive Ergebnisse. Hiermit konnten wir zeigen, dass die MSCs in zwei unterschiedliche Zelltypen differenzierbar waren. Ein Kriterium zur Charakterisierung wurde hiermit erfüllt (Dominici *et al.* 2006).

Ein weiteres Kriterium nach Dominici *et al.* ist die Plastikadhärenz. Diese war bei den von uns verwendeten Zellen von Anfang an gegeben.

Die weiteren Kriterien bezüglich des Oberflächenprofils konnten in einer gesonderten Arbeit erfüllt werden.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die von uns verwendeten Zellen nach der Definition von Dominici *et al.* als MSCs zu klassifizieren sind.

Zu beachten ist, dass diese Klassifikation für humane MSCs aufgestellt wurde. Harting *et al.* charakterisierten MSC der Ratte (Harting *et al.* 2008). Hier waren CD 73, CD 90 und CD 105 positiv, CD 45 und CD 11b negativ. Es zeigte sich also ein ähnliches Profil wie bei humanen MSCs.

4.2 Kardiomyogene Differenzierung der MSCs

Das zentrale Thema dieser Arbeit war der systematische Ansatz, die MSCs *in vitro* in Richtung Kardiomyozyten zu differenzieren. Die Grundlagen dazu waren Arbeiten, die zeigten, dass MSCs in der Lage sind, Proteine wie ANP, Nkx2.5 oder GATA4 zu exprimieren, die eigentlich der kardiomyogenen Linie vorbehalten sind (Hattan *et al.* 2005; Fukuda 2001). Obwohl viele Studien zeigen konnten, dass kardiomyogen differenzierte nicht-humane MSCs Eigenschaften von Kardiomyozyten *in vitro* erlangen konnten, konnte das Ziel funktionelle Kardiomyozyten aus MSCs in großer Zahl zu generieren bis jetzt nicht erreicht werden. In dieser Arbeit bezogen wir uns bezüglich der Differenzierungsmedien

vor allem auf die Studien von Wakitani *et al.* 1995, Xaymardan *et al.* 2004, Jamali *et al.* 2001, Yuasa *et al.* 2005 und Kawai *et al.* 2004 wie in der Einleitung und dem Kapitel Material und Methodik beschrieben.

Als Marker für die kardiomyogene Differenzierung entscheiden wir uns für die mRNA der für Kardiomyozyten spezifischen Gene Troponin I und kardiales Aktin, da diese einerseits herzmuskelspezifisch sind und andererseits funktionelle Eigenschaften von Kardiomyozyten widerspiegeln. Die Expression dieser mRNA konnte mittels spezifischer Primer durch die PCR erfolgreich detektiert werden.

Die PCR-Effizienz für den jeweiligen Primer wurde aus der Steigung der Regressionsgeraden berechnet. Nach dieser Berechnung wird theoretisch in jedem Zyklus der PCR die DNA-Menge nicht verdoppelt, sondern um den Faktor 1,8 bzw. 1,9 erhöht. Die Ergebnisse lassen auf eine annähernd gleiche Effizienz der PCR der verschiedenen, in dieser Studie verwendeten, Primer schließen. Damit ist die Voraussetzung gegeben, die Berechnung der endogenen Expression der einzelnen Proben zu vergleichen. Bei der Berechnung der Induktion benutzten wir das effizienzkorrigierte Model der relativen Quantifizierung (Pfaffl 2001), um auch hier möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen.

Bei der DNA-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigten sich bei allen Produkten die Banden auf Höhe der zu erwartenden Basenpaargröße. So konnte gezeigt werden, dass es sich bei unseren PCR-Produkten mit hoher Wahrscheinlichkeit um die von den Primern vorgegebenen Produkte handelte. Dies wurde durch das Ergebnis der Sequenzierung bestätigt. Hier zeigte sich eine Übereinstimmung von 99 % (Troponin I) bzw. 100 % (Kardiales Aktin) mit den von uns erwarteten Genen.

Unbehandelte MSCs zeigten in dieser Arbeit eine endogene Expression kardiomyogener mRNA.

Um weiter zu untersuchen, ob die endogene Expression der kardiomyogenen Gene durch entsprechende Behandlung gesteigert werden kann, berechneten wir die Induktion der Expression der mRNA der kardiomyogenen Gene durch

die verschiedenen Differenzierungsmedien relativ zu den nicht behandelten mesenchymalen Stammzellen, wie oben beschrieben.

Hier zeigte sich sowohl bei den klonierten, als auch bei den unklonierten mit den jeweiligen Differenzierungsmedien behandelten MSCs eine erhöhte mRNA-Expression der untersuchten Zielgene in Relation zu den unbehandelten MSCs. Die deutlichsten Ergebnisse erhielten wir bei den unklonierten und mit dem Differenzierungsmedium BMP4 behandelten MSCs bei Passage 5 mit einer erhöhten Expression des Genes kardiales Aktin um den Faktor 45,23 in Bezug zu den nichtbehandelten MSCs. Bei den klonierten und mit dem Differenzierungsmedium VEGF behandelten MSCs wurde die höchste Expression des Genes kardiales Aktin bei Passage 11 um den Faktor 18,92 wieder in Bezug zu den nichtbehandelten MSCs der gleichen Passage. Das zweite Zielgen Troponin I wies durch die verschiedenen Differenzierungsmedien auch eine erhöhte Expression auf, hier war der maximale Faktor 2,35 im Bezug auf die nicht behandelten MSCs der selben Passage. Es zeigte sich vor allem eine deutlich erhöhte Expression des für Kardiomyozyten spezifischen Genes kardiales Aktin durch die Behandlung mittels Differenzierungsmedium. Bei den einzelnen Differenzierungsmedien zeigte sich keines, das deutlich in den gesamten Untersuchungen den anderen überlegen war. Diesbezüglich zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen den klonierten und den unklonierten MSCs, sowie zwischen den einzelnen Passagen.

4.3 Vergleich zwischen unklonierten und klonierten MSCs

In dieser Studie beobachteten wir die Eigenschaften klonierten und unklonierter Zellen, da MSCs eine sehr heterogene Zellgruppe darstellen und die Isolation und die Kulturbedingungen der Zellen nicht bis ins letzte standardisiert sind. Schäfer *et al.* beschrieben dies 2008 in einem Kapitel ihres Meeting Reports: Die Kriterien der Definition MSCs von Dominici *et al.* beinhaltet die Plastikadhärenz der Zellen als ein Kriterium. Da nicht nur MSCs diese Adhärenz zeigen, können andere Zellen ko-kultiviert werden (Schäfer *et al.* 2006), die eventuell wiederum Mediatoren ausschütten können, die auf das Wachstumsverhalten und die Differenzierung der MSCs Einfluss haben können.

Russell *et al.* klonierten 2010 MSCs aus humanem Knochenmark und untersuchten die einzelnen Klone bezüglich des Immunophänotypes und ihres Potentials zur osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung. Es zeigte sich ein für MSCs typischer Immunophenotyp. Bei der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung fanden sich alle acht möglichen Kategorien bei den einzelnen Klonen. Am häufigsten konnte die tripotente, die osteogene und die osteo-chondrogene Differenzierung beobachtet werden. Am wenigsten zeigte sich der adipo-chondrogene Differenzierungstyp. Es fanden sich auch Klone, die ein osteo-adipogenes Differenzierungspotential aufwiesen. Dies spricht gegen eine lineare Hierarchie, bei der die tripotenten Zelle über den Verlust des adipogenen und dann des chondrogenen Differenzierungspotentials zur Osteoprogenitorzelle wird (Muraglia *et al.* 2000 und Banfi *et al.* 2000).

In unserer Studie zeigten sowohl die klonierten als auch die unklonierten Zellen ein adipogenes und osteogenes Differenzierungspotential. Bezüglich der Induktion und der endogenen Expression der kardiomyogenspezifischen mRNA zeigte sich ein heterogenes Bild. Die Berechnung der endogenen Expression beider Zielgene bei den unklonierten MSCs führte zu sehr ähnlichen Ergebnissen mit einem höchsten Wert bei Passage 4. Bei den klonierten MSCs dagegen zeigten sich bezüglich der endogenen Expression beider Zielgene unterschiedliche Ergebnisse. Die Berechnung der Induktion der Expression der Zielgene durch die verschiedenen Differenzierungsmedien wies keine systematischen Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen den klonierten und den unklonierten MSCs auf. Hier zeigte sich, wie oben beschrieben, eine Tendenz dahingehend, dass das Zielgen kardiales Aktin mehr von der Induktion durch Differenzierungsmedien profitiert als das Zielgen Troponin I. Diese Beobachtung konnten wir bei den Ergebnissen der Berechnung der endogenen Expression nicht machen, hier hatte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Genen ergeben.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine RT-PCR mittels LightCycler-Technologie etabliert, die die kardiomyogenspezifischen Gene kardiales Aktin und Troponin I der Ratte amplifiziert. Ausgehend von den dadurch gewonnenen Daten konnte ein endogenes Differenzierungspotential, der klonierten sowie auch der unklonierten MSCs nachgewiesen werden, ohne dass ein systematischer Unterschied zwischen den klonierten und unklonierten MSCs ausgemacht werden konnte. Des Weiteren zeigte sich durch die Induktion mittels verschiedener Differenzierungsmedien eine erhöhte Expression vor allem des Zielgenes kardiales Aktin, weniger des Zielgenes Troponin I, bezogen auf die unbehandelten MSCs der gleichen Passage. Die Ursache für die erfolgreichere Induktion der Expression des Genes kardiales Aktin im Vergleich zu Troponin I kann durch diese Studie nicht erklärt werden.

Nach den erhobenen Daten korreliert das durch Differenzierungsmedien ausgelöste kardiomyogene Differenzierungspotential der von uns untersuchten klonierten und unklonierten MSCs nicht mit dem endogenen kardiomyogenen Differenzierungspotential dieser MSCs. Es konnten keine einzelnen Passagen ausgemacht werden, in denen sowohl das endogene, als auch das durch Differenzierungsmedien veranlasste Differenzierungspotential deutlich erhöht waren.

Abschließend ist zu sagen, dass sich auch in dieser Arbeit die Heterogenität der MSCs zeigte, die in der Literatur beschrieben wird (Phinney und Prockop 2007, Sabatini *et al.* 2005, Schäfer *et al.* 2006 und 2008). Es scheint sinnvoll, die Charakterisierung der MSCs weiter zu verbessern und die Isolations- und Kulturbedingungen zu standardisieren. Das in der Literatur beschriebene, durch verschiedene Differenzierungsmedien steigerbare Differenzierungspotential der MSCs (Wakitani *et al.* 1995, Xaymardan *et al.* 2004, Jamali *et al.* 2001) konnte auch in unserer Studie gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich ein endogenes kardiomyogenes Differenzierungspotential. Ein Mechanismus oder eine Stimulation als Auslöser dieser Differenzierung konnte in unserer Arbeit nicht identifiziert werden. Allerdings könnte die detektierte endogene Expression der kardiomyogenen Linie darauf hinweisen, dass die Expression kardiomyogener

mRNA *per se* nicht alleine Zellen der kardiomyogenen Linie vorbehalten ist. Um das endogene Differenzierungspotential zu spezifizieren, müssten weitere Studien, beispielsweise mit zusätzlichen Zell-Entitäten nicht mesodermalen Ursprungs, durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Laut der Weltgesundheitsorganisation sind die kardiovaskulären Erkrankungen die häufigsten Todesursachen. Im Jahr 2004 war die Koronare Herzkrankheit die häufigste Todesursache (52%) unter den Menschen, die an kardiovaskulären Ursachen starben. Alle konventionellen therapeutischen Strategien konnten nicht die Regeneration des infarzierten, nekrotischen und schlussendlich narbig umgebauten Myokardgewebes erreichen. Man kann also annehmen, dass die Transplantation von Zellen, die sich in die geschädigte Zone (oder in die umliegenden Areale) einfügen und zu der Bildung eines regenerativen Gewebes beitragen, das dem narbigen Herzgewebe überlegen ist, ein großer Schritt in der Therapie von Herzerkrankungen sein würde. Tatsächlich zeigen mehrere Tierstudien und einige klinische Studien, dass die Applikation aus Knochenmark gewonnener mesenchymaler Stammzellen (MSCs) die Herzfunktion nach einer Myokardischämie verbessern kann. Ein Ansatz, eine ungewollte, nicht-kardiomyogene Differenzierung der MSCs zu verhindern, wäre die MSCs zunächst *in vitro* zu differenzieren und dann eine ausreichende Menge dieser Zellen in das Myokard zu transplantieren. Verschiedene Forschungsgruppen konnten Ergebnisse bezüglich der kardiomyogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen mittels verschiedener Differenzierungsmedien publizieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Effekt der unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Differenzierungsmedien auf das kardiomyogene Differenzierungspotential an den gleichen MSC Populationen der Ratte zu testen, um diesen unter den gleichen Bedingungen vergleichen zu können. Als Vergleichsparameter diente die Expression der mRNA der kardiomyogenspezifischen Gene Troponin I und kardiales Aktin. Des Weiteren wurde auf die Frage eingegangen, wie weit das endogene kardiome Differenzierungspotential der mesenchymalen Stammzellen ausgeprägt ist, das heißt: exprimieren die MSCs auch ohne Behandlung mit Induktoren kardiomyogene mRNA? Am Beispiel von zwei Differenzierungsmedien wurde untersucht, ob sich das kardiomyogene Differenzierungspotential unklonierter MSCs von dem klonierter MSCs unterscheidet.

Die Methodik, die in dieser Arbeit verwendet wurde um die Expressionsunterschiede darzustellen, ist die Real time PCR mittels LightCycler-Technologie. Hier erfolgte die Konzeption und Etablierung einer RT-PCR, die exakt die Gene kardiales Aktin und Troponin I der Ratte amplifiziert.

In dieser Studie konnte ein endogenes Differenzierungspotential, der klonierten sowie auch der unklonierten MSCs nachgewiesen werden, ohne dass ein systematischer Unterschied zwischen den klonierten und unklonierten MSCs ausgemacht werden konnte. Des Weiteren zeigte sich durch die Induktion mittels verschiedener Differenzierungsmedien eine erhöhte Expression vor allem des Zielgenes kardiales Aktin, weniger des Zielgenes Troponin I. Die Ursache für die erfolgreichere Induktion der Expression des Genes kardiales Aktin im Vergleich zu Troponin I kann durch diese Studie nicht erklärt werden.

Nach den erhobenen Daten korreliert das durch Differenzierungsmedien ausgelöste kardiomyogene Differenzierungspotential der von uns untersuchten klonierten und unklonierten MSCs nicht mit dem endogenen kardiomyogenen Differenzierungspotential dieser MSCs. Es konnten keine einzelnen Passagen ausgemacht werden, in denen sowohl das endogene, als auch das durch Differenzierungsmedien veranlasste Differenzierungspotential deutlich erhöht waren.

Abschließend ist zu sagen, dass sich auch in dieser Arbeit die Heterogenität der MSCs zeigte, die in der Literatur beschrieben wird. Es scheint sinnvoll, die Charakterisierung der MSCs weiter zu verbessern und die Isolations- und Kulturbedingungen zu standardisieren. Das in der Literatur beschriebene, durch verschiedene Differenzierungsmedien steigerbare Differenzierungspotential der MSCs konnte auch in unserer Studie gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich ein endogenes kardiomyogenes Differenzierungspotential. Ein explizierter Mechanismus oder eine Stimulation als Auslöser dieser Differenzierung konnte in unserer Arbeit nicht identifiziert werden. Allerdings könnte die detektierte endogene Expression der kardiomyogenen Linie darauf hinweisen, dass die Expression kardiomyogener mRNA *per se* nicht alleine Zellen der kardiomyogenen Linie vorbehalten ist. Um das endogene Differenzierungspotential zu spezifizie-

ren, müssten weitere Studien, beispielsweise mit zusätzlichen Zell-Entitäten nicht mesodermalen Ursprungs, durchgeführt werden.

6 Abbildungen und Tabellen

6.1 Abbildungen

Abbildung 1: Darstellung der CPs mittel LightCycler Software.....	27
Abbildung 2: Darstellung der Schmelzkurvenanalyse mittels LightCycler Software.....	28
Abbildung 3: Darstellung der Regressionsgeraden mittels LightCycler Software.....	30
Abbildung 4: Gewonnene Zellzahlen der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet	35
Abbildung 5: Gewonnene Zellzahlen der klonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet	36
Abbildung 6: Adipogen differenzierte MSCs linkes Bild und negativ Kontrolle rechtes Bild.....	37
Abbildung 7: Osteogen differenzierte MSCs linkes Bild und negativ Kontrolle rechtes Bild.....	38
Abbildung 8: Bandenmuster der PCR Produkte der klonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen kardiales Aktin amplifiziert wurde.....	41
Abbildung 9: Bandenmuster der PCR Produkte der unklonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen kardiales Aktin amplifiziert wurde.....	41
Abbildung 10: Bandenmuster der PCR Produkte der unklonierten MSCs, sowie der positiv und negativ Kontrolle, bei denen Troponin I/ GAPDH amplifiziert wurde.....	42

Abbildung 11: Endogene Expression der unklonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH.....	44
Abbildung 12: Endogene Expression der unklonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH.....	45
Abbildung 13: Endogene Expression der klonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH.....	46
Abbildung 14: Endogene Expression der klonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH.....	47
Abbildung 15: Darstellung der Induktion des Genes kardiales Aktin der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien.....	48
Abbildung 16: Darstellung der Induktion des Genes Troponon I der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien.....	49
Abbildung 17: Darstellung der Induktion des Genes Troponon I der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien.....	50
Abbildung 18: Darstellung der Induktion des Genes kardiales Aktin der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien.....	51
 6.2 Tabellen	
Tabelle 1: Gesamt-RNA der jeweiligen Proben der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet	39
Tabelle 2: Gesamt-RNA der jeweiligen Proben der klonierten MSCs unter den verschiedenen Medien nach Passagen geordnet.....	39
Tabelle 3: Nucleotid-Sequenzen der PCR-Produkte mit den Primern für kardiales Aktin und Troponin I	43
Tabelle 4: Endogene Expression der unklonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH	44

Tabelle 5: Endogene Expression der unklonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH.....	44
Tabelle 6: Endogene Expression der klonierten MSCs für kardiales Aktin relativ zu GAPDH.....	45
Tabelle 7: Endogene Expression der klonierten MSCs für Troponin I relativ zu GAPDH.....	46
Tabelle 8: Ergebnisse der Induktion des Genes kardiales Aktin der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien	48
Tabelle 9: Ergebnisse der Induktion des Genes Troponin I der unklonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien	49
Tabelle 10: Ergebnisse der Induktion des Genes Troponin I der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien	50
Tabelle 11: Ergebnisse der Induktion des Genes kardiales Aktin der klonierten MSCs unter den verschiedenen Differenzierungsmedien	50

7 Literaturverzeichnis

Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, Larghero J, Ghostine S, Leobon B, Robidel E, Borsani P, Le Lorc'h M, Bissery A, Chomienne C, Bruneval P, Marolleau JP, Vilquin JT, Hagege A, Samuel JL, Menasche P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow derived CD 133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44; 458-463.

Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK. 2007 focused update of the ACC/ AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/ American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(2); 210-247.

Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer- Rasokat U, Lehmann R. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(12); 1222-1232.

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106(24); 3009-3017.

Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances *in vitro* CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. *Blood* 2005; 106(9); 3012-3019.

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins R. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428; 668-673.

Banfi A, Muraglia A, Dozin B et al. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implication for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 2000; 28; 707-715.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344 (23); 1750-1757.

Beresford JN, Bennet JH, Devlin C, Leboy PS, Owen M. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992; 102; 341-351.

Bu L, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, Roberts DJ, Huang PL, Domian IJ, Chien KR. Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. *Nature* 2009; 460(7251);18-19.

Casaclang- Verzosa G, Gersh BJ, Tsang TS. Structural and functional remodeling of the left atrium: clinical and therapeutic implications for atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51(1); 1-11.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25 (11); 2739-2749.

Cohen M, Diez JE, Levine GN, Ferguson JJ, III, Morrow DA, Rao SV. Pharmacoinvasive management of acute coronary syndrome: incorporating the 2007 ACC/ AHA guidelines: the CATH (cardiac catheterization and antithrombotic therapy in the hospital) Clinical Consensus Panel Report—III. *J Invasive Cardiol* 2007; 19 (12); 525-538.

Colter DC, Class R, Digirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic- adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97; 3213-3218.

Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogenic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Postinfarcted Rat Myocardium. *Circulation* 2005; 112; 214-223.

Da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt11); 2204-2213.

D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC. Marrow isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of post-natal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 2004; 117; 2971-2981.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999; 14; 700-709.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper- Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8; 315-317.

Dorheim MA, Sullivan M, Dandapani V, Wu X, Hudson J, Segarini PR, Rosen DM, Aulthouse AL, Gimble JM. Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J Cell Physiol* 1993; 154; 317-328.

Dorshkind K, Johnson A, Collins L, Keller GM, Phillips RA. Generation of purified stromal cell cultures that support lymphoid and myeloid precursors. *J Immunol Methods* 1986; 89(1); 37-47.

Fitchett D, Rockwood K, Chan BT, Schultz S, Bogaty P, Gillis A. Canadian Cardiovascular Society Consensus Conference 2002: Management of heart disease in the elderly patient. *Can J Cardiol* 2004; 20 Suppl A: 7A-16A.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53(1); 31-47.

Friedenstein AJ, Latzinik NW, Grosheva AG, Gorskaya UF. Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges. *Exp Hematol* 1982; 10; 217-227.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* 1968; 6; 230-247.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp morph* 1966; 16; 381-390.

Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001; 25; 187-193.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007; 211(1); 27-35.

Hamano K, Nishida M, Hirata K, Mikamo A, Li TS, Harada M. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65(9); 845-847.

Harting M, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2008; 10(3); 243-253.

Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 2005; 65; 334-344.

Horwitz E, Le BK, Dominici M. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7; 393-395.

Hou M, Yang KM, Zhang H, Zhu WQ, Duan FJ, Wang H, Song YH, Wei Y, Hu S. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *Int J Cardiol* 2007; 115; 220-228.

Ikeda Y, Hiroi Y, Hosoda T, Utsonomiya T, Matsuo S, Ito T. Novel point mutation in the cardiac transcription factor CSX/ NKX2.5 associated with congenital heart disease. *Circ J* 2002; 66; 561-563.

Jamali M, Karamboulas C, Rogerson PJ, Skerjanc IS. BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis. *FEBS Lett.* 2001; 509(1); 126-130.

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cell: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 2004; 32(5); 414-425.

Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Interactions of chemokines and chemokine receptors mediate the migration of mesenchymal stem cells to the impaired site in the brain after hypoglossal nerve injury. *Stem cells* 2004; 22(3); 415-27.

Jiang WH, Ma AQ, Zhang YM, Han K, Liu Y, Zhang ZT, Wang TZ, Huang X, Zheng XP. Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats. *Acta Physiol Sin* 2005; 57(5); 566-572.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Kenne CD, Ortiz-Gonzalez XR. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418; 41-49.

Johnson A, Dorshkind K. Stromal cells in myeloid and lymphoid long-term bone marrow cultures can support multiple hemopoietic lineages and modulate their production of hemopoietic growth factors. *Blood* 1986; 68(6); 1348-1354.

Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Negano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cells by FGF2 and BMP2. *Circ J*. 2004; 68(7); 691-702.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood or Adipose Tissue. *Stem Cells* 2006.

Livak KJ und Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001, 25(4):402-408.

Löffler, *Basiswissen Biochemie*, 6. Auflage; 2004; 666-671.

Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357(9252); 279-280.

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11; 1061-1072.

Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol. Cell Biol*. 1999; 19; 7096-7105.

Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microsc Res Tech* 2000; 50; 522-531.

Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; 113; 1161-1166.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410; 701-705.

Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MScs) isolated from different strains of inbred mice

vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* 2004; 103; 1662-1668.

Petrakova KV, Tolmacheva AA, Friedenstein AJ. Bone formation occurring in bone marrow transplantation in diffusion chambers. *Bull Exp. Biol med* 1963; 56; 87-91.

Pfaffl MW, A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 2001; 29 (9); e45.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise Review: Mesenchymal Stem/ Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue repair Current Views. *Stem Cells* 2007; 25; 2896-2902.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276; 71-74.

Rasmussen R. Quantification on the LightCycler in Rapid Cycle Realtime PCR, *Methods and Applications*. Springer, Heidelberg 2001; 21-34.

Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; 117(4); e25-146.

Russell K, Phinney D, Lacey M, Barrilleaux B, Meyertholen K, O'Connor K. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells* 2010.

Sabatini F, Petecchia L, Taviani M. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 2005; 85; 962-971.

Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355(12); 1210-1221.

Schäfer R, Dominici M, Müller I, Dazzi F, Bieback K, Godthardt K, Le Blanc K, Pochampally R, Richter R, Skutella T, Steinhoff G, Mitterberger M, Wendel HP, Wiskirchen J, Handgretinger R, Northoff H. Meeting report, Progress in characterization, preparation and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 29-30 September 2006, Tübingen, Germany. *Cytotherapy* 2007; 9; 397-405.

Schäfer R, Dominici M, Müller I, Horwitz E, Asahara T, Bulte JWM, Bieback K, Le Blanc K, Bühring HJ, Capogrossi MC, Dazzi F et al. Meeting report, Basic research and clinical applications of non-hematopoietic stem cells, 4-5 April 2008, Tübingen, Germany. *Cytotherapy* 2009; 11(2); 245-255.

Schultheiss T, Burch J, Lassar A. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 1997; 11; 451-462.

Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104; 557-567.

Skerjanc I, Petropoulos H, Ridgeway A, Wilton S. Myocyte enhancer factor 2C and Nkx2-5 up-regulate each other's expression and initiate cardiomyogenesis in P19 cells. *J. Biol. Chem* 1998; 273; 34904-34910.

Skerjanc I. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9; 139-143.

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106 (15); 1913-1918.

Strauer B, Komowski R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107 (7); 929-934.

Tang J, Xie Q, Pan G, Wang J, Wang M. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *Cardio thoracic Surg* 2006; 30; 353-361.

Tarkowski AK. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. *Nature* 1959, 184: 1286-1287.

Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim EJ, Sakai T, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100; 247-256.

Tropel P, Noel D, Platet N. Isolation and characterisation of MSC from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295; 395-406.

Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shadduck RK, Waheed A, Hata J-I. Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis *in vivo*. *J Cell Physiol* 1992; 151; 197-205.

Urbanek K, Cesselli D, Rota M, Nascimbene A, De AA, Hosoda T. Stem cell niches in the adult mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (24); 9226-9231.

Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De AA, Nurzynska D, Silvestri F. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (24); 8692-8697.

Vandervelde S, van Luyn MJ, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39; 363-376.

Wakitani S, Saito T, Caplan A. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-Azacytidine. *Muscle and Nerve* 1995; 18; 1417-26.

Ward MR, Steward DJ, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007; 70(7); 983-998.

Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, Pallante B, Zheng J, Chazen JL, Chin A, Duignan I, Nahirney P, Rafii S, Mikawa T, Edelberg JM. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res*. 2004; 94(5); E39-45.

Xu X, Xu Z, Xu Y, Cui G. Selective down-regulation of extracellular matrix gene expression by bone marrow derived stem cell transplantation into infarcted myocardium. *Circ J* 2005; 69(10); 1275-1283.

Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U, Tanaka T, Sugimura K, Kinoshita M, Hattori F, Fukami S, Shimazaki T, Ogawa S, Okano H, Fukuda K. Transient inhibition of the BMP signaling by noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol*. 2005; 23(5); 607-611.

Zhang H, Bradley A. Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/ chorion and cardiac development. *Development* 1996; 122; 2977-2986.

LebenslaufPersönliche Daten:

Name: Annika Kristina Köster

Geburtsdatum: 13.12.1983

Geburtsort: Stuttgart

Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/1990- 04/1992 Grundschule Spitalhof, Leonberg

05/1992- 07/2002 Waldorfschule am Kräherwald, Stuttgart

Universitätsausbildung:

Seit 10/2002 Studium der Medizin an der Eberhard Karls- Universität Tübingen

09/ 2004 Ärztliche Vorprüfung

09/2006- 03/2007 Auslandsemester in Alcalá de Henares, Spanien

12.05.2009 Abschluss des Studiums

2011 Dissertation

Berufliche Ausbildung:

Seit 07/ 2009 Assistenzärztin Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Klinikum am Steinberg Reutlingen