

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin, Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

Lokalisierung Islet-1-positiver Zellen im erwachsenen murinen Herz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Dennis Mehrkens
aus Reinbek

Hamburg 2015

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 24.07.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Thomas Eschenhagen

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Karsten Sydow

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid,</i> Desoxyribonukleinsäure
DSMO	Dimethylsulfoxid
ES	Embryonale Stammzellen
GFP	<i>Green fluorescent protein,</i> Grün fluoreszierendes Protein
HE	Hämatoxylin und Eosin
ICD	Implantable cardioverter-defibrillator, Implantierbarer Kardioverter-Defibrillator
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
M	mol/l
Mg²⁺	Magnesium
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid,</i> Boten-Ribonukleinsäure
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction,</i> Polymerase-Kettenreaktion
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	<i>Ribonucleic acid,</i> Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
β-Gal	β -Galactosidase

1	Einleitung	1
1.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie	1
1.1.3	Therapie	2
1.2	Bieten neue Erkenntnisse zur Regeneration des Herzens einen Ausgangspunkt einer kausalen Zelltherapie der Herzinsuffizienz?	3
1.2.1	Allgemeine Charakteristika möglicher Stammzellen am Beispiel des Herzens	6
1.2.2	Ergebnisse aktuell bereits durchgeführter Studien zur Zelltherapie des Herzens beim Menschen	7
1.3	Kandidatenpopulationen einer künftigen kardialen Zelltherapie und ihr mögliches therapeutisches Potential	8
1.3.1	C-kit-positive Zellen	9
1.3.2	Kardiosphären	10
1.3.3	„Side-population“ Zellen	11
1.3.4	Epikardiale Vorläuferzellen	12
1.3.5	Sca-1 positive Zellen	12
1.4	Transkriptionsfaktor Islet-1	13
1.4.1	Die Rolle von Islet-1 während der Embryogenese des Herzens	14
1.4.2	Islet-1 als möglicher Marker kardialer Vorläuferzellen im postnatalen und adulten Organismus	16
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Geräte	19
2.2	Materialien	20
2.3	Substanzen und Lösungen	20
2.3.1	Liste der Primärantikörper	23
2.3.2	Liste der Sekundärantikörper	24
2.3.3	Liste der verwendeten Primer	24
2.4	Versuchstiere und Genehmigungen	25
2.4.1	Isl-1-nLacZ transgene Mäuse	25
2.5	Histologische Methodik	25
2.5.1	Präparation muriner Herzen für Gewebeschnitte	25
2.5.2	Einbettung von Herzgewebe für Kryoschnitte	26
2.5.3	Einbettung von Herzgewebe für Paraffinschnitte	27
2.5.4	Anfertigung von Paraffinschnitten	28
2.6	Histologische Färbungen	28

2.6.1	Hämatoxylin und Eosin Färbung	28
2.6.2	X-Gal-Färbung.....	29
2.6.3	Acetylcholinesterase-Färbung.....	31
2.6.4	Masson-Goldner-Färbung	32
2.6.5	Siriusrot-Färbung mit Pikrinsäure	32
2.6.6	Immunhistochemie	32
2.6.7	Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning Mikroskopie	33
2.7	Zellkultur	34
2.7.1	Primärkultur glatter Muskelzellen	34
2.7.2	Isolation von Zellen des Sinusknotens	34
2.8	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.8.1	Genotypisierung der isl1-nLacZ transgenen Mäuse.....	37
2.8.2	Gewinnung muriner mRNA	38
2.8.3	RNA Extraktion.....	39
2.8.4	Reverse Transkription	40
2.8.5	Klassische RT-PCR.....	41
2.9	Präparation des humanen Sinusknotens	42
2.10	Herzinfarkt-Modell.....	43
3	Resultate	44
3.1	Nachweis nLacZ ⁺ Zellen im adulten Herzen	44
3.2	Verifizierung des Signals der nukleären β -Galactosidase durch immunhistochemische Anfärbung des Islet-1 Proteins.....	46
3.3	Nachweis von nLacZ ⁺ Zellen in posterior des Herzens gelegenen Regionen.....	47
3.3.1	Charakterisierung der posterior gelegenen nLacZ ⁺ Zellen in der Immunfluoreszenz	48
3.3.2	Nachweis von Acetylcholinesterase in posterior gelegenen nLacZ ⁺ Zellen.....	49
3.3.3	Der Nachweis von Cholinacetyltransferase in nLacZ ⁺ Zellen zur Identifikation parasymphischer kardialer Ganglien	50
3.4	Charakterisierung nLacZ ⁺ Zellen im Bereich des Ausflusstrakts	52
3.4.1	Immunfluoreszenz nLacZ ⁺ Zellen im Ausflusstrakt gegen smooth muscle α -actin.....	53
3.4.2	Auswachskultur X-Gal ⁺ Zellen des Ausflusstraktes.....	54
3.4.3	Immunfluoreszenz einzelner kultivierte nLacZ ⁺ Zellen des Ausflusstraktes gegen smooth muscle α -actin.....	56
3.4.4	Charakterisierung isolierter nLacZ ⁺ Zellen des Ausflusstraktes gegen smooth muscle myosin heavy chain	58
3.4.5	Einzelne nLacZ ⁺ Zellen im Myokard des Ausflusstrakts	59

3.5 Charakterisierung nLacZ ⁺ Zellen im Einflussbereich des rechten Herzens.....	63
3.5.1 Isolation und morphologische Charakterisierung nLacZ ⁺ Zellen	67
3.6 Islet-1 Expression im murinen und im menschlichen Herzen.....	69
3.7 Expression von Islet-1 im Infarktmodell der adulten Maus	71
4 Diskussion	74
4.1 Anmerkungen zum verwendeten Modell des Nachweis von Islet-1	74
4.2 Lokalisierung und Charakterisierung von Islet-1+ Zellen im adulten Herzen	77
4.2.1 Islet-1 wird in parasymphatischen kardialen Ganglien exprimiert.....	77
4.2.2 Islet-1 wird in glatten Muskelzellen des proximalen Ausflusstraktes exprimiert.....	78
4.3 Islet-1 ⁺ als molekularer Marker einer Schrittmacherzellpopulation des Sinusknotens	80
4.4 Handelt es sich bei Islet-1 um einen Marker kardialer Vorläuferzellen im adulten murinen Herzen?.....	83
5 Ausblick	86
6 Zusammenfassung.....	87
7 Summary.....	88
8 Literaturverzeichnis	89
9 Veröffentlichungen.....	96
9.1 Originalarbeiten	96
9.2 Kongressbeiträge	96
10 Danksagung.....	97
11 Lebenslauf	98
12 Eidesstaatliche Versicherung	99

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

1.1.1 Epidemiologie

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems stellen weltweit die häufigste Todesursache dar (Lozano et al. 2012). In Deutschland sind, trotz eines zuletzt leichten Rückgangs, kardiovaskuläre Erkrankungen für ca. 40% der Todesfälle verantwortlich (Statistisches Bundesamt 2013). Häufige Ursachen sind die chronisch ischämische Herzerkrankung (8,3%), der akute Myokardinfarkt (6,1%) und die Herzinsuffizienz (5,3%). Hierbei ist die Herzinsuffizienz häufig eine Folge des Myokardinfarkts und stellt insgesamt vornehmlich eine Erkrankung des älteren Menschen (92% >65 Jahre) dar. 2011 war die Diagnose Herzinsuffizienz mit 380.000 Fällen der häufigste Grund für eine stationäre Aufnahme (Statistisches Bundesamt 2013). Stewart (2003) prognostizierte eine weitere Zunahme der Erkrankungen aufgrund der steigenden Lebenserwartung moderner Gesellschaften für die nächsten Jahrzehnte. Neuere Daten zeigen jedoch bezüglich der Neuerkrankungen ein Plateau auf hohem Niveau (Bui et al. 2011). Gründe hierfür könnten eine bessere frühzeitige Behandlung und gesundheitliche Aufklärung sein, so dass sich der Zeitpunkt der klinischen Manifestation der Herzinsuffizienz in das höhere Lebensalter verlagert (Bui et al. 2011). Jedoch gilt noch immer, dass die Diagnose einer Herzinsuffizienz für den Patienten mit einer, den meisten Krebserkrankungen vergleichbar, schlechten Prognose verknüpft ist (Jhund et al. 2009; Chen et al. 2013).

1.1.2 Pathophysiologie

Zu unterscheiden ist gemäß aktueller Klassifikation die systolische Herzinsuffizienz und die Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Funktion (McMurray et al. 2012). Die systolische Herzinsuffizienz basiert in der Mehrzahl der Fälle auf einer koronaren Herzerkrankung, arterieller Hypertonie oder dem Myokardinfarkt, der zu einem erheblichen Verlust an vitalem Herzmuskelgewebe führt und bei dem bis zu 3 Milliarden Herzmuskelzellen zu Grunde gehen (Bui et al. 2011; Laflamme and Murry

Einleitung

2011). Daneben tragen vor allem die Erkrankungen des Klappenapparats, Myokarditiden, kardiale Myopathien sowie kardiotoxische Nebenwirkungen von Arzneimitteln zur Pathogenese der Herzinsuffizienz bei. Die gemeinsame Folge der Schädigung des Myokards ist eine verminderte Pumpleistung und damit eine Abnahme des Blutdrucks. Zur Wiederherstellung der Pumpfunktion und der Durchblutung peripherer Organe werden kompensatorisch neuroendokrine Systeme aktiviert. So kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und einer gesteigerten Sympathikusaktivität. Diese Mechanismen bewirken initial eine Steigerung des Herzzeitvolumens. Im weiteren Verlauf führt die chronische Aktivierung jedoch zu vermehrtem kardialen Stress des verbliebenen Myokards. In der Folge kommt es somit zu weiterem Zelluntergang (Eschenhagen 2008).

Bei Patienten mit einer systolischen Herzinsuffizienz kommt es aufgrund einer nicht ausreichenden Pumpfunktion des Herzens bei normalem enddiastolischen Druck zu einer mangelnden Hämoperfusion der peripheren Organe. Es treten zum einen Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention auf. Zum anderen lassen sich klinische Zeichen, u. a. ein erhöhter Jugularvenenpuls, Rasselgeräusche über der Lunge und eine Verlagerung des Herzspitzenstoßes als Ausdruck einer gestörten kardialen Funktion finden (Davie 1997). Klinisch eingeteilt wird die Herzinsuffizienz anhand des Leitsymptoms Dyspnoe in die Stadien I-IV nach NYHA (New York Heart Association). Seit 2005 gibt es eine weitere, ergänzende Klassifikation der Herzinsuffizienz vom American College of Cardiology. Diese gewinnt zunehmend an Bedeutung und erfasst erstmals Patienten, die noch keine Herzinsuffizienz zeigen, aber ein hohes Risiko aufweisen eine solche zu entwickeln (Hunt et al. 2005).

1.1.3 Therapie

Im Zentrum der Behandlung der Herzinsuffizienz steht die medikamentöse Therapie. Aktuell werden β -Blocker, ACE-Hemmer, Aldosteron-Antagonisten und Diuretika, gemäß den Empfehlungen nationaler und internationaler Leitlinien in der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt. Mit Ausnahme der Diuretika konnte in Studien für β -Blocker (CAPRICORN, MERIT-HF), ACE-Hemmer (SOLVD, CONSENSUS) und Aldosteron-Antagonisten (RALES, EPHESUS) gezeigt

Einleitung

werden, dass durch diese Medikamente die Mortalität von Patienten mit einer Herzinsuffizienz gesenkt werden kann (McMurray et al. 2012). Bei besonderen Patientengruppen kann zusätzlich zur Pharmakotherapie durch Einsatz implantierbarer Systeme, wie ICDs (implantable cardioverter-defibrillator) und CRT-Systeme (cardiac resynchronisation therapy), durch chirurgische Revaskularisation oder durch ein ventrikuläres Unterstützungssystem, die Rate der Hospitalisierungen und die Mortalität gesenkt werden (McMurray et al. 2012). Viele andere, zunächst erfolversprechende Pharmakotherapieansätze der Herzinsuffizienz, wie z. B. Phosphodiesterase-Hemmer, Endothelinrezeptor-Antagonisten, Vasopetidase-Inhibitoren und Vasopressin-Antagonisten, konnten die mit ihnen verknüpften Erwartungen nicht erfüllen (Liu et al. 2013).

Die einzige kurative Therapie stellt bislang die Herztransplantation dar. Der Einsatz linksventrikulärer Unterstützungssysteme kann in Einzelfällen die Zeit bis zur Transplantation überbrücken, jedoch führen diese Systeme zu neuen Risiken (z. B. erhöhtes Thromboserisiko, Infektionsgefahr und gastrointestinale Blutungen). Vor allem durch die stark eingeschränkte Verfügbarkeit von Spenderorganen ist die Herztransplantation jedoch nur für wenige Patienten zugänglich.

1.2 Bieten neue Erkenntnisse zur Regeneration des Herzens einen Ausgangspunkt einer kausalen Zelltherapie der Herzinsuffizienz?

Die epidemiologischen Daten machen deutlich, dass weiterhin ein großer Bedarf an neuen Therapiestrategien besteht. In der letzten Dekade gab es einige bedeutende Erkenntnisse hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit des Herzens. Galt das menschliche Herz zuvor als postmitotisch, zum Wachstum nur durch Hypertrophie fähig, so ist dieses Dogma gefallen (Beltrami et al. 2001; Bergmann et al. 2009). Bergmann et al. (2009) nutzten die bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts durchgeführten Kernwaffentests, um zu untersuchen, ob im erwachsenen Herzen Kardiomyozyten neu gebildet werden. Die begrenzte Zeitspanne der oberflächlich durchgeführten Tests führte zu einem rapiden Anstieg und nach deren weltweiten Verbot zu einem ebenso schnellen Abfall der Konzentration von ^{14}C -Isotopen in der Atmosphäre. Innerhalb dieses Zeitfensters kam es so zu einer Verschiebung der Zusammensetzung der eingebauten Kohlenstoffisotope in allen proliferierenden

Einleitung

Zellen. So war es Bergmann et al. möglich aus Herzproben von Patienten, die vor, während und nach dieser Testphase geboren wurden, zu kalkulieren mit welcher Rate die Isotope in die DNA der Herzzellen eingebaut wurden und auf das Alter der Zellen im Herzen rückzuschließen. Die Proben wurden dabei aufwändig bezüglich ihrer DNA-Menge auf diploide Zellen normiert, um einen Einfluss durch die Bildung polyplorder Kerne auszuräumen, die eine irrtümlich hohe Teilungsaktivität vortäuschen könnten. Wenig überraschend war zunächst das Ergebnis, dass die Gesamt-DNA der Nuklei der Nicht-Kardiomyozyten jünger datiert wurde als das zugehörige Patientenalter. Sehr viel erstaunlicher war die Entdeckung, dass die DNA der isolierten Nuklei von Kardiomyozyten ebenfalls jünger war. Bergmann et al. berechneten hieraus, dass altersabhängig pro Jahr beim jüngeren Menschen durchschnittlich 1% der Herzmuskelzellen erneuert werden. Beim älteren Menschen sinkt diese Quote auf ca. 0,45%. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass mit Erreichen des 50. Lebensjahrs ca. 45% der Herzmuskelzellen neu gebildet worden sind (Bergmann et al. 2009).

Eine weitere bedeutende Studie, die zum Ziel hatte die Proliferation von Kardiomyozyten *in vivo* zu untersuchen und gleichzeitig Hinweise für den Ursprung möglicher neu gebildeter Kardiomyozyten zu finden, war die Arbeit von Hsieh et al. (2007). Hierzu wurde ein doppelt transgenes Mausmodell benutzt, bei dem unter dem Kardiomyozyten-spezifischen Promotor *Myh6* eine Tamoxifen abhängige Cre-Rekombinase die *loxP*-flankierte Stopp-Sequenz ausschneidet. Hierdurch kommt es nach Tamoxifen-Injektion zum Wechsel einer zuvor konstitutiv exprimierten β -Galactosidase (β -Gal⁺) hin zu einer Expression von Grün-Fluoreszierenden Proteinen (GFP: *green fluorescent protein* (GFP⁺)) („Blau-zu-Grün-Wechsel“) im Herzen. Initial sind 100% der Kardiomyozyten β -Gal⁺. Nach Tamoxifen-Injektion kam es bei 80% der Zellen zu einer Expression von GFP. Es verblieben jedoch 20% der Kardiomyozyten weiterhin β -Gal⁺, da der Wechsel der Expression nicht in allen Kardiomyozyten erfolgreich war.

Entscheidend für das Modell war, dass mögliche kardiale Vorläuferzellen ebenfalls β -Gal⁺ verblieben. Die Neubildung von Kardiomyozyten aus einer Vorläuferzellpopulation im Beobachtungszeitraum würde somit zu einer Änderung des Verhältnisses von GFP⁺ Kardiomyozyten und GFP⁻ Kardiomyozyten führen. Während der einjährigen Beobachtungszeit änderte sich dieses Verhältnis von 80:20

Einleitung

jedoch nicht. Die Autoren ziehen den Schluss, dass zumindest für den Beobachtungszeitraum von einem Jahr keine signifikante Neubildung von Kardiomyozyten durch kardiale Vorläuferzellen stattfindet. (Abb. 1 Pfad: Normaler Alterungsprozess)

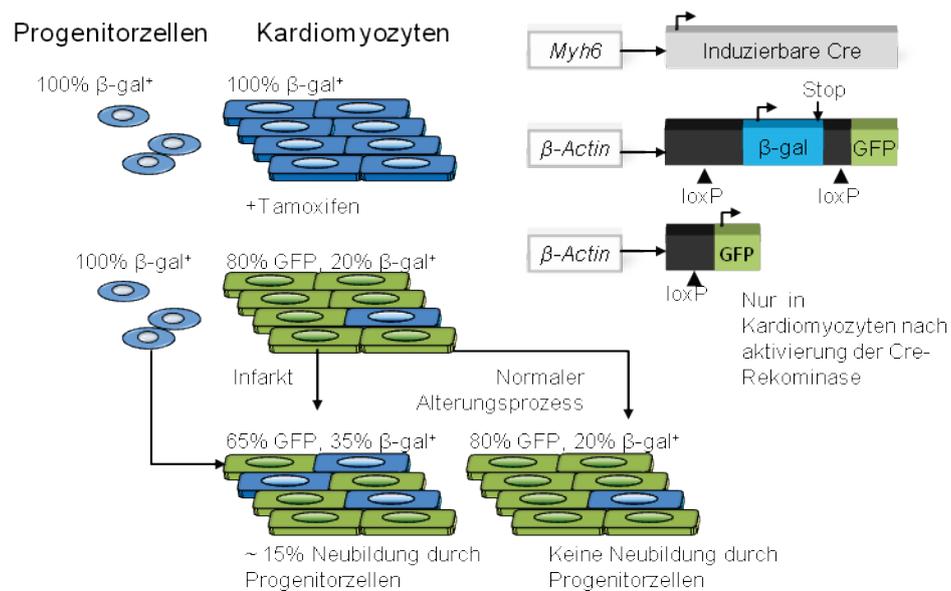


Abb. 1: Genetisches Verfolgungsmodell der Herzregeneration in der Maus. Schematisch gezeigt ist hier die Generierung des doppelt-transgenen Mausmodells, bei dem unter dem Kardiomyozyten spezifischem Promotor *Myh6* eine Tamoxifen abhängige Cre-Rekombinase die loxP-flankierte Stopp-Sequenz ausschneidet. Hierdurch kam es zum Wechsel der konstitutiv exprimierten β -Galactosidase (β -Gal⁺) hin zur einer GFP-Expression (GFP⁺) im Herzen. Nach Tamoxifen-Injektion wurden 80% der Kardiomyozyten GFP⁺, 20% der Kardiomyozyten blieben β -Gal⁺. Während der 1-jährigen Beobachtungszeit änderte sich dieses Verhältnis von 80:20 nicht. Im Infarkt-Modell hingegen verschob sich das Verhältnis von GFP⁺ zu β -Gal⁺ in der Periinfarktregion von 80:20 zu 65:35 (modifiziert nach Laflamme und Murry 2011, Lizenznummer: 3534801243627).

In einem zweiten Ansatz untersuchte die Gruppe um Hsieh et al. (2007) eine Versuchsgruppe von Mäusen, bei denen nach Markierung der Kardiomyozyten ein Infarkt induziert wurde. Ziel war es zu untersuchen, ob eine Ischämie des Myokards die Neubildung von Kardiomyozyten induziert. Überraschenderweise verschob sich das Verhältnis von GFP⁺ zu β -Gal⁺ in der Periinfarktregion von 80:20 zu 65:35, was auf eine Neubildung von Kardiomyozyten aus einer undifferenzierten Vorläuferzellpopulation hinweist.

Einleitung

In der Zusammenschau ergeben sich somit zunehmend robuste und reproduzierbare Daten für eine geringe basale Neubildung von Kardiomyozyten. Die Quelle für diese neu gebildeten Kardiomyozyten ist weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen und zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt.

Unterstrichen wird diese Kontroverse durch eine aktuelle Arbeit aus derselben Arbeitsgruppe, welche die genetischen Verfolgungsexperimente durchführte. In dieser Studie zeigen Senyo et al. (2013), dass für die Neubildung von Kardiomyozyten im untersuchten Infarktmodell entgegen der vorherigen Ergebnisse präexistente Kardiomyozyten verantwortlich sind. Sie benutzten hierfür eine aufwändige Massenspektroskopie, die es erlaubte, die Konzentration stabiler nicht radioaktiver Marker-Isotope (N^{15}) über mehrere Zellgenerationen in einzelnen Zellkompartimenten zu verfolgen. Die Autoren konnten so für die normal alternde Maus eine jährliche Teilungsrate der existierenden Kardiomyozyten von 0,76%, die mit fortschreitendem Alter abnimmt, zeigen (Senyo et al. 2013). Übereinstimmend zeigt sich somit eine sehr geringe Neubildung im gesunden Herzen. Als Quelle kommen mögliche Vorläuferzellpopulationen als auch proliferierende Kardiomyozyten in Frage.

Nur wenige Arbeiten, vor allem der Arbeitsgruppe um Piero Anversa, zeigen eine deutlich größere Fähigkeit zur Neubildung von Kardiomyozyten. Die Mehrzahl der Studien weisen speziesübergreifend auf eine vorhandene, aber geringe basale Neubildungsrate adulter Kardiomyozyten hin (Soonpaa and Field 1998; Garbern and Lee 2013).

1.2.1 Allgemeine Charakteristika möglicher Stammzellen am Beispiel des Herzens

Stammzellen werden in embryonale und adulte Stammzellen unterteilt. Hauptcharakteristika adulter Stammzellen sind die Fähigkeiten, sich *in vivo* unter physiologischen Bedingungen selbst zu erneuern und die Bildung von Tochterzellen der verschiedenen Zelltypen des Ursprungsorgans (Snippert and Clevers 2011).

Im Herzen handelt es sich hierbei um atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten, Zellen des Erregungsleitungssystems, glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Snippert und Clevers (2011) unterscheiden bei der Beschreibung adulter Stammzellen Zellen, die

Einleitung

in vivo eine Stammzellfunktion (*actual stemness*) anzeigen von Zellen mit einem prinzipiellen Stammzellpotenzial (*stemness potential*). Tatsächliche Stammzellen tragen demnach zur Zellerneuerung *in vivo* und unter physiologischen oder pathologischen Bedingungen bei, wohingegen Zellen mit einem Stammzellpotenzial diese Fähigkeit, z. B. *in vitro* oder nach Transplantationsversuchen, erwerben (Snippert and Clevers 2011).

Technische und ethische Limitierungen, insbesondere beim Menschen, führen dazu, dass mutmaßliche Stammzellen häufig anhand weiterer weicher Charakteristika adulter Stammzellen beschrieben werden müssen. Es handelt sich dabei meist um die Untersuchung der Fähigkeit zur Differenzierung nach Transplantation und/oder Ko-Kulturversuche mit neonatalen Kardiomyozyten oder Fibroblasten, die ein proliferatives Milieu erzeugen sollen. Goldstandard der Untersuchung der Stammzellfunktion einer bestimmten Zellpopulation im Tiermodell ist jedoch die genetische Markierung und Verfolgung *in vivo* (Snippert and Clevers 2011).

1.2.2 Ergebnisse aktuell bereits durchgeführter Studien zur Zelltherapie des Herzens beim Menschen

Es wurde eine Vielzahl verschiedener Populationen hauptsächlich extrakardialer Zellen postuliert, denen ein Stammzellpotenzial und die Fähigkeit zur kardialen Transdifferenzierung oder Stimulation der kardialen Zellneubildung zugeschrieben wurde. Diese Populationen werden häufig anhand der Expression bestimmter Markerproteine beschrieben. Mit Hilfe dieser ist es möglich, die Zellen zu isolieren und *in vitro* ihre Eigenschaften zu untersuchen. Keiner dieser Marker ist jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt eindeutig spezifisch für eine der beschriebenen Populationen. Stattdessen handelt es sich häufig um ein Gemisch einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen, unter denen Stammzellen vermutet werden (Laflamme and Murry 2011). Ebenfalls ist in den meisten Fällen die Funktion innerhalb des physiologischen Umfelds nicht aufgeklärt (Reinecke et al. 2008).

Trotz des oftmals fehlenden biologischen Kontextes sind bereits eine große Zahl klinischer Studien, vor allem mit Knochenmarkszellen zur Therapie des Herzens, vornehmlich nach einem Myokardinfarkt, durchgeführt worden (Clifford et al. 2012). Eine zusammenfassende Bewertung durch eine Meta-Analyse von Studien, in denen Knochenmarkszellen eingesetzt wurden, zeigte moderate positive Effekte der

Einleitung

linksventrikulären Ejektionsfraktion, die als Surrogatparameter der Herzfunktion fungierte (Clifford et al. 2012). Die Autoren der Meta-Analyse betonen allerdings die sehr große Heterogenität der verglichenen Studien. Eine erst kürzlich publizierte Arbeit beschreibt ausführlich Diskrepanzen, Fehlinterpretationen und Mehrfachveröffentlichungen von Ergebnissen und stellt die Ergebnisse der Knochenmarks-basierten Stammzelltherapie explizit in Frage (Francis et al. 2013). In diesem Zusammenhang ist darüber hinaus völlig unklar, wie bei der geringen Zahl der applizierten Zellen im Vergleich der zu ersetzenden Zahl an Herzmuskelzellen, die beobachteten Effekten erzeugt wurden (Hong and Bolli 2014). Als mögliche Ursache der moderat positiven Effekte werden u. a. mögliche parakrine Effekte auf kardiale Vorläuferzellen oder Kardiomyozyten, sowie Inflammations-vermittelte Effekte diskutiert (Garbern and Lee 2013).

1.3 Kandidatenpopulationen einer künftigen kardialen Zelltherapie und ihr mögliches therapeutisches Potential

Die Tatsache, dass in den letzten Jahren vermehrt Hinweise für das Vorhandensein einer wenn auch niedrige Neubildungsrate von Kardiomyozyten gefunden wurden, verbunden mit den weiterhin unbefriedigenden Erfolgen in der bisherigen Therapie der Herzinsuffizienz, hat immense Erwartungen geweckt. Dies gilt insbesondere für die Möglichkeit der Stimulation oder Isolation endogener Vorläuferzellen zur kausalen Therapie der Herzinsuffizienz. In (Abb. 2) ist hierzu eine Übersicht der verschiedenen aktuell diskutierten Populationen dargestellt, die im folgenden Abschnitt dargestellt werden.

Einleitung

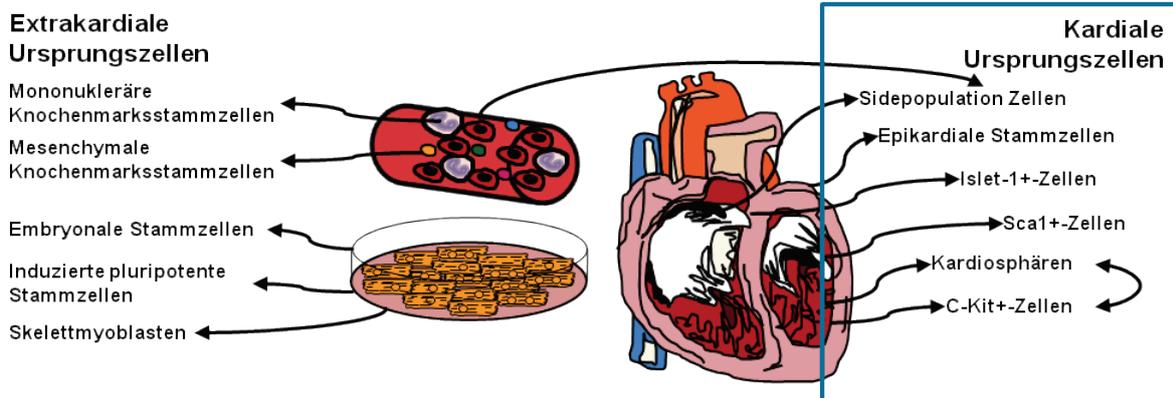


Abb. 2: Übersicht möglicher Kandidaten einer Zelltherapie des Herzens. Gezeigt sind Zellpopulationen, die für eine zellbasierte Therapie des kranken Herzens aktuell diskutiert werden. Unterteilt werden mögliche extra-kardiale und kardiale Quellen.

1.3.1 C-kit-positive Zellen

Die ersten beschriebenen intrakardialen Progenitorzellen exprimierten an ihrer Oberfläche den Stammzellfaktor-Rezeptor CD117 (c-kit) sowie Sca-1 und waren negativ für weitere Marker hämatopoetischer Stammzellen (HSCs) (Beltrami et al. 2001). Bei c-kit handelt es sich um ein Tyrosinkinase-Rezeptor-Protein, das als Marker für HSCs etabliert ist. Es kann aber ebenso in Thymusepithelien, Cajal-Zellen, Prostata-Stammzellen, Kardiomyozyten und unreifen Endothelzellen gefunden werden (Laflamme and Murry 2011). Für die Entwicklung des Herzens konnte gezeigt werden, dass während der Embryonalentwicklung c-kit+-Zellen im Herzen von Mäusen gefunden werden können und diese Zellen Nkx2.5 als frühen Marker kardialer Differenzierung exprimieren (Tallini et al. 2009). Daten aus dem neonatalen Mauserzen identifizieren eine Population c-kit+ Zellen, die in vitro zu Zellen mit kardialem Phänotyp differenzieren (Tallini et al. 2009). Arbeiten der Gruppe von P. Anversa zeigen, dass murine und humane aus dem Herzen isolierte c-kit+ Zellen Herzmuskelgewebe erneuern können, wenn sie im Infarktmodell transplantiert werden (Beltrami et al. 2003). Ellison et al. (2013) zeigen in einem Modell des diffusen kardialen Schadens durch Isoprenalin-Injektion die suffiziente Wiederherstellung der Myokardfunktion durch c-kit+ Zellen. Wurden diese Population

Einleitung

hingegen abladiert, kam es zu keiner Regeneration des Myokards (Ellison et al. 2013).

Diesen sehr positiven Befunden gegenüber stehen jedoch die Ergebnisse einer Vielzahl anderer Arbeitsgruppen, die zwar feststellten, dass es in einem Infarktmodell der *neonatalen Maus* zu einer Zunahme c-kit⁺ Zellen im Infarktbereich kam, es sich aber in Untersuchungen der *adulten Maus* jedoch keine Hinweise einer Zunahme c-kit⁺-Zellen oder für eine Neubildung von Kardiomyozyten fanden (Jesty et al. 2012). Dies gilt gleichfalls für Untersuchungen zur kardialen Differenzierung *in vitro* und im Infarktmodell transplanteder c-kit⁺ Zellen der adulten Maus (Zaruba et al. 2010). Van Berlo et al. (2014) fanden als erste in einem genetischen Verfolgungsmodell endokardialer c-kit Zellen eine direkte Differenzierung zu neugebildeten Kardiomyozyten. Allerdings zu einem derart geringen Prozentsatz, dass dies für die myokardiale Zellerneuerung vermutlich ohne physiologische Relevanz ist (van Berlo et al. 2014).

Trotz der noch offenen Fragen bezüglich der Herkunft, Funktion und physiologischen Relevanz für kardiovaskuläre Erkrankungen, besonders im adulten Lebewesen, wird aktuell eine klinische Phase-I-Studie (SCIPIO) durchgeführt, bei der c-kit⁺ Zellen zur Therapie verwendet werden. Erste Ergebnisse der Studie mit 16 Patienten, die eine Zelltherapie erhielten, zeigen eine Verringerung der Größe der Infarkt Narbe und darüber hinaus eine moderate Zunahme der linksventrikulären Funktion (Bolli et al. 2011).

1.3.2 Kardiosphären

Kardiosphären sind heterogene spontan *in vitro* gebildete Zellgebilde. Innerhalb dieser bildet sich durch noch unbekannte Faktoren ein Stammzell-stimulierendes Milieu. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten Kardiosphären sowohl aus murinem, porcinem als auch aus humanem Herzgewebe generiert werden. Die Methode zur Isolierung wurde zuerst von der Arbeitsgruppe um Messina et al. (2004) beschrieben. Murine Kardiosphären wachsen nach der Isolation *in vitro* und zeigten spontane Kontraktionen. Im Gegensatz dazu kontrahierten Kardiosphären aus humanen Proben erst nach Kokultur mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (Messina et al. 2004). Untersuchungen mit dem Ziel, die aus Kardiosphären gewonnenen Zellen zu charakterisieren, zeigen, dass sie eine Vielzahl verschiedener Oberflächenproteine

Einleitung

exprimieren. Einige dieser Proteine, wie u. a. c-kit, Sca-1, CD34, und CD31 werden ebenfalls von anderen mutmaßlichen Vorläufer- und Stammzellen exprimiert (Smith et al. 2007). Befürworter sehen in der Bildung von Kardiosphären eine Zellnische zur Stimulation proliferierender Zellen und begründen so das besondere kardiogene Potential der aus Kardiosphären gewonnenen Zellen (Messina et al. 2004). Im Tiermodell durchgeführte Studien zeigten *in vitro* und *in vivo* eine Differenzierung zu neuen Kardiomyozyten nach der Transplantation sowie eine moderate Verbesserung der kardialen Funktion (Smith et al. 2007; Johnston et al. 2009; Lee et al. 2011). Insgesamt wird das kardiogene Potential von Kardiosphären allerdings kontrovers diskutiert. So gibt es keine Daten zur biologischen Funktion. Viele Experimente basieren auf Zellkultur- und Transplantationsversuchen, ohne dass eine vorhergehende genauere Charakterisierung der Zellen stattgefunden hat (Laflamme and Murry 2011). Eine Studie von Andersen et al. (2009) konnte zeigen, dass es sich bei den *in vitro* aus Kardiosphären differenzierten Kardiomyozyten um Zellen handelte, die durch Verunreinigungen in die Kultur gelangt sind. Es erscheint hiernach zumindest sehr unwahrscheinlich, dass die *in vivo* festgestellten Effekte auf einer direkten Transformierung der transplantierten Zellen beruhen. Wahrscheinlicher sind vielmehr parakrin-vermittelte Effekte (Andersen et al. 2009). Die einfache Gewinnung und die *in vivo* Daten präklinischer Studien mit aus Kardiosphären gewonnenen Zellen haben trotz dieser Bedenken zu einer ersten klinischen Phase-I-Studie (CADUCEUS) zur Zelltherapie nach Infarkt geführt. Erste Ergebnisse zeigen nach 6 Monaten Verfolgungszeitraum zwar eine Verringerung der Infarktgröße, jedoch keine Verbesserung der bedeutenderen funktionellen Parameter, wie des endsystolischen Volumens, des enddiastolischen Volumens oder der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Makkar et al. 2012).

1.3.3 „Side-population“ Zellen

„Side-population“ Zellen (SP) sind durch ihre Fähigkeit charakterisiert, den Farbstoff Hoechst 33342 via eines ATP-bindenden-Kassetten-Transporter ABCG2 auszuschleusen. Die Zellen können dadurch im FACS als Side-Population Zellen sortiert werden. SP wurden in verschiedenen adulten Geweben gefunden, u.a. im Skelettmuskel und Knochenmark (Zhou et al. 2001). Insgesamt handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, von der für eine Subpopulation im Nagetiermodell mit dem Expressionsmuster Sca-1⁺, CD34⁺, CD31⁻ und CD45⁻ gezeigt werden

Einleitung

konnte, dass diese Zellen *in vitro* zu Zellen mit einer Expression kardialer Marker differenzierten (Pfister et al. 2005). Hinweise für ein Potential der Selbsterneuerung gaben Studien, die die Expression verschiedener Zellzyklus regulierender Proteine in SP-Zellen messen konnten (Martin et al. 2004). Insgesamt sind die vorhandenen Daten jedoch begrenzt.

1.3.4 Epikardiale Vorläuferzellen

Epikardiale Vorläuferzellen entstammen vermutlich aus einer Population aus der Region des Proepikardialen Organs (Zhou et al. 2008). Während der Embryogenese wandern sie in das Myokard ein und differenzieren dort in glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Ob epikardiale Vorläuferzellen jedoch zur Bildung des Myokards beitragen ist umstritten. Es konnten zwei Populationen epikardialer Vorläuferzellen identifiziert werden, die anhand der wechselseitigen Expression von *Wilms tumor* (Wt1) und dem Transkriptionsfaktor *T-box 18* unterschieden werden (Cai et al. 2008; Zhou et al. 2008). Für beide Populationen konnte gezeigt werden, dass sie zur Bildung der Vorhöfe, dem ventrikulären Septum und der Ventrikel beitragen und zu Kardiomyozyten differenzieren (Cai et al. 2008; Zhou et al. 2008). Darüber hinaus zeigte die Studie von Smart et al. (2011), in einem Infarktmodell der Maus, dass ausgehend von epikardialen Wt1⁺ Zellen nach einer Vorbehandlung des Herzens durch Tymosin-β4-Injektion, neue Wt⁺ Kardiomyozyten entstanden. Weiterhin berichteten Smart et al. (2011), dass sich die linksventrikuläre Funktion der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Vorbehandlung mit TB4 verbesserte. Daten anderer zeigen jedoch, dass die Ergebnisse der Abstammungsstudien diskussionswürdig sind, da eine Expression von Tbx18 und Wt1 bereits unabhängig von der proepikardialen Expression in Kardiomyozyten stattfindet und so keine sichere Aussage über die genetische Abstammung der Kardiomyozyten getroffen werden kann (Christoffels et al. 2009; Rudat and Kispert 2012).

1.3.5 Sca-1 positive Zellen

Das „*stem cell antigen-1*“ (Sca-1) ist ein murines Oberflächenprotein, das häufig zur Identifizierung und Anreicherung hämatopoetischer Stammzellen verwendet wird. Es wird ebenfalls genutzt, um in Kombination mit anderen Stammzellmarkern, wie c-kit, CD43 und CD45, Vorläuferzellen des murinen Herzens zu isolieren. Daneben wurden Sca-1-positive Zellen entdeckt, die zusätzlich CD31 aber keine weiteren

Einleitung

Stammzellmarker exprimierten. Dies könnte auf eine mögliche Sca-1⁺ und CD31⁺ endotheliale Vorläuferzellreihe hinweisen. Diese Zellen zeigten *in vitro* eine frühe Expression kardialer Transkriptionsfaktoren und nach *in vitro* Stimulation mit 5-Azacythidin wiesen sie Differenzierungsmerkmale eines kardialen Phänotyps auf. Durch Stimulation mit Oxytozin differenzierten sie *in vitro* zu schlagenden Kardiomyozyten (Matsuura et al. 2004). Die Verwendung von Sca-1 als Stammzellmarker des menschlichen Herzens ist jedoch limitiert, da kein humanes Ortholog gefunden werden konnte.

1.4 Transkriptionsfaktor Islet-1

Islet-1 (Isl1) ist ein Transkriptionsfaktor, der zunächst in seiner Rolle als Bindeprotein des Insulin-Enhancer-Gens in den β -Zellen des Pankreas beschrieben wurde (Karlsson et al. 1990). Islet-1 gehört zur Superfamilie der LIM-Homöodomäne-Proteine. Als Vertreter einer der Untergruppen enthält Islet-1 zwei tandemartig angeordnete LIM-Domänen und eine zentrale Homöodomäne (HD). Die Funktion der HD ist die spezifische DNA-Bindung des Proteins über ein Helix-Schleife-Helix Motiv. Die LIM-Domänen sind amino-terminal gelegene, cystein-histidinreiche, doppelte Zinkfingerstrukturen, die über vielfältige Komplexbildung mit anderen Proteindomänen interagieren können. „LIM“ steht hierbei für die Transkriptionsfaktoren Lin11, Islet-1 und Mec3, bei denen diese Domäne als erstes beschrieben wurde (Li et al. 2012). Für die Rolle von Islet-1 bei der embryonalen Entwicklung von Motoneuronen wurde z.B. die Interaktion einer c-terminalen Region mit der LIM-Domäne von Lhx3, einem weiteren LIM-Protein beschrieben (Thor et al. 1999). Weitere Daten zeigen, dass Islet-1 als Regulator der endokrinen Zellen (α , β , γ , pp) des Pankreas fungieren kann und eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der Insel-Zellen des Pankreas ausübt (Du et al. 2009). Darüber hinaus zeigt eine Studie Islet-1 in der Rolle eines Regulator-Proteins, das für die Proliferation und den Erhalt der Insel-Zellen des adulten Pankreas verantwortlich ist (Guo et al. 2011). Neben dem Pankreas spielt Islet-1 eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Motoneuronen (Pfaff et al. 1996). Außerdem wird Islet-1 bei adulten Mäusen in ganglionären Zellen der Retina, der Schilddrüse, der Hypophyse, im Di-/Telencephalon und distalen Tubuluszellen der Niere exprimiert (Dong et al. 1991; Elshatory et al. 2007).

1.4.1 Die Rolle von Islet-1 während der Embryogenese des Herzens

Während der Embryonalentwicklung ist das Herz das erste Organ, welches seine Arbeit im Sinne der adulten Funktion aufnimmt. Mesodermale Zellen wandern entlang des Primitivstreifens bis unterhalb der Anlage der Kiemenbögen. Von dort aus verlassen sie den Primitivstreifen und bewegen sich nach vorne-seitlich, beidseits der Mittellinie und bilden zwei Zellcluster. Die Auswanderung der Zellen wird durch *Mesp1* als ersten Marker des kardialen Mesoderms getriggert (Saga et al. 1999). Die zwei Zellcluster breiten sich als nächstes transversal über die Mittellinie hinaus aus und bilden eine halbmondförmige kardiogene Platte, die *cardiac crescent*. Es folgt die Fusion dieser Zellhaufen und die Bildung zweier Endokardschläuche, die im Bereich unterhalb der ersten Kiemenbögen zu einem tubulären Schlauch fusionieren. Es kommt zur Bildung eines primitiven, sich kontrahierenden Ventrikels. In einem nächsten Schritt entsteht in diesem Bereich zum einen durch regional unterschiedliches Wachstum und zum anderen durch die räumliche Begrenzung des sich in der Zwischenzeit bildenden Perikards die Form des Herzens mit vier Kammern (Buckingham et al. 2005).

Es konnte durch Untersuchungen im Mausmodell gezeigt werden, dass die Entwicklung des Herzens vom primitiven Ventrikel zum 4-kammerigen adulten Organ zeitlich versetzt abläuft (Meilhac 2003). So wurde eine Vorläuferzellpopulation identifiziert, die posterior und anterior des kardiogenen Mesoderms lokalisiert ist. Diese Population unterteilt das kardiale Mesoderm in ein erstes und zweites Herzfeld. Zellen aus dem Bereich des erstens Herzfeldes bilden das Herzrohr und den größten Teil des späteren linken Ventrikels. Die Zellen aus dem zweiten Herzfeld migrieren bereits zum Zeitpunkt frühester kardialer Stadien in Regionen des rechten Ventrikels, des Ausflusstraktes und in die Vorhofregion, wo sie maßgeblich zur Bildung der dortigen Herzstrukturen beitragen (Laugwitz et al. 2008). Darüber hinaus sind Vorläuferzellen der kardialen Neuralleiste und des proepikardialen Organs an der Formung des Herzens beteiligt (Brade et al. 2013).

Einleitung

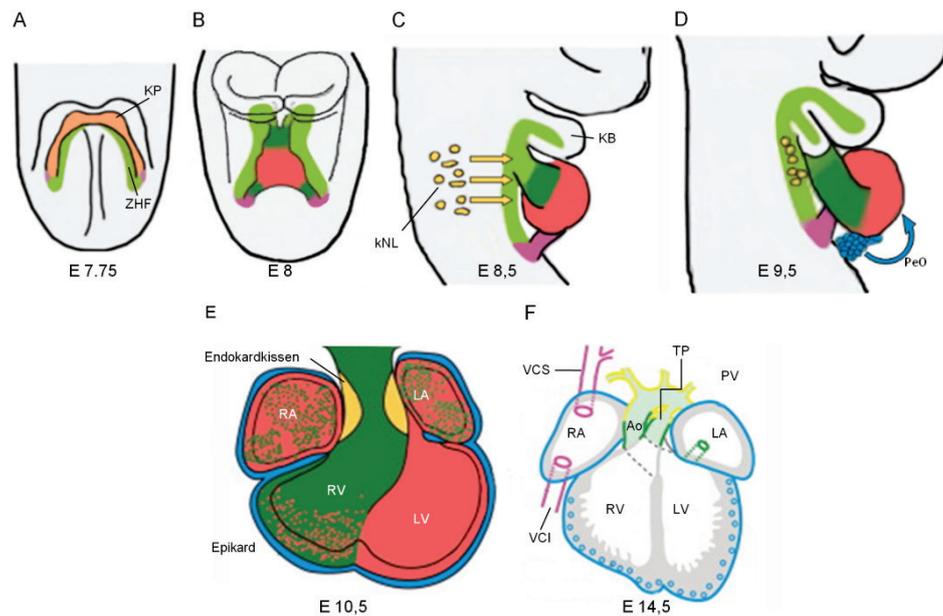


Abb. 3: Übersicht der Herzentwicklung in der Maus und Unterteilung in ein erstes und zweites Herzfeld. (A) Formierung der kardialen Platte (KP) und des medial gelegenen zweiten Herzfeldes (ZHF). (C) und (D) Seitansichten des Herzens während der Rechtsdrehung und Schlaufenbildung mit dem Beginn der Einwanderung von Zellen aus der kardialen Neuralleiste (kNL) und des Proepikardialen Organs (PeO). (E) zeigt das Herz mit seinen ausgebildeten vier Kompartimenten. (F) Das ausgereifte Herz nach abgeschlossener Septierung des Ausflusstraktes. Das erste Herzfeld und seine Anteile sind in rot gezeigt. Die unterschiedlichen Anteile des zweiten Herzfeldes sind in dunkelgrün (Myokard) und hellgrün (vaskuläre Endothelzellen) dargestellt. In gelb gezeigt sind die von Zellen der kardialen Neuralleiste gebildeten Anteile und in blau dargestellt das vom proepikardialen Organ gebildete Epikard. Violett abgebildet ist der durch vaskuläre Vorläuferzellen gebildete Anteil der Gefäße. Ao: Aorta, RA: Rechtes Atrium, LA: Linkes Atrium, RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel, KP: Kardiogene Platte, kNLZ: Zellen der kardialen Neuralleiste, PV: Pulmonalvene, TP: Truncus Pulmonalis, VCS: Vena Cava superior, VCI: Vena Cava inferior (modifiziert nach Vincent und Buckingham 2010, Lizenznummer: 3534810098323).

Die Bedeutung von *Islet-1* für die embryonale Entwicklung des Herzens wurde durch Untersuchungen an *Islet-1*-defizienten (*Isl1*^{-/-}) Mäusen erkannt. *Islet-1*-null-Mutanten zeigen einen letalen Entwicklungsdefekt des Herzens. Es fehlen der rechte Ventrikel, der Ausflusstrakt, Teile des linken Ventrikels sowie große Teile der Vorhöfe. Die Tiere versterben bereits um den Embryonaltag (ED) 10,5 *in utero* (Cai et al. 2003) (Abb. 4).

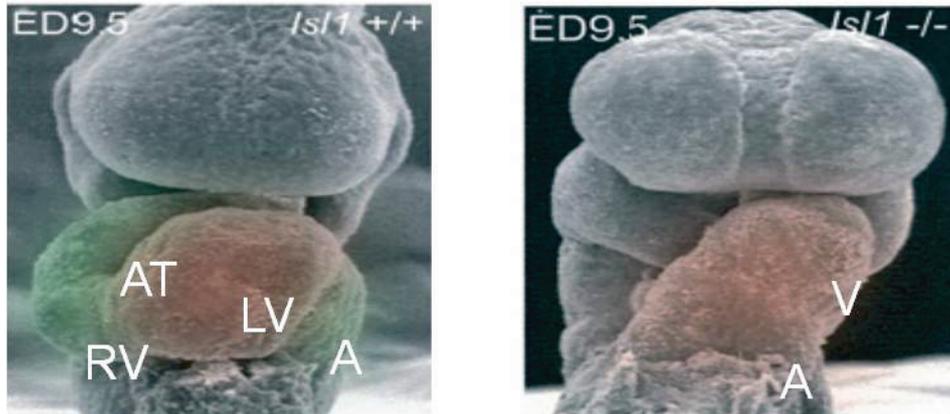


Abb. 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Wildtyp- und Is1-knock-out-Embryonen ED 9,5. Im Gegensatz zu der Aufnahme des Wildtypembryonen (links), bei dem die Herzentwicklung zum Zeitpunkt der Aufnahme normal verläuft, zeigt die rechte Aufnahme der *isl1*-defizienten Maus ein Fehlen des rechten Ventrikels, des Ausflusstrakts sowie Teile der Vorhöfe. Die vom ersten Herzfeld abstammenden Anteile sind rot, die vom zweiten Herzfeld abstammenden Anteile sind grün dargestellt. A: Atria, AT: Ausflusstrakt, LV: Linker Ventrikel, RV: Rechter Ventrikel, V: Ventrikel (Moretti et al. 2007).

Cai et al. (2003) konnten zeigen, dass es sich bei den *Islet-1*-positiven (*Islet-1*⁺) Zellen des zweiten Herzfeldes um undifferenzierte Vorläuferzellen handelt, die in die kardiogene Region einwandern, und dass die Expression von *Islet-1* mit zunehmender Differenzierung der Zellen herunter reguliert wird. Die Proliferationsfähigkeit dieser Zellen ist entscheidend von der Expression von *Islet-1* abhängig (Cai et al. 2003). In einigen Teilen des Herzens jedoch persistiert die Expression von *Islet-1* (Sun et al. 2007). Diese Zellen befinden sich in Regionen, die aus Zellen des zweiten Herzfeldes hervorgegangen sind. So findet sich *Islet-1* am ED 8,5 noch in Zellen des rechten Vorhofs und Ventrikels, des Ausflusstraktes und der Aorta. In neonatalen Mäusen ist nach dem dritten postnatalen Tag eine starke Expression nur noch in kardialen Ganglien vorhanden, wohingegen an der Aortenbasis und im Sinusknoten *Islet-1* nur noch gering exprimiert wird (Sun et al. 2007).

1.4.2 *Islet-1* als möglicher Marker kardialer Vorläuferzellen im postnatalen und adulten Organismus

Islet-1 nimmt in der Gruppe der möglichen Markerproteine residenter kardialer Vorläuferzellen insofern eine besondere Stellung ein, als dass es, wie zuvor beschrieben, nachweislich in der Embryogenese eine funktionelle Rolle für die

Einleitung

Proliferation und Entwicklung des Herzens besitzt (Cai et al. 2003). Durch genetische Verfolgungsexperimente konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zellen des Herzens einer embryonalen Islet-1⁺ Zellpopulation entstammt, und deren Zellen *in vivo* proliferieren und zu allen drei Zelltypen des Herzens differenzieren können (Cai et al. 2003). Weitere Untersuchungen zur Expression von Islet-1 ergaben, dass mit fortschreitender Differenzierung der Vorläuferzellen die Expression von Islet-1 herunter reguliert wurde (Cai et al. 2003) und somit eine Korrelation zwischen Proliferationspotential und Islet-1 Expression besteht. Laugwitz et al. (2005) konnten undifferenzierte Islet-1⁺ Zellen aus wenigen Tage alten Mäusen isolieren. Sie konnten beobachten, dass diese Zellen in Ko-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten zu Zellen mit einem Phänotyp ähnlich dem reifer Herzmuskelzellen differenzierten (Laugwitz et al. 2005). In einer Arbeit von Moretti et al. (2006) konnten weiterhin kardiale Vorläuferzellen sowohl aus Mausembryonen als auch aus embryonalen Stammzellen, anhand der Expression von Islet-1, Nkx2.5 und Flk1 identifiziert sowie isoliert werden. Klonale Analysen zeigten, dass eine einzige Islet-1⁺ Zelle sich zu allen drei kardialen Zelltypen differenzieren kann.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Islet-1⁺ wurde zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit als Marker für adulte kardiale Progenitorzellen diskutiert. Islet-1⁺-Zellen könnten somit zur autologen Stammzelltransplantation und Zelltherapie des chronisch kranken Herzens dienen. Bisherige Zelltherapieansätze mit Knochenmarkszell-basierten Ansätzen oder anderen extrakardialen Zellen haben keinen substantiellen Therapieerfolg zeigen können. Aufgrund der Fähigkeit embryonaler Islet-1⁺-Zellen, sich in Kardiomyozyten und weitere kardiale Zelltypen differenzieren zu können, galten diese Zellen als vielversprechende Quelle einer autologen Stammzelltherapie oder als Ansatzpunkt einer pharmakologischen Stimulation. Es war jedoch aktuell unklar, ob es Islet-1⁺ Zellen tatsächlich im erwachsenen Herz gibt und inwiefern diese Stammzeleigenschaften besitzen. Studien zu Islet-1 an adulten Tieren sind limitiert durch die vermutlich nur geringe Anzahl postnatal noch vorhandener Islet-1 exprimierender Zellen, die auf nur wenige hundert Zellen pro Herz geschätzt wird. Des Weiteren fehlt es an einer genauen anatomischen Lokalisation, Zuordnung und Charakterisierung möglicher Islet-1⁺ Zellen im adulten Herzen. Der Klärung dieser

Einleitung

Fragen obliegt es, ob adulte Islet-1⁺ Zellen Kandidaten für eine mögliche Zelltherapie sein können. Diese Arbeit hatte daher die Untersuchung der folgenden Fragestellungen zum Ziel:

1. Aufklärung der Existenz Islet-1⁺Zellen in der adulten Maus
2. Untersuchung der anatomischen Lokalisation Islet-1⁺ Zellen in der adulten Maus
3. Charakterisierung des genauen Zelltyps Islet-1⁺ Zellen im adulten Herz.
4. Untersuchung der Expression von Islet-1 in einem Myokardinfarkt-Modell der Maus

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Automatische Gewebeeinfiltration TP 1020	Leica
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss
Kamera, AxioCam HR	Zeiss
Kamera, AxioCam MR5	Zeiss
Kryostat Leica Cm-3050S	Leica
Laserscanning Mikroskop LSM 510 META	Zeiss
NanodropTM ND-1000	Thermo Fisher Scientific Inc.
Paraffinausgießstation, Leica EG1150 H	Leica
qPCR- System ABI Prism 7900 HT	Applied Biosystems
Rotationsmikrotom, Leica RM2125 RTS	Leica
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Stereomikroskop SV6	Zeiss
Axiovert 25	Zeiss

2.2 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
High-Capacity cDNA RT-Kit	Applied Biosystems
Chirurgisches Besteck:	
Cooper Schere	
chirurgische Pinzette	
Mikrofeder-Schere	
Einwegklingen Typ 819	Leica
Omnifix Insulinspritze 1 ml	B. Braun
Punktionskanüle 27G	Becton Dickinson GmbH
Spritze	Becton Dickinson GmbH
μ -Dish ^{35mm, high} , beschichtet	Ibidi
Venofix Safety	B. Braun
μ -Dish ^{50mm, low} , beschichtet	Ibidi

2.3 Substanzen und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Acetylthiocholin-Iodid	Sigma-Aldrich
Agarose, 2% (PBS)	Invitrogen, Life Technologies
Aqua ad injectabilia (bidestilliert, deionisiert, pyrogenfrei)	Baxter
Ascorbinsäure	Merck
Bovines Serumalbumin	SIGMA Cooperation

Butansäure	
Calciumchloridhexahydrat	Sigma-Aldrich
DAB-Chromogen aus Ventana® ultraView Universal DAB Detection Kit, enthält 3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Ventana Roche
DAB-H2O2 aus Ventana® ultraView Universal DAB Detection Kit, enthält 0,04% Wasserstoffperoxid	Ventana Roche
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco, Life Technologies
DRAQ5	Biostatus limited
DreamTaq	Fermentas
Essigsäure, 100%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Eukitt®	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies
Fluoromount-G™	Southern Biotech
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Hematoxylin II Counterstain	Ventana Roche
Heparin 10.000 IE	
HEPES	
Iso-OMPA	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumeisencyanid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck

Material und Methoden

Kaliumhydroxid	Merck
Kollagenase Typ II (340 U/ml)	Worthington
Kupfer-II-Sulfat Pentahydrat	Merck
Liberase TH	Roche Applied Science
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Paraformaldehyd, PFA	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100X)	Gibco, life technologies
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco, life technologies
Roti-Histofix	Roth
Roti-Histol	Roth
Salzsäure	Merck
Säurefuchsin	Merck
Taurin	Merck
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
TRIzol®	Life technologies

2.3.1 Liste der Primärantikörper

Antikörper/ Zielprotein	Spezies	Antikörperbezeichnung	Hersteller	Verdünnung
α-Actinin	Maus	Mouse monoclonal anti- α -actinin (sarcomeric), A7811	Sigma-Aldrich	1:800
Choline acetyltransferase (ChAT)	Ziege	Anti-Choline acetyltransferase Antibody, AB144P	Chemicon	1:100
Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4 (HCN4)	Kaninchen	Anti-HCN4, APC-052	Alamone labs	1:100
Islet-1	Kaninchen	Anti-Islet 1 antibody - Neural Stem Cell Marker	Abcam	1:50
Smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC)	Kaninchen	anti-Myosin IgG, Smooth Muscle, BT-652	Biomedical Technologies, Inc.	1:100
α-Smooth muscle actin (α-SMA)	Maus	Human α -Smooth Muscle Actin MAb (Clone 1A4), MAB1420	R&D Systems	1:800

2.3.2 Liste der Sekundärantikörper

Zielprotein	Antikörperbezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Maus-IgG	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Antibody, A 11017	Molecular Probes, Life Technologies	1:800
Kaninchen-IgG	Alexa 488® Rabbit Anti-Goat, A 11034	Molecular Probes, Life Technologies	1:800
Ziege-IgG	Alexa Fluor 488® Goat Anti-Rabbit IgG, A 11034	Molecular Probes, Life Technologies	1:800

2.3.3 Liste der verwendeten Primer

Gen-symbol	Bezeichnung	NM Nummer	Primer	PPG*
ISL1	Isl1-genotyp	NM_021459.4	Forw: ACTATTTGCCACCTAGC CACAGCA Rev: GACAGTATCGGCCTCA GGAA	550bp
ISL1	Isl1-murine	NM_021459	Forw: CCATGGTGGCTGCTAGTCCG G Rev: CGCTTCAGACTTCTTGA TAGAGGATGG	990bp
ISL1	Isl1-hum	NM_002202.2	Forw: TTACCAGCCACCTTGG AAA Rev: GGACTGGCTACCATGCT GTT	180bp

2.4 Versuchstiere und Genehmigungen

Die im Folgenden beschriebenen Tierversuche wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (BGV, Freie und Hansestadt Hamburg: 44/9).

2.4.1 Isl-1-nLacZ transgene Mäuse

Die Isl-1-nLacZ transgenen Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von S. Evans (UCSD, San Diego) generiert. Hierzu wurde das nLacZ-Konstrukt gezielt in das Exon 1 des Islet-1 Gens eingebracht. Die Untersuchungen wurden an heterozygoten Isl-1-nLacZ Mäusen (auf einem gemischten Blackswiss und C57BL/6J Hintergrund) durchgeführt. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Geschwistertiere. Die Tiere wurden im Tierstall des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf unter konventionellen Laborbedingungen (Temperatur 19 bis 21 °C, Luftfeuchtigkeit 50-60%, Standardkäfige und 12 Std. Tag-Nacht-Rhythmus) gehalten. Futter und Wasser standen den Tieren stets *ad libitum* zur Verfügung.

2.5 Histologische Methodik

2.5.1 Präparation muriner Herzen für Gewebeschnitte

Den Mäusen wurde 15 min vor dem Eingriff 100 IE Heparin intraperitoneal zur Antikoagulation injiziert. Anschließend wurden die Tiere in tiefer CO₂-Narkose durch zervikale Dislokation getötet und anschließend in Rückenlage fixiert sezirt. Nach Eröffnung des Abdomens und Ablösung der Leber vom Zwerchfell wurde die Thoraxhöhle von kaudal eröffnet und nach Durchtrennung der Rippen beidseits das Sternum nach kranial hochgeklappt und fixiert. Zunächst wurde der Perikardbeutel eröffnet und der rechte Ventrikel mit einer Venofix Safety® Kanüle punktiert. Anschließend wurde über eine zweite Kanüle der linke Ventrikel punktiert und mit der Perfusionsfixation begonnen. Hierzu wurden 10 ml 4%ige Formaldehydlösung linksventrikulär injiziert. Das überschüssige Volumen konnte über die zweite Kanüle abfließen. In einem zweiten Schritt wurden ebenfalls 10 ml 4%ige Formaldehydlösung in den rechten Ventrikel injiziert. Eine ausreichende

Material und Methoden

Verteilung ließ sich an dem schnellen und deutlichen Erblassen des Leberkolorits beobachten. Es folgte die chirurgische Entfernung der Lungen, etwaiger Thymusanteile und die vorsichtige Präparation des Ausflusstraktes des Herzens. Zur Entnahme des Herzens wurde großzügig die Vena Cava sup. und inf. belassen, die Aorta und der Truncus Pulmonalis im Abgangsbereich ihrer Gefäße durchtrennt und das Herz im Bereich der Lungenvenen proximal abgesetzt. Das Herz wurde nun in eine mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gefüllte Petrischale überführt und durch Kompression das noch im Ventrikel vorhandene Blut sowie überschüssiges Fixans ausgespült. Dies war notwendig, um eine überschießende Fixierung oder Artefakte in der histologischen Beurteilung zu vermeiden.

4% Formaldehydlösung:

4 g Paraformaldehyd in 100 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS); pH 7,4 bei 60 °C für 60 min unter Rühren vollständig lösen, nach Abkühlen pH-Wert 7,4 mit 0,1% NaOH einstellen; in Aliquote zu 2 ml bei -20 °C

PBS:

PBS Tablets (gibco[®], life technologies[™]), 2 Tabletten in 1000 ml Aqua bidest

2.5.2 Einbettung von Herzgewebe für Kryoschnitte

Die entnommenen Herzen wurden zunächst in ein Gefäß, das mit einer 1:1 Mischung aus Saccharose 30% und Tissue Tek[®] (Sakura) gefüllt war, transferiert. Anschließend wurde das Gefäß in eine Metallform umgeben von flüssigem Stickstoff gestellt. Es wurden sequenzielle Schnitte des gesamten Gewebes mit einer Stärke von 10 µm an einem Kryostat (Leica Cm-3050S) angefertigt und die Schnitte auf SuperFrost[®] Plus (Hecht-Assistent) aufgenommen.

30% Saccharoselösung: 30 g Saccharose in 100 ml PBS pH 7,4

1:1 Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound / Saccharose:	25 ml 30% Saccharose mit 25 ml Tissue-Tek [®] O.C.T [™] Compound mischen
--	--

2.5.3 Einbettung von Herzgewebe für Paraffinschnitte

Die Einbettung von Geweben in Paraffin ermöglicht es morphologisch sehr gut erhaltene, detaillierte Schnitte anzufertigen. Das Gewebe wurde bei 4 °C über Nacht in 4% Roti[®]-Histofix (Roth[®]) fixiert. Für die Einbettung des Gewebes in das wasserunlösliche Paraffin mussten die Proben mit Hilfe einer Entwässerungsmaschine sequenziell (Protokoll Tab. 2.1) entwässert werden. In einem letzten Schritt wurden die präparierten Gewebe an einer Ausgießstation (Leica[®] EG1150H) in vorgewärmte Metallformen überführt. Hierzu wurde zunächst der Boden der Form mit flüssigem Paraffin bedeckt und anschließend das Gewebe exakt in der Form positioniert. Nun wurde ein Einbettring eingesetzt, der den späteren Stempel am Mikrotom darstellte und die komplette Form wurde mit Paraffin ausgefüllt. Zur Aushärtung des Paraffins wurden die Blöcke auf eine Kühlplatte gestellt (Leica[®] EG1150C) und konnten anschließend mehrere Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden.

Substanz	Zeit
Formalin	1,5 h
Ethanol 70%	1,5 h
Ethanol 80%	1,5 h
Ethanol 96%	1,5 h
Ethanol 100%	1 h
Ethanol 100%	1 h

Ethanol 100%	2 h
Xylol	1,5 h
Xylol	1,5 h
Paraffin (41 °C)	2 h
Paraffin (41 °C)	2 h

Tab. 2.1: Protokoll der Paraffineinbettung

2.5.4 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die Anfertigung der Schnitte wurden die Paraffinblöcke zunächst mit der Schnittfläche nach unten auf einer Kühlplatte bei -5 °C gekühlt und in ein Rotationsmikrotom (Leica[®] RM2125 RTS) eingespannt. Es wurden 4 µm dünne Schnitte angefertigt, die in ein 45 °C warmes Streckbad überführt wurden. In diesem dehnte sich das Paraffin aus. Damit war es möglich faltenfreie Schnitte auf SuperFrost[®] Plus-Objektträger (Hecht-Assistent) aufschwimmen zu lassen.

2.6 Histologische Färbungen

2.6.1 Hämatoxylin und Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Kombination zweier Einzelfärbungen. Hämatoxylin färbt, als basische Substanz, basophile Strukturen, wie z.B. DNA, blauviolett an. Eosin, als saure Substanz, färbt entsprechend azidophile Strukturen, z. B. Proteine des Zytoplasmas, rot an. Die Kryoschnitte wurden 10 min mit 4%iger Formaldehydlösung nachfixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Der Schritt der Hämalaunfärbung (Tab. 2.2) wurde extra kurz gehalten, um die nukleäre X-Gal-Färbung nicht zu überfärben. Es folgte die Entwässerung des Gewebes in einer aufsteigenden Ethanolreihe und abschließendem Xylolbad. Die gefärbten Schnitte wurden mit Eukitt[®] eingedeckelt. Die mikroskopische Darstellung erfolgte mit einem Axioplan-2 (Zeiss) in 0,5-, 10-, 20-, 40,- und 100-facher Vergrößerung und die Fotografien wurden mit einer Zeiss[®] AxioCam Kamera angefertigt.

Substanz	Funktion	Zeit
Hämalaunlösung*	Kernfärbung	30 s
Leitungswasser	Bläuen	10 min
Eosinlösung**	Zytosolfärbung	5 min
Aqua dest.	Spülvorgang	30 s
Aqua dest.		30 s
70% Ethanol		30 s
96% Ethanol		30 s
96% Ethanol	Entwässern	30 s
100% Ethanol		30 s
Roti-Histol® I	Klärung vor der Einbettung	5 min
Roti-Histol® II		5 min
Roti-Histokitt®	Einbettung	

Tab. 2.2: Protokoll der modifizierten HE-Färbung

***Hämalaunlösung nach Meyer:** 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua bidest. gelöst, 0,2 g NaIO₃ und 50 g KAl(SO₄)₂, 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure eingerührt

****Eosinlösung:** 0,5 g Eosin G in 500 ml Aqua bidest. gelöst

2.6.2 X-Gal-Färbung

Es handelt sich um eine Färbung, bei der durch Zugabe des Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) in Zellen mit einer aktiven Expression einer β-Galactosidase die Bildung eines Indigofarbstoffs katalysiert wird. Aufgrund der im verwendeten Mausmodell nukleären Lokalisation der β-Galaktosidase kommt es zu einer spezifische Blaufärbung des Zellkerns. Die

Material und Methoden

Herzen wurden durch die Injektion von jeweils 10 ml 4%iger Formaldehydlösung vorfixiert. Die Perfusions-Fixierung diente der leichten Fixierung des Gewebes unter Erhalt der β -Galactosidase-Aktivität. Diese nahm bei längerer Fixierung deutlich ab. Anschließend wurden die Herzen in PBS gewaschen und bei 37 °C für zwei Stunden lichtgeschützt in der X-Gal-Färbelösung inkubiert. Zur Herstellung der X-Gal-Färbelösung wurde folgendes Protokoll (Tab. 2.3) verwendet. Hierbei wurde das in DMSO gelöste X-Gal stets frisch hinzugefügt, während die restlichen Substanzen in Ansätzen zu jeweils 9,9 ml bei -20 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert wurden.

Nach der Färbung wurden die Organe zweimal 5 min in 4 °C PBS gewaschen und die Anfärbung fotografisch dokumentiert.

Zur Färbung von isolierten oder kultivierten Zellen wurde das Protokoll leicht modifiziert. Die Zellen wurden 10 min mit 0,05% Glutaraldehyd fixiert und über Nacht bei 4 °C mit X-Gal gefärbt. Die Ergebnisse der Färbungen wurden an einem Axiovert 25 oder einem Axioplan-2-Mikroskop fotografisch dokumentiert. Verwendet wurde hierfür die vorgesehene Axiovision Software (Zeiss).

Substanz	Volumen	Endkonzentration
100 mM Kaliumcyanidoferrat (II)	0,5 ml	5 mM
100 mM Kaliumhexacyanidoferrat (III)	0,5 ml	5 mM
1,0 M MgCl₂	0,5 ml	2 mM
10% Nonoxinol-NP40	20 μ l	0,02%
5% Natriumdesoxycholat	20 μ l	0,01%
1,0 M Tris pH=7,4	20 μ l	20 mM
10 x PBS	1 ml	1 x
Aqua bidest.	7,9 ml	
X-Gal in Pulverform, gelöst in DMSO (40mg/ml)	100 μ l	0,4 mg/ml

Tab. 2.3: Protokoll zur Herstellung der X-Gal-Färbelösung

2.6.3 Acetylcholinesterase-Färbung

Die Acetylcholinesterase-Färbung dient der Identifizierung der Zellen des Reiz-Leitungssystems. Für die Färbung nach El-Badawi und Schenk wird Acetylthiocholin-Iodid als Substrat der Acetylcholinesterase verwendet. Die Kryoschnitte wurden zunächst 10 min mit 4%iger Formaldehydlösung nachfixiert, mit PBS gewaschen, anschließend für zwei Stunden bei 37 °C mit der Acetylcholinesterase-Färbelösung (Protokoll Tab. 2.4) inkubiert. Es folgten ein erneuter Waschgang mit PBS und die Eindeckelung mit Fluoromount (Sigma-Aldrich).

Substanz	Masse/Konzentration	Verdünnung	Endvolumen
Acetylthiocholin-Iodid	25 mg		
Natriumacetat	60 mM	2,46 g in 10 ml 2 ml + 98 ml H ₂ O	31,6 ml
Essigsäure	0,6%	0,6 ml + 99 ml H ₂ O	1,0 ml
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	100 mM	2,94 g in 100 ml H ₂ O	2,4 ml
Kupfer-II-Sulfat Pentahydrat	30 mM	1,872 g in 25 ml H ₂ O 2,5 ml + 22,5 ml H ₂ O	5,0 ml
Tetraisopropylpyrophosphoramid	4 mM	13,694 µg in 10 ml H ₂ O	1,0 ml
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	5 mM	82,3 mg in 50 ml H ₂ O 2 ml + 18 ml H ₂ O	5,0 ml
Aqua bidest			4,0 ml

Tab. 2.4: Protokoll zur Herstellung von 50 ml Acetylcholinesterase-Färbelösung

2.6.4 Masson-Goldner-Färbung

Die Färbungen der humanen Paraffinschnitte wurden nach einem etablierten Protokoll von der *Core-Facility* des Instituts für Neuropathologie am UKE durchgeführt.

2.6.5 Siriusrot-Färbung mit Pikrinsäure

Zunächst erfolgte eine Kernfärbung nach Hämalaun (s. o.). Nach dem Bläuen in Leitungswasser für 10 min wurden die Schnitte 60 min in Siriusrot-Lösung* gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte kurz zweimal in 0,5% Essigsäure** gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 90%, 96%, 96%, 100%). Abschließend wurden die Schnitte für 5-10 min in Xylol getaucht und mit Eukitt® eingedeckelt. Die Siriusrot-Färbung färbt Bindegewebe rot und Muskulatur gelb an. Hiermit konnte das Infarktareal (rot) von gesundem Myokard (gelb) unterschieden werden.

***Siriusrot:** Siriusrot 0,5 g, gesättigte Pikrinsäure 500 ml

****0,5% Essigsäure:** 5 ml Eisessig in 1000 ml Aqua bidest.

2.6.6 Immunhistochemie

Die Technik der immunhistochemischen Anfärbung ermöglicht es spezifische Proteine sichtbar zu machen. Hierzu werden Primärantikörper gegen ein Zielprotein verwendet. Diese binden nach Zugabe an das Zielprotein. In einem zweiten Schritt werden Sekundärantikörper gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers verwendet. Der verwendete Primärantikörper war gegen Islet-1 gerichtet und die verwendeten Sekundärantikörper waren an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Durch Zugabe des nötigen Substrats (DAB bzw. H₂O₂, enthalten im *Ventana ultraView universal DAB Detection Kit*) wurde eine Farbreaktion katalysiert.

Die Etablierung des immunhistochemischen Nachweises von Islet-1 erfolgte durch die *Core-Facility* des Institutes für Neuropathologie am UKE. Für die immunhistochemische Anfärbung des Islet-1 Proteins wurden die optimalen

Material und Methoden

Reaktionsbedingungen zur Anfärbung zunächst im adulten murinen Pankreas etabliert. Verschiedene Antikörperlösungen sowie Verfahren zu einer Antigen-Demarkierung wurden getestet (Ventana Benchmark[®]). Letztlich stellte sich eine Verdünnung des Islet-1 Antikörpers von 1:50 und eine 60 min Vorbehandlung des Gewebes in EDTA-Puffer, pH 8,0 als beste Vorgehensweise heraus. Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Axioplan-2 Mikroskop (Zeiss).

2.6.7 Immunfluoreszenz und konfokale Laserscanning Mikroskopie

Immunfluoreszenzfärbungen wurden an Kryoschnitten (10 µm), Paraffinschnitten (4 µm) und an Einzel-Zellen durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden mit der oben beschriebenen Technik hergestellt (Kap. 0). Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 1 Stunde in einer Blocklösung* inkubiert, um die unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu minimieren. Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit PBS gewaschen und mit dem ersten Antikörper** über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift (3x15 min) mit PBS wurden die Gewebeschnitte für 1-2 Stunden mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Als Kernfarbstoff wurde DRAQ5 verwendet. Dann wurden die Gewebeschnitte erneut 3x15 min mit PBS gewaschen und mit Fluoromount eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss LSM 510 META System.

***Blocklösung:**

10% Ziegenserum, 1% BSA, 0,5% Triton X-100, Spatelspitze NaN₃

gelöst in 5 mM TBS pH 7,45

****Antikörperlösung:**

1% BSA, 0,5% Triton X-100, Spatelspitze NaN₃

gelöst in 5 mM TBS pH 7,45

2.7 Zellkultur

Die biologischen Arbeiten mit Zellkulturen wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 1 durchführt. Alle eingesetzten Gefäße, Flüssigkeiten, Medien und Arbeitsmaterialien wurden stets steril verwendet.

2.7.1 Primärkultur glatter Muskelzellen

Zur Präparation der Aorta ascendens und des Truncus pulmonalis wurde zunächst das Herz wie oben beschrieben präpariert. Anschließend wurden die Gefäße im Bereich der Transformationszone abgesetzt, longitudinal eröffnet und in 5-10 Stücke geschnitten. Diese wurden in 35 mm Zellkulturschalen überführt. Die Zellkulturschalen wurden kopfüber 3-4 Stunden in den Brutschrank (bei 37 °C, 5% CO₂) gestellt, sodass die Gewebestücke fest an der Kulturschale hafteten. Anschließend wurden sie behutsam mit 2 ml Zellkulturmedium* umspült und für weitere 5-7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach dem in Kap 2.6.2 beschriebenen Protokoll gefärbt.

***Zellkulturmedium:** DMEM, 10%, FCS und 1% Penicillin/Streptomycin

2.7.2 Isolation von Zellen des Sinusknotens

Die Isolation der Sinusknotenzellen erfolgte nach einem Protokoll von Mangoni und Nargeot (2001). Die Mäuse wurden narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Herzen wurden zügig entnommen und in eine Schale mit auf 35 °C erwärmte Tyrode-I-Lösung* platziert. Die Region des Sinusknotens ist ca. 1x1 mm groß. Diese Region wurde vorsichtig unter einem Stereomikroskop isoliert. Das Gewebe des benachbarten Vorhofs wurde vorsichtig entfernt. Das so gewonnene Gewebestück wurde in ein Reagenzglas mit 2,5 ml Low-Ca²⁺-low-Mg²⁺-Lösung** überführt. Anschließend erfolgte der Verdau. Hierfür wurde 70 µl Liberase-TH (5 mg/ml) sowie 10 µl CaCl₂-Lösung (100 mM) hinzugefügt. Die Inkubationszeit betrug je nach Größe des isolierten Gewebestücks 20-25 min. Als

Material und Methoden

Anhaltspunkt für einen ausreichenden Verdau wurde eine fibröse Konsistenz des Gewebestücks betrachtet. Das Gewebe wurde dann in ein Reagenzglas mit 2,5 ml Kraftbrühe überführt und für 2 min inkubiert. Danach wurde dieser Schritt 2x wiederholt, um das Gewebe anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aufzulösen und die einzelnen Zellen aus dem Gewebe zu isolieren. Hiernach ruhte die Zellsuspension für 4 min. Es folgte die Readaptation an eine physiologische Calcium-Konzentration durch schrittweise Zugabe von Lösung-6 und Tyrode-Lösung. In (Tab. 2.5) ist das genaue Protokoll des Verdaus aufgeführt.

Die vereinzelteten Zellen wurden in eine Zellkulturschale (50 mm, Ibidi) überführt und am Mikroskop fotografisch ausgewertet. Anschließend wurden sie fixiert und gefärbt. Die verwendeten Lösungen wurden, bis auf die Stammlösungen, stets frisch angesetzt.

Lösung		Volumen	Phase	Zeit
Low-Ca²⁺-low-Mg²⁺	Reagenzglas 1	2.5 ml		4 min
	Reagenzglas 2	2.5 ml	<i>Ruhephase</i>	2 min
Low-Ca²⁺-low-Mg²⁺ ad 70 µl Liberase TH (5 mg/ml) und 10 µl CaCl₂ (100 mM)	Reagenzglas 3	2.5 ml	<i>Verdau (ca. alle 5 min Aufschütteln des Gewebes mit Hilfe der Glaspipette)</i>	15-25 min
	<i>Transfer</i>			
	Reagenzglas 4	2.5 ml		2 min
	Reagenzglas 5	2.5 ml	<i>Auswaschen des Verdauungsenzyms</i>	2 min
	Reagenzglas 6	2.5 ml		2 min
	Reagenzglas 7	2.5 ml		5 min
<i>Dissoziation der Zellen</i>				1,5 min
Reagenzglas 7 ad:	Lösung-6	75 µl		4 min

Material und Methoden

Lösung-6	160 µl	<i>Adaptation an eine</i>	4 min
Tyrode + BSA	390 µl	<i>physiologische</i>	4 min
Tyrode + BSA	1,3 ml	<i>Elektrolytkonzentration</i>	4 min

Tab. 2.5: Protokoll des enzymatischen Verdaus zur Isolierung der Sinusknotenzellen

*modifizierte Tyrode-Stammlösung:	• NaCl	140 mM	(8,2 g/l)
	• KCl	5,4 mM	(0,4 g/l)
	• CaCl ₂	0,2 mM	(0,2 g/l)
	• MgCl ₂	1 mM	(0,3 g/l)

Frisch zur Stammlösung von 1 L hinzugefügt wurden bei einem 40 ml Ansatz:

• Glucose	5,5 mM	(495,44 mg)
• HEPES-NaOH	5 mM	(2,5 ml)

adjustiert mit NaOH pH=7,4

**Low-Ca²⁺-low-Mg²⁺-Stammlösung:	• NaCl	140 mM	(8,18 g/l)
	• KCl	5,4 mM	(0,4 g/l)
	• MgCl ₂	0,5 mM	(0,1 g/l)
	• CaCl ₂	0,2 mM	(0,03 g/l)
	• KH ₂ PO ₄	1,2 mM	(0,16 g/l)

Frisch zur Stammlösung von 1 L hinzugefügt wurden bei einem 40 ml Ansatz:

• Taurin	50 mM	(250,28 mg)
• Glucose	5,5 mM	(39,64 mg)

adjustiert mit NaOH pH=6,9

***Kraftbrühe-Stammlösung:	• KOH	80 mM	(4,49 g/l)
	• D-Butansäure	10 mM	(0,88 g/l)
	• KH ₂ PO ₄	10 mM	(1,36 g/l)

Frisch zur Stammlösung von 1 L hinzugefügt wurden bei einem 40 ml Ansatz:			
• Taurin	10 mM	(50,06 mg)	
• BSA	1 mg/ml	(40 mg)	
• HEPES-KOH	10 mM	(400 µl)	
adjustiert mit KOH pH=7,4			
****Lösung-6:	• NaCl	10 mM	(0,58 g/l)
	• CaCl ₂	1,8 mM	(0,26 g/l)

Tab. 2.6: Liste der verwendeten Lösungen zur Sinusknotenzell-Isolation

2.8 Molekularbiologische Methoden

2.8.1 Genotypisierung der isl1-nLacZ transgenen Mäuse

Zur Genotypisierung der transgenen heterozygoten isl-1-nLacZ Tiere wurde routinemäßig genomische DNA aus Schwanzspitzen 3 Wochen alter Tiere gewonnen. Hierzu wurde das *Extract-N-AMP Tissue PCR Kit* (Sigma-Aldrich) verwendet und die Isolierung gemäß den Herstellerangaben (Tab. 2.7) durchgeführt. Die DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder im Anschluss unter folgenden Bedingungen in einer Touchdown-PCR (Tab. 2.8) amplifiziert.

Komponenten	Volumen
Genomische DNA	4 µl
Vorwärtsprimer Isl1-nLacZ	0,2 µl
Rückwärtsprimer Isl1-nLacZ	0,2 µl
Aqua bidest.	5,6 µl
Extraktions-N-AMP	10 µl

Tab. 2.7: Pipettierschema für den PCR-Ansatz zur Genotypisierung

PCR-Abschnitt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94 °C	1x
Denaturierung	30 s	94 °C	
Primeranlagerung	30 s	60 °C (-0,5 °C Schritte)	11 Zyklen
Elongation	3 min	72 °C	
Denaturierung	30 s	94 °C	
Primeranlagerung	30 s	55 °C	22 Zyklen
Elongation	3 min	72 °C	
Finale Elongation	1 min	72 °C	1x
Kühlung	∞	4 °C	1x

Tab. 2.8: Temperatur-Zeit-Schema für die Reaktion der Islet-1 Touchdown-PCR

2.8.2 Gewinnung muriner mRNA

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Herzen zügig entnommen und in eine modifizierte Tyrode-Lösung* überführt. Die Lösung wurde kontinuierlich mit Carbogen (95% Sauerstoff, 5% Kohlenstoffmonoxid) über ein Schlauchsystem begast. Die Sinusknotenregion umfasst bei der Maus eine

Material und Methoden

ca. 1x1 mm große kommaförmige Struktur und wurde vorsichtig unter einem Stemi SV6 (Zeiss) isoliert. Hierfür wurde das Herz zunächst am atrioventrikulären Übergang durchtrennt und der rechte Vorhof isoliert. So konnten wir eine taktgebende Region im Übergang der Vena Cava superior zum rechten Vorhof identifizieren. Hierbei handelte es sich in der Regel um ein 1x1 mm großes Gewebestück. Charakteristisch waren stets die noch vorhandenen Kontraktionen des isolierten Gewebes. Die gewonnenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es wurden ebenfalls Proben vom rechten und linken Vorhof, sowie rechten und linken Ventrikel entnommen. Alle Proben wurden bis zur Aufbereitung bei -80 °C gelagert.

*Tyrodelösung:

• NaCl	119,8 mM	(6,95 g/l)
• KCl	5,4 mM	(0,4 g/l)
• CaCl ₂	0,2 mM	(0,03 g/l)
• MgCl ₂	1,05 mM	(0,2 g/l)
• NaHCO ₃	22,6 mM	(1,9 g/l)

Frisch zur Stammlösung von 1 L hinzugefügt wurden bei einem 200 ml Ansatz:

• Glucose	5,5 mM	(198 mg)
• NaH ₂ PO ₄	0,42 mM	(10,08 mg/l)
• HEPES-NaOH	5 mM	(1 ml)

adjustiert mit NaOH pH=7,4

Tab. 2.9: Zusammensetzung der Tyrodelösung zur mRNA-Isolation

2.8.3 RNA Extraktion

Zu den gewonnenen Gewebeproben wurde TRIzol® (life technologies) (10 µl/1 mg) in einem Tissue Lyser (Qiagen) zugesetzt und die Proben bei 30 Hz (ca. 1800 Oszillationen pro Minute) für 2 min homogenisiert und der Zellyse zugeführt. Anschließend wurde Chloroform (1/5 des TRIzol-Volumens) hinzugefügt und die Proben bei 4 °C für 3 min inkubiert. Zur Beschleunigung der Phasenaufftrennung

Material und Methoden

wurden die Proben (15 min bei 12.000 g und 4 °C, Mikrozentrifuge 5417R, Eppendorf) zentrifugiert. Die hydrophile RNA-haltige Phase wurde dann vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Die hydrophobe phenolische Phase wurde verworfen. Der Überstand wurde mit eisgekühltem Isopropanol (der Hälfte des TRIzol-Volumens) versetzt und nach erneutem kurzen Schütteln wiederum für 10 min inkubiert. Schließlich wurde die RNA gefällt (10 min, 4 °C, 12.000 g). Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 µl Ethanol (70%) pro 1 µl TRIzol-Volumen gewaschen. Wiederholt wurde das Gefäß kurz geschüttelt, um das Pellet vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 12.000 g) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 20 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem (DEPC) Wasser gelöst (10 min bei 60 °C) und im Anschluss zur Vermeidung von RNA-Ligationen auf Eis gestellt. Die RNA-Konzentration wurde fotometrisch mit dem Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

2.8.4 Reverse Transkription

Die nach dem Protokoll in Kap. 2.8.3 isolierte RNA wurde in einer Reverse Transkription in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben. Hierfür wurde das *High-Capacity cDNA RT-Kit* (Applied Biosystem) gemäß Herstellangaben verwendet. Eingesetzt wurden 200 ng RNA. Als Primer dienten *random* RT-Primer (Applied Biosystems®, aus High Capacity cDNA Reverse Transcription kit). Nach Durchführung der Reaktion lag die cDNA in 20 µl Reaktionsgemisch gelöst vor und wurde bei -20 °C gelagert.

Komponenten	Volumen
RT Puffer	2 µl
25x dNTPs	0,8 µl
10x <i>random</i> RT-Primer	2 µl
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	1 µl
RNase-Inhibitor	1 µl

cDNA	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	3,2 μ l
Master mix	10 μ l

Tab. 2.10: PCR-Ansatz zur Islet-1 mRNA Amplifikation

PCR-Abschnitt	Zeit	Temperatur
Initiation	10 min	25 °C
Reverse Transkription	120 min	37 °C
Denaturierung	5 min	85 °C
Kühlung	∞	4 °C

Tab. 2.11: Schema der reversen Transkriptase

2.8.5 Klassische RT-PCR

Mit Hilfe einer nicht-quantitativen RT-PCR wurde die aus muriner oder humaner RNA umgeschriebene cDNA mit unterschiedlichen Primern amplifiziert. Hierfür wurde das *Dream Taq System* (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die amplifizierte cDNA wurde über ein 1%iges Agarosegel separiert und die Größe der separierten Fragmente über einen Molekulargewichtsmarker (Gene Ruler 100 bp, Fermentas) bestimmt. Die Gelbilder wurden mittels BioRad (Syngene) elektronisch festgehalten. Die entsprechenden Primer finden sich in der Primerliste (Kap. 0).

Komponenten	Volumen
Puffer (inkl. Mg ²⁺)	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl
Isl-1forw (1:40)	2 µl
Isl1-rev (1:40)	2 µl
Glycerin 50%	4 µl
Nuklease-freies Wasser	6,5 µl
cDNA	1 µl
DreamTaq-Polymerase	0,5 µl

Tab. 2.12 Ansatz der klassischen PCR zum Nachweis von Islet-1 mRNA

PCR-Abschnitt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1x
Denaturierung	30 s	95 °C	
Primeranlagerung	55 S	61,5 °C	35 Zyklen
Elongation	7 min	72 °C	
Kühlung	∞	4 °C	1x

Tab. 2.13: Schema der klassischen PCR

2.9 Präparation des humanen Sinusknotens

Für den Nachweis von Islet-1 mRNA in der Region des humanen Sinusknotens konnten wir Proben in Anlehnung an eine Präparationsanleitung nach Hudson (1963) im Rahmen wissenschaftlicher Sektionen, 1 bis 3 Tage *post mortem*, gewinnen. In Abb. 5 ist die Technik schematisch dargestellt. Proben eines Herzens wurden unterschiedlichen Prozessierungen zugeführt, sodass zu jedem Sinusknoten sowohl histologische als auch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Hierbei handelte es sich um Paraffinschnitte, Kryoschnitte und die Isolierung von humaner mRNA (Siehe Primerliste Kap 2.3.3; Isl1-hum).

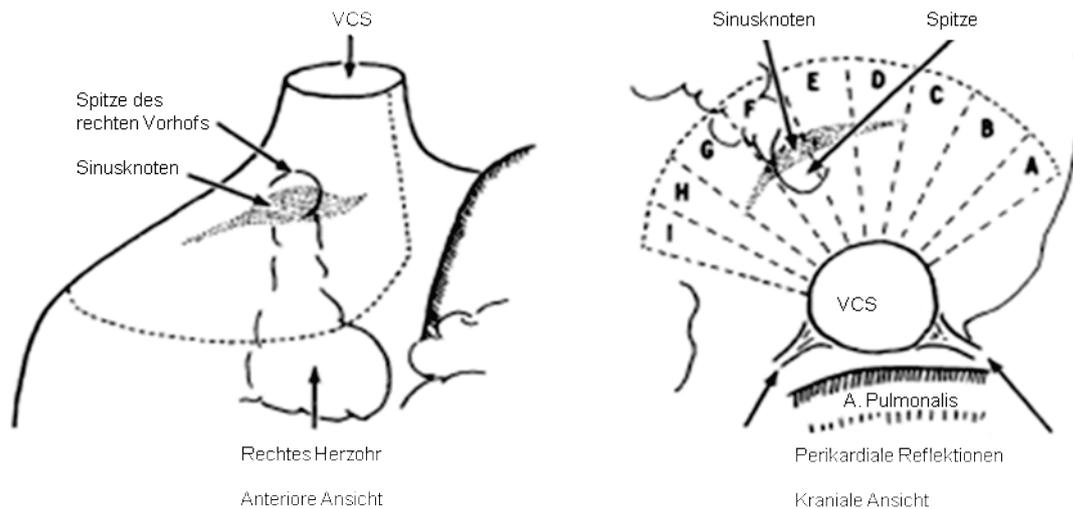


Abb. 5 Schema zur Präparation des humanen Sinusknoten. Gezeigt ist in (A) eine Frontalansicht und in (B) eine kraniale Ansicht der Präparation des humanen Sinusknotens. VCS: Vena Cava Superior (nach Hudson 1963).

2.10 Herzinfarkt-Modell

Die Infarkte an den transgenen Isl-1-nLacZ-Mäusen wurden im Labor von Prof. Dr. S. Schrepfer durchgeführt. Bei Mäusen im Alter von zehn Wochen wurde ein Myokardinfarkt durch eine Ligatur des *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) induziert. Hierzu wurden die Mäuse mit Isofluran (2%) in einer Induktionskammer narkotisiert. Die Tiere wurden während der Operation über eine in die Trachea gelegte Kanüle beatmet. Der Thorax und der Perikardbeutel wurden eröffnet und der RIVA proximal mit einem Prolene-Faden (8-0 Ethicon) ligiert. Anschließend wurde der Thorax wieder verschlossen. Die Tiere wurden jeweils bis zu den Zeitpunkten 2 Tage, 7 Tage, 14 Tage und 28 Tage bei freiem Wasser und Futter, *ad libitum* gehalten. Postoperativ erfolgte eine analgetische Behandlung mit Buprenorphin. Zu diesen Zeitpunkten wurden die Herzen entnommen, fixiert und X-Gal gefärbt. Es wurden von jedem Herzen (n = 13) Kryoschnitte (10 µm) angefertigt und diese auf die Expression von nLacZ in der Infarkt- und Periinfarktregion am Mikroskop untersucht. Zur Verifizierung des Infarktgebietes wurden weitere Siriusrot- und Masson-Goldner-Färbungen durchgeführt.

3 Resultate

3.1 Nachweis nLacZ⁺ Zellen im adulten Herzen

Der Nachweis nukleär lokalisierter Transkriptionsfaktoren mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz ist oft nicht ausreichend sensitiv, um das Zielprotein nachzuweisen. Deshalb wurde in dieser Studie ein Reportermausmodell verwendet. Durch Umsetzung des Substrats X-Gal durch eine nukleär lokalisierte β -Galactosidase kommt es zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Positive Zellen werden im weiteren Text als nLacZ⁺ beschrieben. Der Farbstoff fungiert somit als Reporter für die Islet-1 Expression. Die hohe Aktivität der β -Galactosidase ermöglicht eine hohe Sensitivität des Modells, und die nukleäre Lokalisation ermöglicht eine hohe Spezifität. Durch eine Färbung des gesamten Organs war es möglich, die nLacZ⁺ Regionen bereits makroskopisch zuzuordnen und diese nach Anfertigung von Gewebeschnitten gezielt weiter zu charakterisieren.

Für die Untersuchung der Lokalisation Islet-1⁺ Zellen in der adulten Maus wurden die Herzen heterozygoter Isl1-nLacZ Tiere im Alter von 4 Wochen bis 18 Monate X-Gal gefärbt. Zur Identifikation der nLacZ-Expression wurden die explantierten Herzen unter einem Stereo-Mikroskop untersucht. Bereits in der Übersichtsansicht konnte man nLacZ⁺ Regionen erkennen. Diese waren auf der Vorder- und Rückseite des Herzens durch eine bläuliche Anfärbung gekennzeichnet. Im Vergleich hierzu konnte in keiner Wildtyp-Kontrolle eine nLacZ⁺ Region identifiziert werden. Exemplarisch sind in Abb. 6 die Herzen einer Isl-1-nLacZ-Maus und einer Wildtyp-Kontrolle gezeigt. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt (1 bis 18 Monate; 1 Monatsabstände) waren stets dieselben drei Strukturen auf der Vorder- und Rückseite sowie im Einflussbereich des Herzens nLacZ⁺.

Resultate

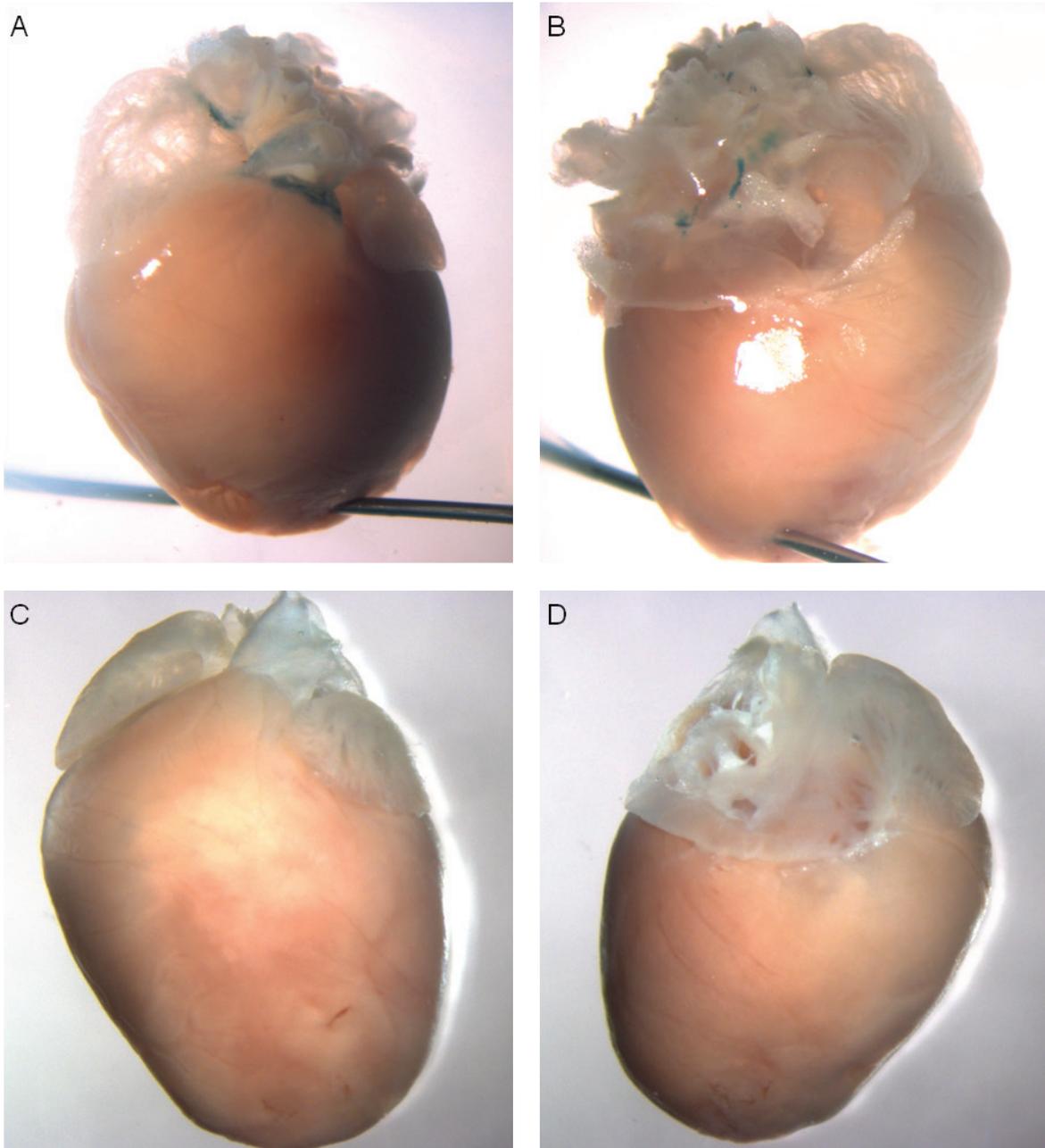


Abb. 6: Übersichtsaufnahmen explantierter muriner Herzen nach X-Gal-Färbung. (A) Vorder- und (B) Rückansicht eines X-Gal gefärbten Mauserzens einer Isl-1-nLacZ-Maus (Alter: 9 Monate). Deutlich erkennbar sind nLacZ⁺ Regionen. In (C) und (D) gezeigt sind jeweils korrespondierende Ansichten einer Wildtyp-Kontrolle (Alter: 5 Monate).

3.2 Verifizierung des Signals der nukleären β -Galactosidase durch immunhistochemische Anfärbung des Islet-1 Proteins

Entscheidend für den Einsatz von Reportermausmodellen ist eine hohe Sensitivität und Spezifität. So sollen möglichst alle Islet-1 exprimierenden Zellen nLacZ⁺ sein (Sensitivität). Andererseits sollen keine Islet-1 negativen Zellen nLacZ⁺ sein (Spezifität). Das Isl-1-nLacZ-Modell wurde von der Gruppe von S. Evans (UCSD, San Diego) diesbezüglich untersucht. Allerdings wurden diese Untersuchungen an embryonalen Tieren durchgeführt. Deshalb haben wir, trotz der bekannten Schwierigkeiten und der bereits erfolgten Validierung des Modells, den immunhistochemischen Nachweis des Islet-1 Proteins als notwendig erachtet. Die hierzu nötigen Schritte wurden von der Mauspathologie-Facility des UKE durchgeführt. Das adulte Pankreas fungierte hierbei als Positivkontrolle, da Islet-1 in den Langerhans-Zellen des Pankreas exprimiert wird. Die Abb. 7 zeigt zunächst den Nachweis von Islet-1 im adulten Pankreas durch die bräunlich gefärbten Nuklei der Langerhans-Zellen. Abb. 7 zeigt die Übereinstimmung der Expression von nLacZ und Islet-1. Es handelte sich bei den Gewebeschnitten um aufeinander folgende Schnitte (10 μ m).

Resultate

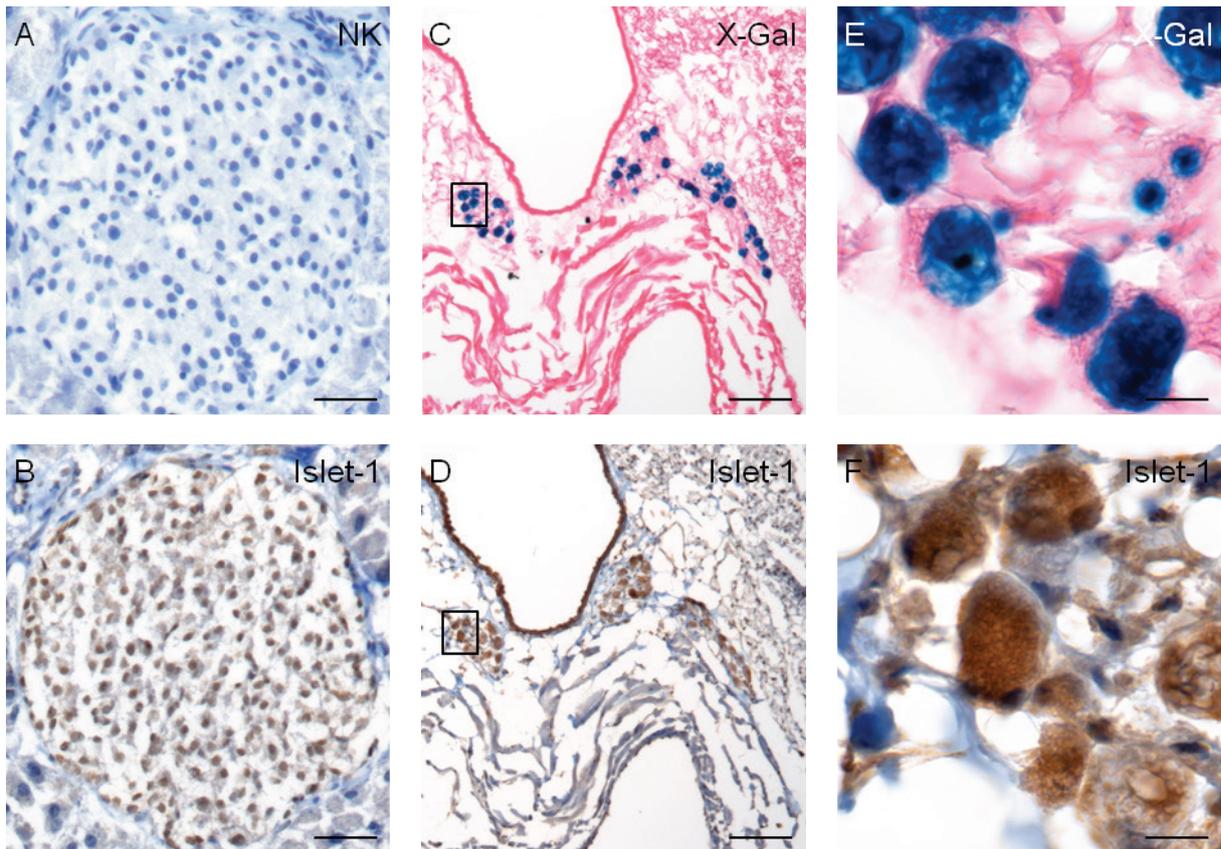


Abb. 7: Validierung der Isl-1-nLacZ-Mauslinie für den Nachweis Isl-1⁺ Zellen im erwachsenen Herzen. Gezeigt ist in (A) die immunhistochemische Darstellung einer Langerhans-Insel des murinen Pankreas ohne Verwendung des primären Antikörpers. Der Gewebeschnitt wurde mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt. In (B) ist eine Immunhistochemie gegen Isl-1 (braune Kernfärbung) in einer Langerhans-Insel gezeigt. In (C) ist die nLacZ-Expression eines kardialen Ganglions gezeigt und auf dem subsektiven Schnitt (D) die korrespondierende Isl-1 Immunhistochemie. In (E) und (F) ist jeweils ein vergrößerter Ausschnitt gezeigt. Maßstabsbalken: (A und B) 50 μm , (C und D) 100 μm und (E und F) 10 μm .

3.3 Nachweis von nLacZ⁺ Zellen in posterior des Herzens gelegenen Regionen

Bereits in den Übersichtsaufnahmen waren nLacZ⁺ Zellen als verstreute Zellcluster zu erkennen. Diese bestanden aus 2-100 Zellen, die sich auf der Rückseite des Herzens befanden. In der histologischen Darstellung konnten die nLacZ⁺ Zellen im Bereich des interatrialen Septums und der Pulmonalvenen lokalisiert werden.

Resultate

Auffällig waren die großen Nuklei und eine kräftige X-Gal-Färbung der Zellkerne (Abb. 8).

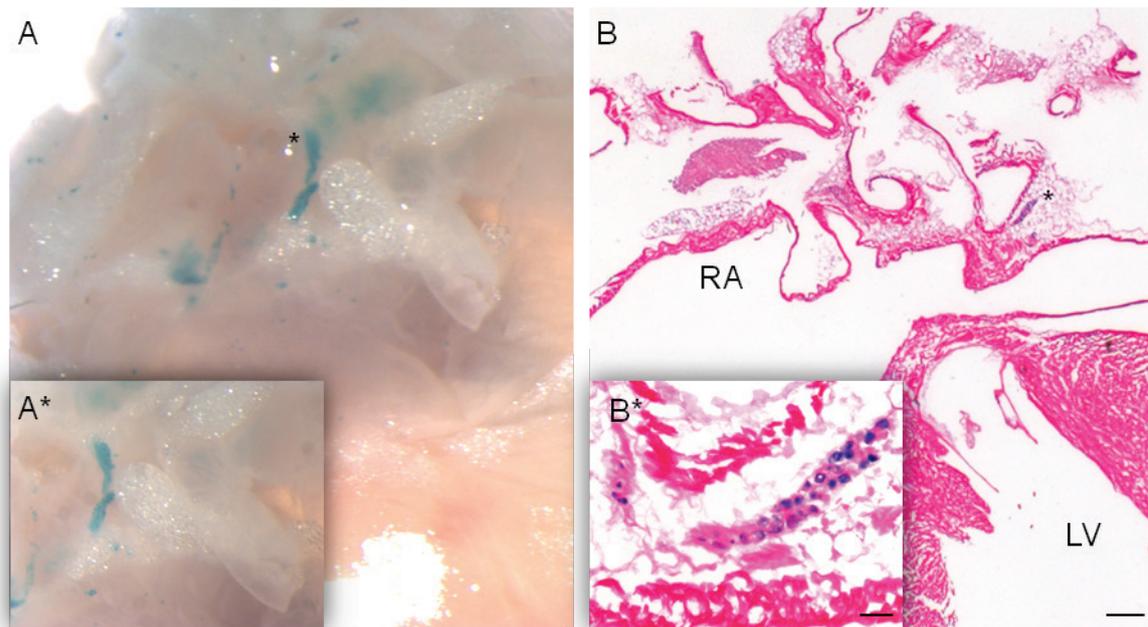


Abb. 8: Beschreibung der posterior des Herzens gelegenen nLacZ⁺ Zellcluster. In (A) sind mehrere nLacZ⁺ Zellregionen in der posterioren Ansicht des Herzens gezeigt. In der Detailansicht ist eine charakteristische Region vergrößert dargestellt. (B) zeigt eine exemplarische Histologie dieser Strukturen. Die Detailansicht in höherer Vergrößerung lässt deutlich die nLacZ⁺ Region (B*) erkennen. Auffällig ist die Größe der Nuklei. Maßstabsbalken: (B) 500 μ m und (B*) 50 μ m.

3.3.1 Charakterisierung der posterior gelegenen nLacZ⁺ Zellen in der Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung der Frage, ob es sich bei den posterior auf dem Herzen liegenden nLacZ⁺ Zellen um kardial differenzierte Zellen handelt, wurden die Zellen auf eine Koexpression von α -Actinin als Markerprotein für Kardiomyozyten untersucht. In Abb. 9 ist zu erkennen, dass die nLacZ⁺ Zellen, im Gegensatz zum benachbarten Herzmuskelgewebe, keine charakteristische Querstreifung in der α -Actinin Färbung zeigten. Auffällig war, dass die nLacZ⁺ Zellen in den beschriebenen Strukturen von einer Vielzahl von Zellen mit vergleichsweise kleinen Nuklei durchsetzt waren.

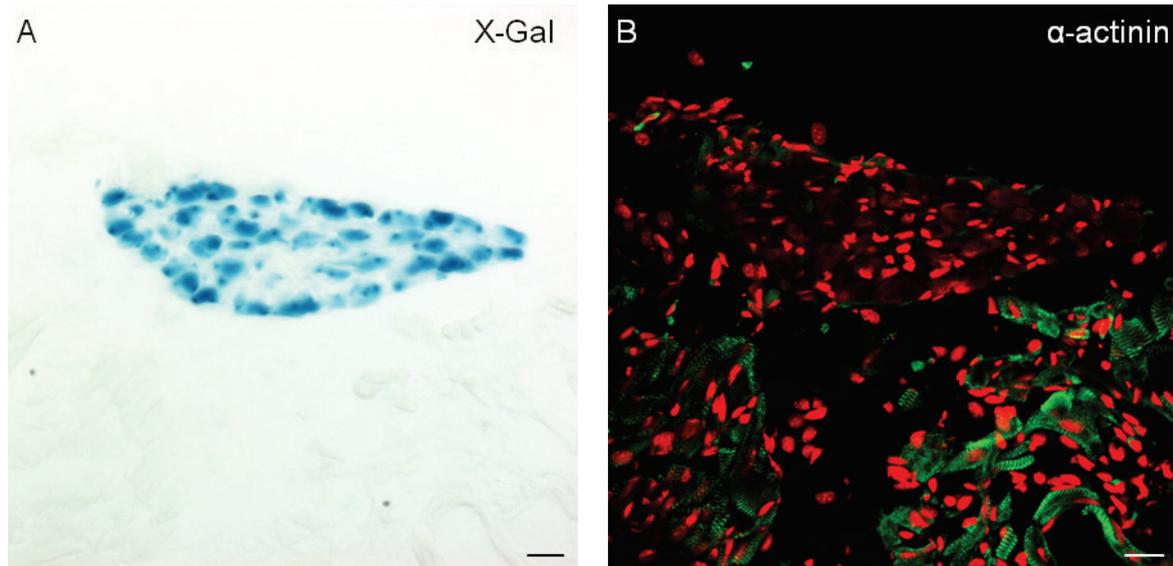


Abb. 9: Immunfluoreszenz des nLacZ⁺ Zellclusters gegen α-Actinin. (A) Gezeigt ist ein charakteristischer Komplex nLacZ⁺ Zellen nach X-Gal-Färbung. (B) zeigt eine Immunfluoreszenz desselben Gewebeschnitts in der Immunfluoreszenz gegen α-Actinin (grün). Maßstabsbalken: (A) und (B) 20 µm.

3.3.2 Nachweis von Acetylcholinesterase in posterior gelegenen nLacZ⁺ Zellen

Aufgrund der außergewöhnlichen Anordnung und Morphologie der nLacZ⁺ Zellen, sowie unter der Berücksichtigung der Ergebnisse von Cai et al. (2003) und Sun et al. (2007) war zu vermuten, dass es sich bei diesen Zellen um kardiale Ganglien handeln könnte. Zur weiteren Charakterisierung wurde deshalb eine Acetylcholinesterase-Färbung durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Nachweisverfahren neuronaler Zellen. In Abb. 10 ist gezeigt, dass die nLacZ⁺ Zellen des interatrialen Septums und ebenfalls die nLacZ⁺ Zellen im Bereich der Pulmonalvenen deutlich AChE-positiv waren. Die weiteren nLacZ exprimierenden Zellen im Bereich der Pulmonalvenenmündungen konnten als Teil des atrialen Plexus identifiziert werden.

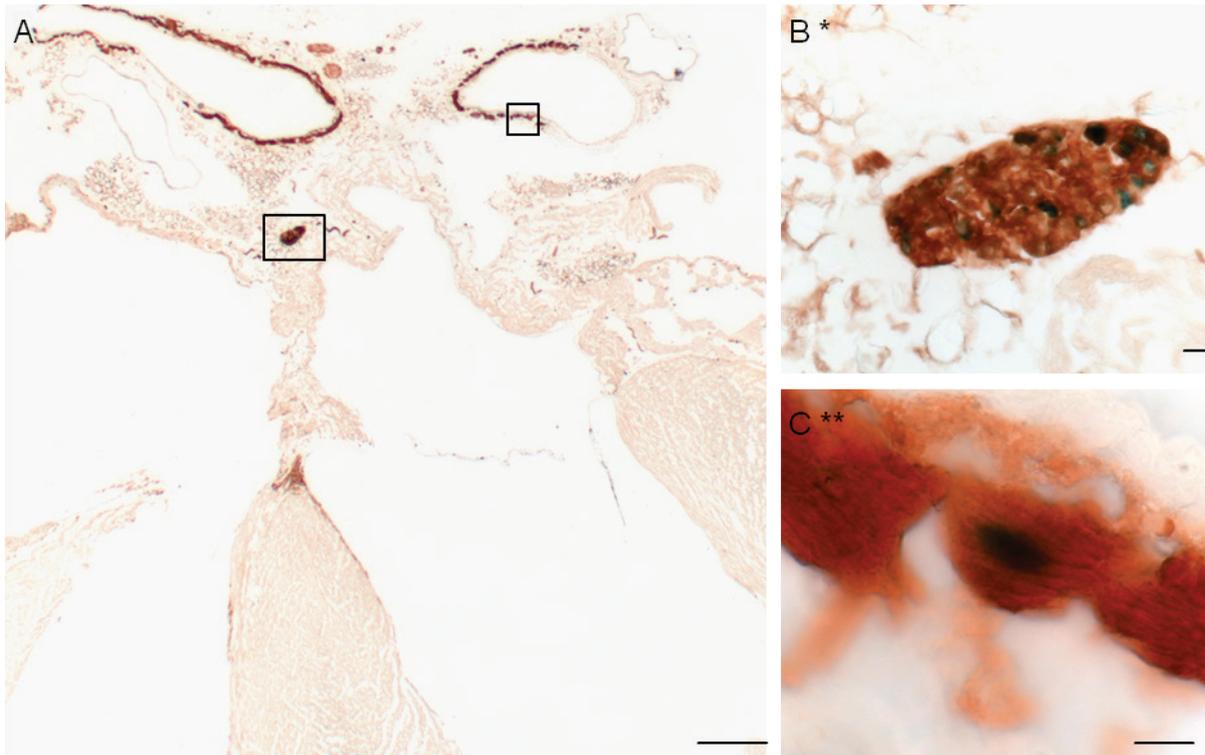


Abb. 10: Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen im Bereich des interatrialen Septums und der Pulmonalvenen durch Anfärbung der Acetylcholinesterase. Darstellung einer histologischen Übersicht (A) im 4-Kammerblick gegen die Acetylcholinesterase (braun) und Anfärbung nervaler Strukturen. (B) Vergrößerte Ansicht eines nLacZ⁺ Zellcluster im interatrialen Septum. (C) Gezeigt sind einzelne nLacZ⁺ Zellen im Bereich der Pulmonalvenen, die ebenfalls eine Reaktivität für die Acetylcholinesterase-Färbung aufweisen. AV-K: AV-Knoten; KG: Kardiales Ganglion; PV: Pulmonalvenen; LV: Linker Ventrikel RV: Rechter Ventrikel. Maßstabsbalken: (A) 500 µm, (B) 20 µm und (C) 10 µm.

3.3.3 Der Nachweis von Cholinacetyltransferase in nLacZ⁺ Zellen zur Identifikation parasymphathischer kardialer Ganglien

Der Nachweis einer AChE-Expression kann nicht sicher zwischen sympathischen und parasymphathischen Neuronen unterscheiden, sodass wir zur weiteren Klassifikation eine Färbung gegen die Cholinacetyltransferase (ChAT) durchgeführt haben. Diese wird nur in parasymphathischen Neuronen exprimiert. Die nLacZ⁺ Zellen zeigten eine deutliche Koexpression der ChAT (Abb. 11).

Resultate

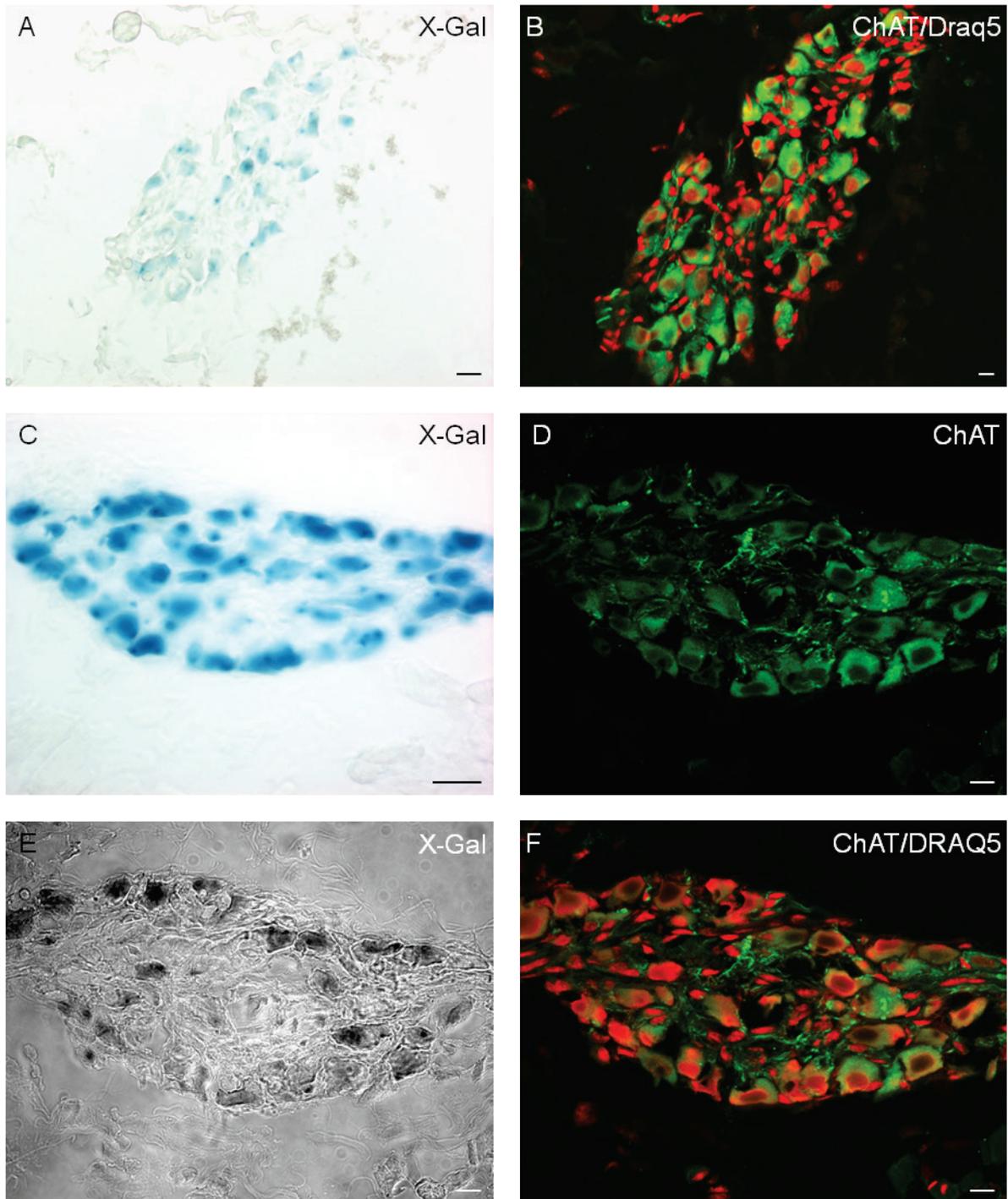


Abb. 11: Charakterisierung $n\text{LacZ}^+$ Zellen durch eine Immunfluoreszenzanfärbung der Cholinacetyltransferase. Dargestellt sind exemplarisch zwei Ganglien. In (A, C und E) gezeigt sind $n\text{LacZ}^+$ Ganglien nach X-Gal Färbung. (B, D und F) zeigen jeweils beide Ganglien nach Immunfluoreszenzdarstellung gegen Cholinacetyltransferase (grün). Für das zweite Ganglion sind zusätzlich die Darstellungen im Differentialinterferenzkontrast (DIC) des konfokalen Mikroskops und das solitäre ChAT-Signal gezeigt. Die Zellkerne sind durch DRAQ5 (rot) angefärbt. Maßstabsbalken: (A - F) 10 μm .

3.4 Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen im Bereich des Ausflusstrakts

Bereits die makroskopische Betrachtung des X-Gal gefärbten Herzens zeigte eine Expression in der proximalen Aorta und dem Truncus Pulmonalis. Wie in Abb. 12 gezeigt, fanden sich in allen Anteilen der Gefäßwände nLacZ⁺ Zellen. Diese waren bis auf wenige einzelne Zellen oberhalb der Klappenebene lokalisiert. Während im Bereich der Aorten- und Pulmonalwurzel noch eine große Anzahl nLacZ⁺ Zellen entdeckt werden konnte, nahm diese nach distal stark ab. Im Bereich des Aortenbogens fanden sich keine nLacZ⁺ Zellen mehr.

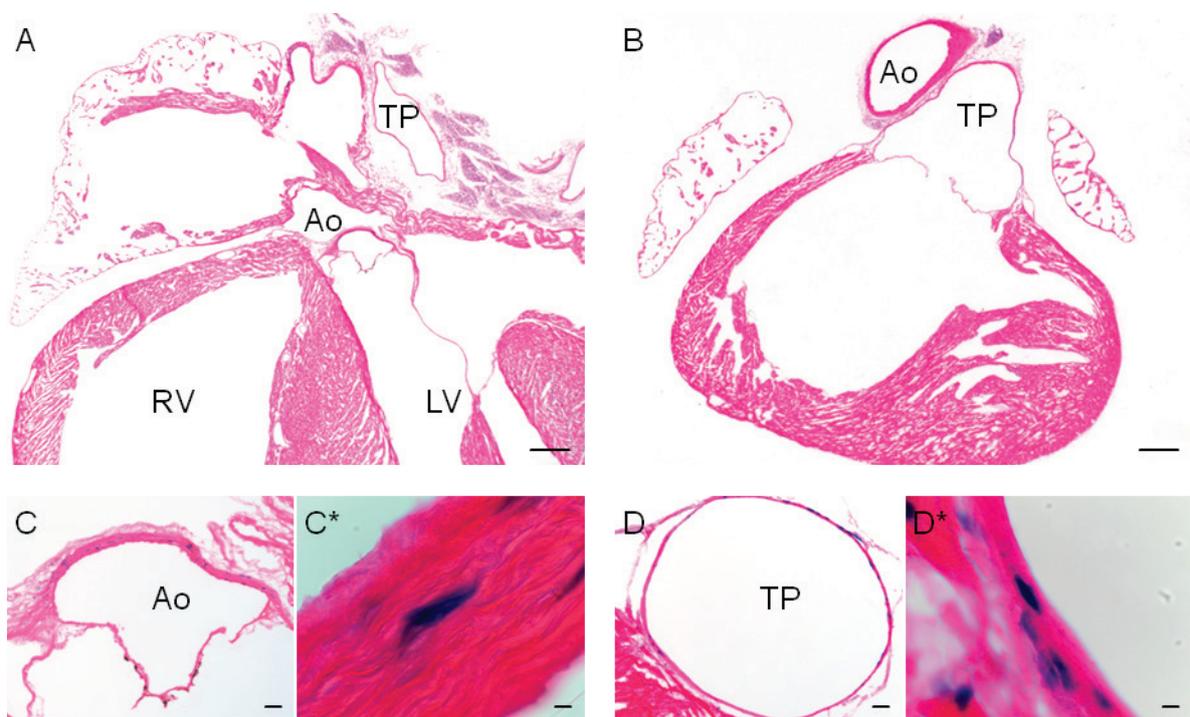


Abb. 12: Nachweis nLacZ⁺ Zellen in der proximalen Aorta und dem Truncus Pulmonalis. (A und B) Übersichtsansicht Eosin-gefärbter Kryoschnitte im Bereich der proximalen Aorta (A) und des Truncus Pulmonalis (B). In höheren Vergrößerungen sind vergleichbare Anschnitte der Gefäßwände von Aorta (C) und Truncus Pulmonalis (D) gezeigt. Diese zeigen exemplarisch die Verteilung der nLacZ⁺ Zellen in den verschiedenen Anteilen der Gefäßwände. Ao: Aorta; PA: Truncus Pulmonalis; RV: Rechter Ventrikel; LV: Linker Ventrikel Maßstabsbalken: (A und B) 500 µm, (C und D) 50 µm und 5 µm.

3.4.1 Immunfluoreszenz nLacZ⁺ Zellen im Ausflusstrakt gegen smooth muscle α -actin

Zur die Charakterisierung der nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes haben wir Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen *smooth muscle α -actin* (α -SMA) angefärbt. Es handelt sich bei α -SMA um ein Markerprotein zur Identifikation glatter Muskelzellen. In Abb. 13 ist eine Übersicht nLacZ⁺ Zellen in der Aorta dargestellt. Die korrespondierende Immunfluoreszenz zeigt Färbungen von α -SMA und nLacZ.

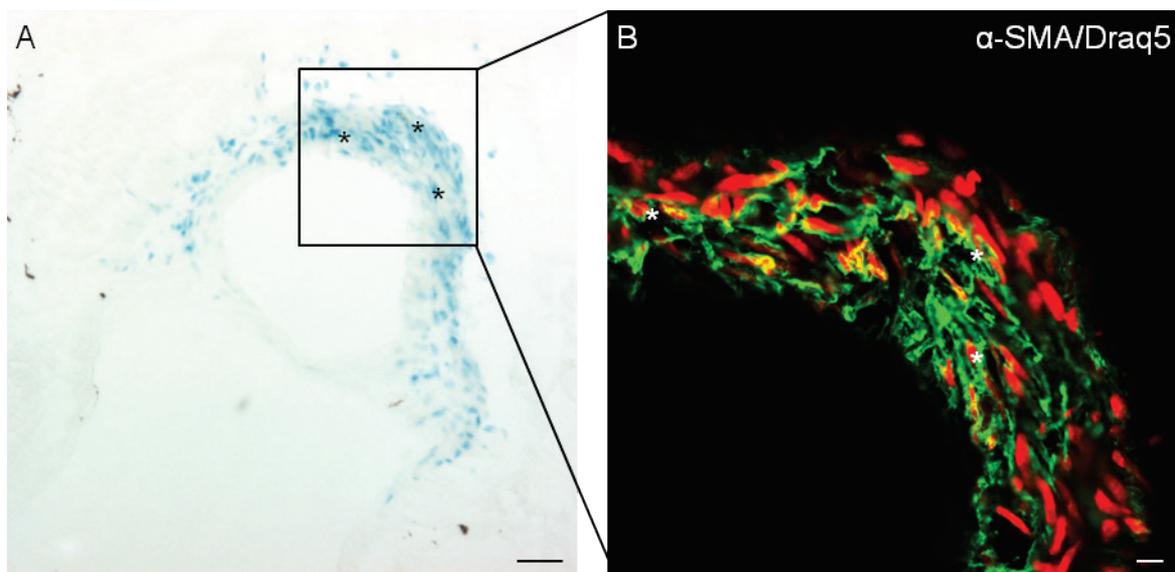


Abb. 13: Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes. (A) X-Gal gefärbter Anschnitt der proximalen Aorta. (B) Detailansicht des X-Gal gefärbten Kryoschnitts in der Immunfluoreszenz gegen *smooth muscle α -actin* (α -SMA). Die Zellkerne sind in der Fluoreszenzansicht mit DRAQ5 (rot) angefärbt. Gezeigt ist die deutliche Anfärbung der Muskelschichten des Gefäßes. Die Asterisci (*) zeigen Zellen, die eine Koexpression der β -Galactosidase und α -SMA nahelegen. Maßstabsbalken: (A) 50 μ m und (B) 10 μ m.

Anhand dieser Aufnahmen war es jedoch nicht möglich, eine eindeutige Aussage für einzelne nLacZ⁺ Zellen in der Gefäßwand zu treffen, die sich darüber hinaus in verschiedenen Anteilen der Gefäßwände zu befinden schienen. Durch die große Anzahl dicht gepackter Zellen wurde die Zuordnung einzelner Zellkerne und der dazugehörigen Zellstruktur erschwert.

3.4.2 Auswachskultur X-Gal⁺ Zellen des Ausflusstraktes

Um die nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes auf Einzelzellebene näher charakterisieren zu können, haben wir Auswachskulturen aus enzymatisch verdautem Gewebe der proximalen Aorta und des Truncus Pulmonalis angefertigt. Nach 5 bis 7 Tagen in Zellkultur wurden die Zellen fixiert und X-Gal gefärbt. Abb. 14 zeigt, wie aus dem Bereich der vereinzelt Gewebestücke Zellen auswachsen. Wir konnten nach X-Gal-Färbung nLacZ⁺ Zellen unterschiedlicher Zell- und Kernmorphologie identifizieren. Einige Zellen zeigten sehr große Zellkerne, weiterhin fanden sich binukleäre Zellen (Abb. 14). Es konnte beobachtet werden, dass die Zahl von nLacZ⁺ Zellen über die Kulturdauer zunahm.

Resultate

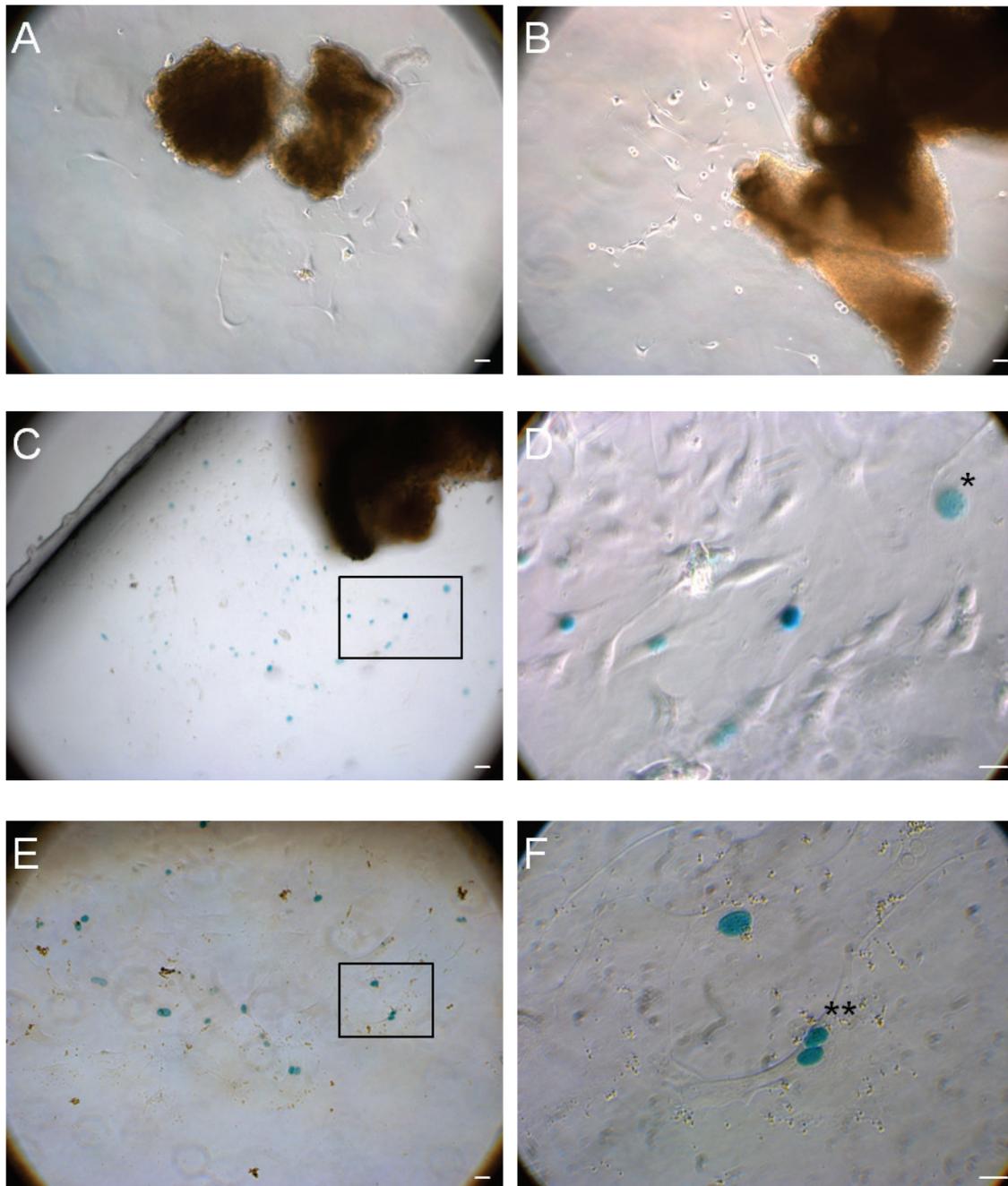


Abb. 14: Auswachskulturen X-Gal⁺ Zellen des Ausflusstraktes. In (A) und (B) sind in Kultur gebrachte Zellen des Ausflusstraktes nach 4 Tagen Kultivierung gezeigt. (C - D) und (E - F) zeigen jeweils durch Auswachsversuche isolierte Zellen, die an Tag 7 fixiert und X-Gal gefärbt wurden. Der Bereich der umrahmten Kästen zeigt nebenstehend jeweils einen vergrößerten Ausschnitt. Auffällig ist die unterschiedliche Morphologie der Zellen. Erkennbar ist, dass die nLacZ⁺ Zelle (*) einen sehr großen Zellkern aufweist und im Unterschied hierzu die nLacZ⁺ Zelle (**) binukleär ist. Maßstabsbalken: (A – F) 50 µm.

3.4.3 Immunfluoreszenz einzelner kultivierter nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes gegen smooth muscle α -actin

Die in der Immunfluoreszenz gegen α -SMA untersuchten nLacZ⁺ Zellen zeigten ausnahmslos eine Koexpression von α -SMA. Exemplarische Darstellungen der Immunfluoreszenz sind in Abb. 15 gezeigt. Auffällig ist, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der X-Gal Färbung in Abb. 14, die unterschiedliche Morphologie der nLacZ⁺ Zellen. So zeigt die Darstellung der α -SMA Fluoreszenz in (B und D) einen unterschiedlichen Grad der Verteilung des α -SMA⁺ Signals der nLacZ⁺ Zellen. So ist in (B) eine deutlich diffusere Signal im Vergleich zur klaren Anfärbung des Zytoskelett in (D) zu erkennen.

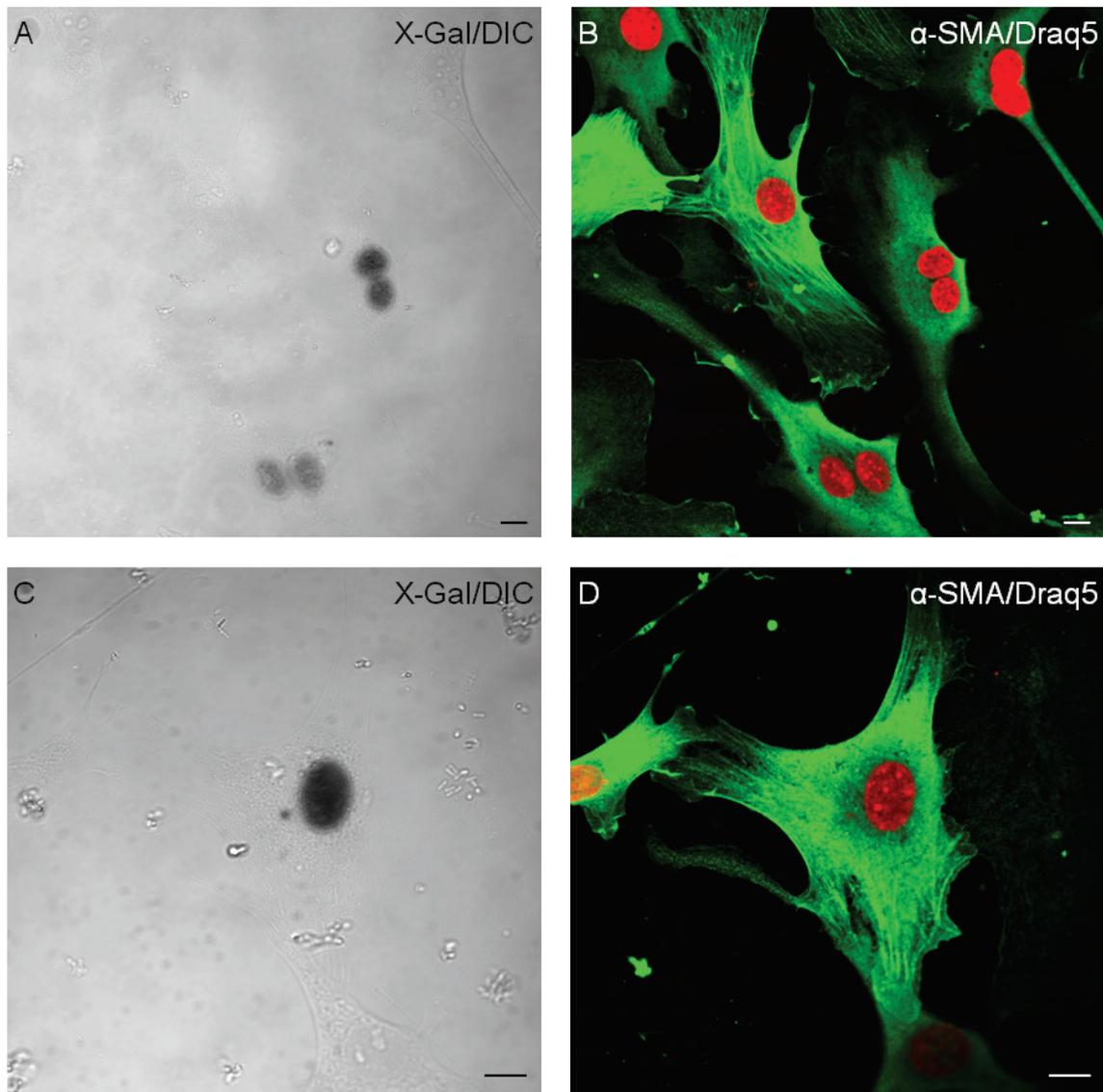


Abb. 15: Charakterisierung isolierter nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes durch Immunfluoreszenz gegen *smooth muscle α-actin*. In (A und C) gezeigt sind einzelne isolierte nLacZ⁺ Zellen in der Differentialinterferenzkontrast-Darstellung des konfokalen Mikroskops. Die X-Gal gefärbten nLacZ⁺ Zellkerne sind hierbei dunkel dargestellt. In (B) sind dieselben Zellen in der Fluoreszenz gegen *smooth muscle α-actin* (α-SMA) (grün) gezeigt. Die Zellkerne sind in der Fluoreszenzansicht mit DRAQ5 (rot) angefärbt. In (C) und (D) ist eine einzelne nLacZ⁺ / α-SMA⁺ Zelle vergrößert in der Immunfluoreszenz gezeigt. (A-D) 10 μm.

3.4.4 Charakterisierung isolierter nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes gegen smooth muscle myosin heavy chain

Da α -SMA kein sehr spezifischer Marker für glatte Muskelzellen ist und dieses Protein neben seiner starken Expression in glatten Muskelzellen ebenfalls von Myofibroblasten exprimiert wird, haben wir eine Immunfluoreszenz gegen *smooth muscle myosin heavy chain* (SM-MHC) durchgeführt. SM-MHC stellt durch eine auf glatte Muskelzellen beschränkte Expression ein spezifischeres Markerprotein glatter Muskelzellen dar. In Abb. 16 ist eine Immunfluoreszenz gezeigt, die mindestens zwei unterschiedliche Populationen nLacZ⁺ Zellen aus dem Ausflusstrakt zeigt. Diese unterschieden sich in der Expression von SM-MHC. Die überwiegende Zahl der nLacZ⁺ Zellen zeigte eine Koexpression von SM-MHC. Einige wenige Zellen waren SM-MHC-negativ.

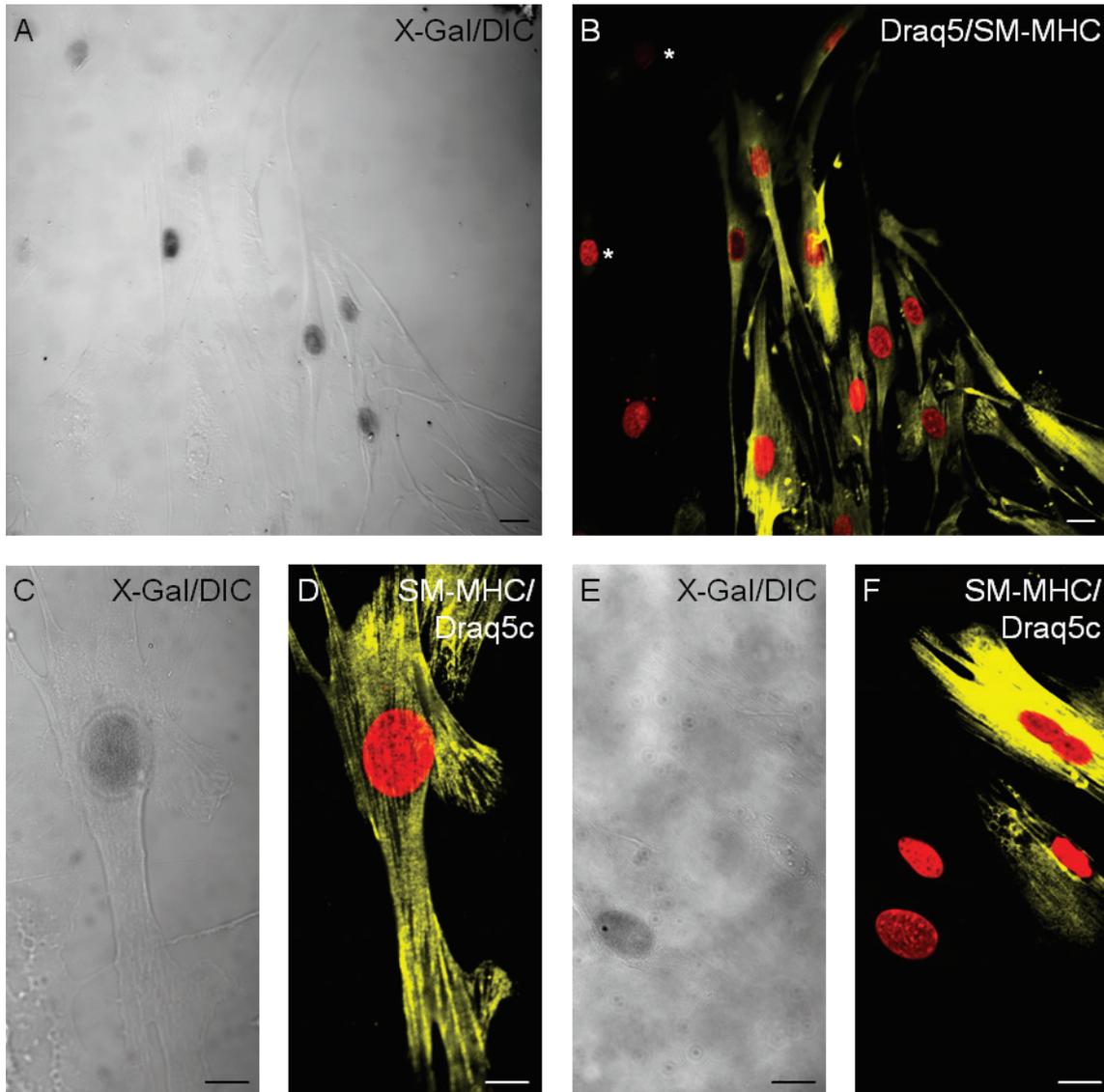


Abb. 16: Charakterisierung isolierter nLacZ⁺ Zellen des Ausflusstraktes durch Immunfluoreszenz gegen *smooth muscle myosin heavy chain*. In (A) gezeigt sind einzelne isolierte nLacZ⁺-Zellen im Differentialinterferenzkontrast (DIC) des konfokalen Mikroskops. Die nLacZ⁺ Zellkerne sind dunkel. Die Immunfluoreszenz (B) zeigt die Expression von SM-MHC (gelb). Daneben sind in (B) zwei nLacZ⁺ Zellen (Asterisci) zu erkennen, die keine Expression von SM-MHC aufweisen. In (C und D) ist eine nLacZ⁺/SM-MHC⁺ und in (E und F) eine nLacZ⁺/SM-MHC⁻ Zelle in höherer Vergrößerung dargestellt. Die Zellkerne sind in der Fluoreszenzansicht mit DRAQ5 (rot) angefärbt. Maßstabsbalken: (A - F) 10 µm.

3.4.5 Einzelne nLacZ⁺ Zellen im Myokard des Ausflusstrakts

In der Region der Aorten- und Pulmonalwurzel fanden sich weitere nLacZ⁺ Zellen, die sich im Bereich des umgebenen Myokards befanden, aber nicht Teil der Gefäßwand

Resultate

waren. Die untersuchten Zellen dieser Region exprimierten ausnahmslos α -Actinin in der Immunfluoreszenz und zeigten eine für Kardiomyozyten typische Querstreifung.

Resultate

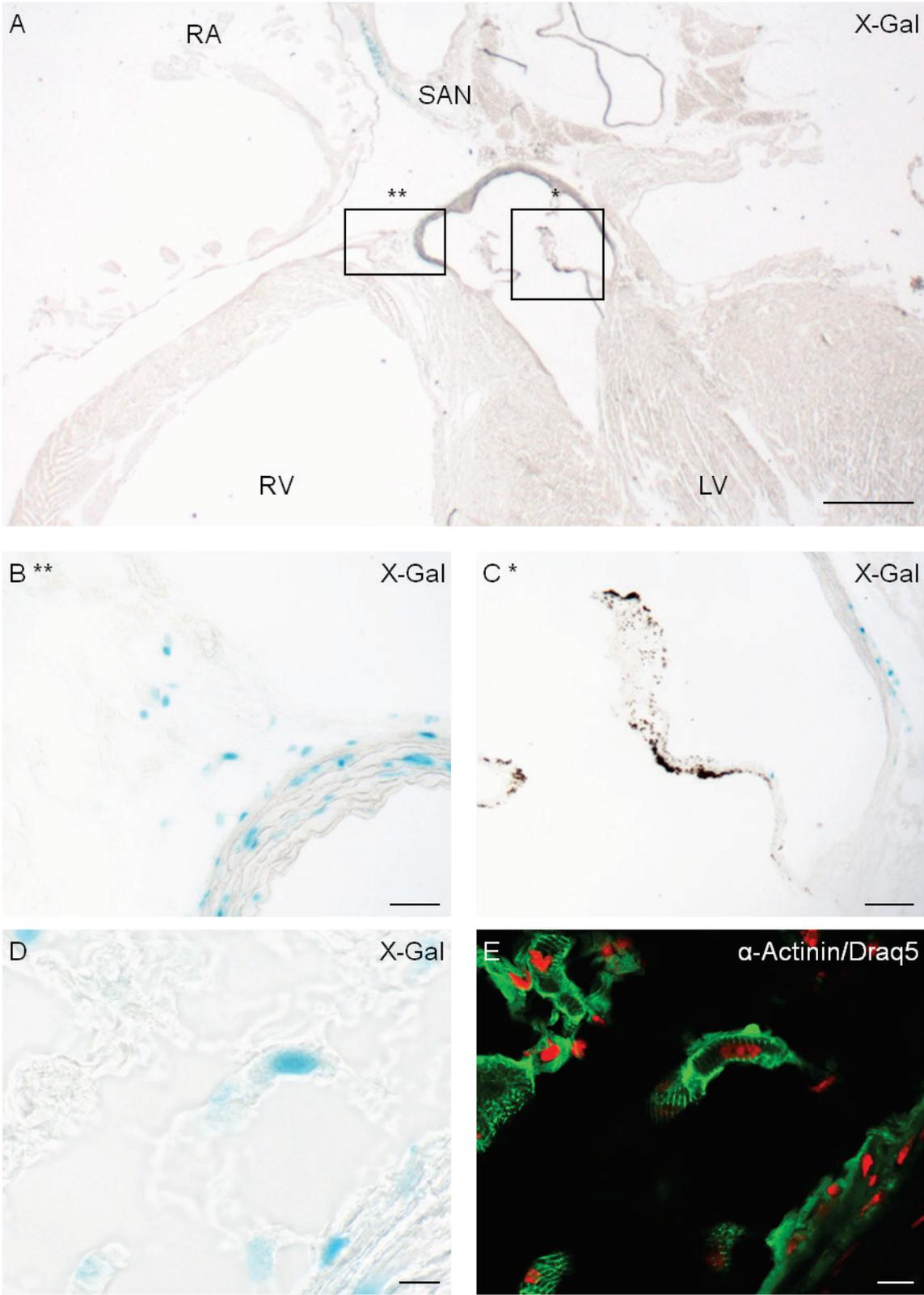


Abb. 17 zeigt exemplarisch die Anfärbung einer nLacZ⁺ Zelle gegen α -Actinin. Insgesamt handelte es sich um wenige verstreute Zellen. Vereinzelt wurden auch nLacZ⁺ Zellen als Teil des Klappenapparats identifiziert.

Resultate

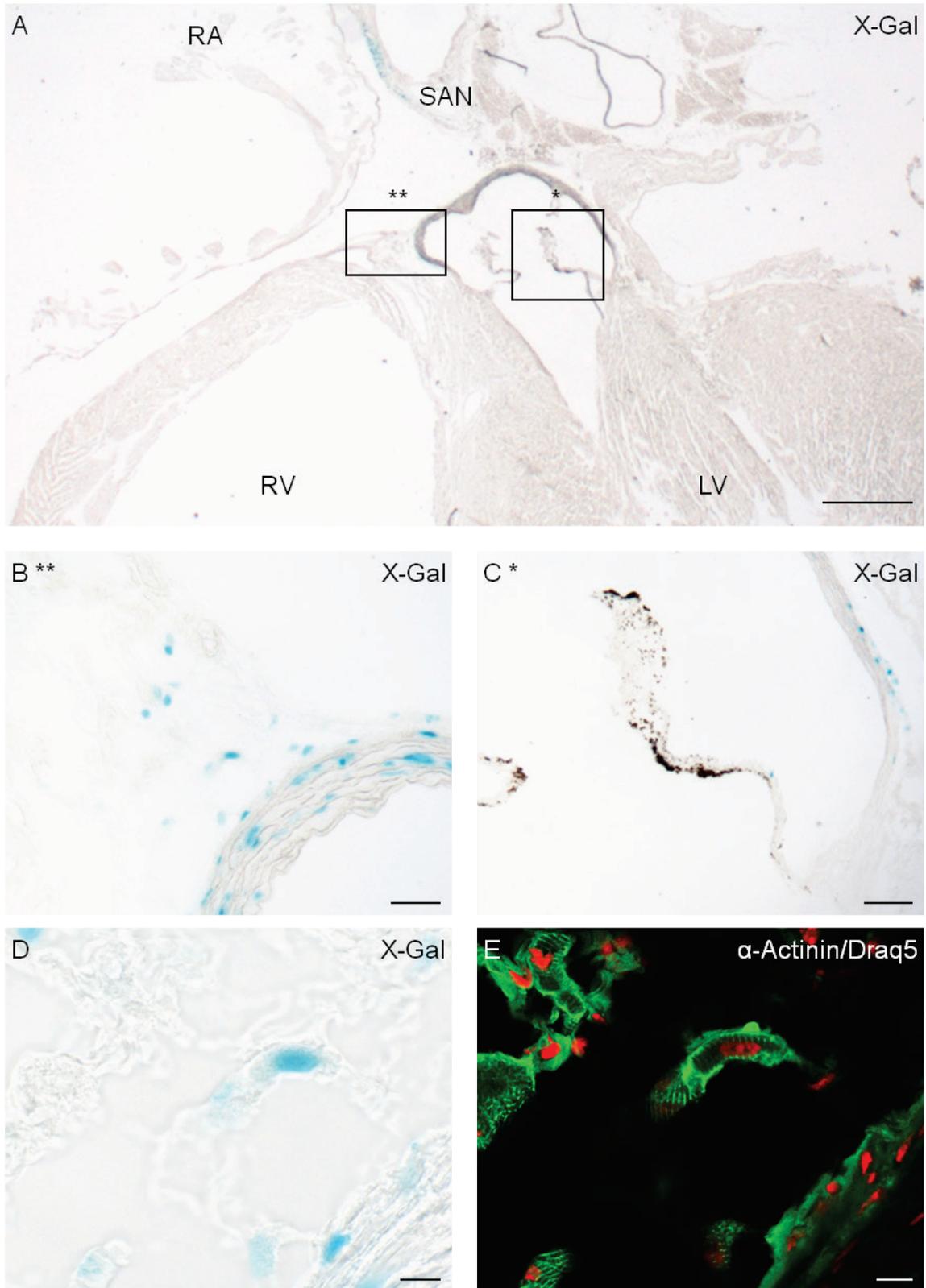


Abb. 17: Charakterisierung einzelner $nLacZ^+$ Zellen im Transformationsbereich des Ausflusstraktes durch Immunfluoreszenz gegen α -Actinin. In (A) ist eine histologische Übersicht im 4-Kammerblick nach X-Gal Färbung ohne zusätzliche Gegenfärbung gezeigt. (B) zeigt eine Detailansicht des Ausflussbereichs der Aorta, die neben den bereits beschriebenen Zellen in der Gefäßwand weitere $nLacZ^+$ Zellen im benachbarten Myokard enthält. (C) zeigt daneben eine

Resultate

vergrößerte Ansicht einer der Taschenklappen der Aorta, die eine einzelne nLacZ⁺ Zelle aufweist. In (D) gezeigt ist eine nLacZ⁺ Zelle aus dem Ausflussbereich der Aorta. Diese Zelle zeigt in der Immunfluoreszenz gegen α -Actinin (E) eine für Kardiomyozyten typische Querstreifung. RA: Rechtes Atrium; RV: Rechter Ventrikel; LV: Linker Ventrikel; SAN: Sinusknoten. Maßstabsbalken: (A) 500 μ m, (B) 50 μ m, (C) 100 μ m und (D und E) 10 μ m.

3.5 Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen im Einflussbereich des rechten Herzens

In der muskulären Wand des rechten Vorhofs fand sich eine weitere Ansammlung nLacZ⁺ Zellen. Diese Zellen waren entlang der Grenze zwischen dem rechten Vorhof und der oberen Hohlvene lokalisiert. In Abb. 18 ist zunächst eine Darstellung der nLacZ⁺ Zellen unter dem Stereo-Mikroskop gezeigt. Diese zeigt eine kommaförmige Anordnung der Zellen, welche sich auch in der histologischen Ansicht wiederfindet. Diese besondere Morphologie und der zentrale Gefäßdurchtritt (s. Abb. 18 C) legten den Schluss nahe, dass es sich hierbei um die Region des Sinusknoten handelte. Um die nLacZ⁺ Zellen näher zu charakterisieren wurde anschließend eine Immunfluoreszenz gegen α -Actinin durchgeführt. Abb. 18 zeigt, dass diese Gruppe von nLacZ⁺ Zellen auch α -Actinin exprimieren.

Resultate

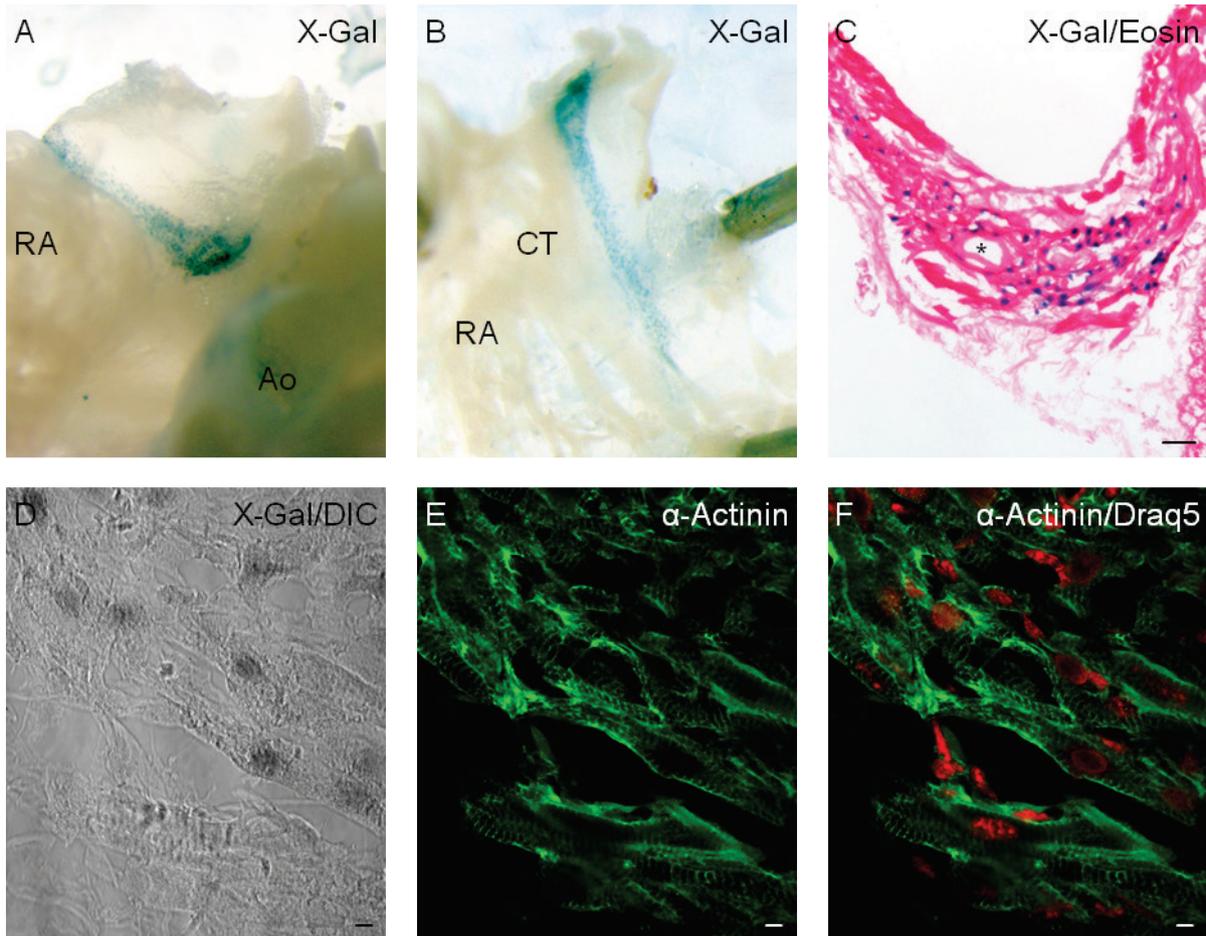


Abb. 18: Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen im Einflussbereich des rechten Herzens durch Anfärbung gegen α -Actinin. (A) und (B) zeigen das murine Herz nach X-Gal Färbung vergrößert unter dem Stereo-Mikroskop. In (B) gezeigt ist die Eröffnung des rechten Vorhofs und es ist zu erkennen, dass sich die positive Zellregion am Rand der *Crista Terminalis* befindet. In (C) gezeigt ist eine Detailansicht in Eosin-Gegenfärbung. In (D) gezeigt sind nLacZ⁺ Zellen im Differentialinterferenzkontrast (DIC) des konfokalen Mikroskops. In (E) und (F) ist eine Immunfluoreszenz gegen α -Actinin (grün) gezeigt, wobei in (F) die Zellkerne zusätzlich mit DRAQ5 (rot) markiert sind. (*) markiert den zentralen Gefäßdurchtritt des Ramus nodi sinuatrialis. Ao: Aorta; RA: Rechtes Atrium; CT: Crista Terminalis. Maßstabsbalken: (C) 50 μ m und (D - F) 10 μ m.

In Zellen des Sinusknoten des murinen Herzens wird der Ionenkanal *hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channel 4* (HCN4) stark exprimiert. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine deutliche Koexpression von HCN4 für die nLacZ⁺ Zellen (Abb. 19). Interessanterweise waren nur ca. 50% aller HCN4⁺ Zellen aus der Sinusknotenregion nLacZ⁺. Umgekehrt zeigten alle untersuchten nLacZ⁺ Zellen eine Expression von HCN4. Für die HCN4- und AChE-

Resultate

positive AV-Knoten-Region als weiterer Teil des Erregungsleitungssystems fand sich konstant keine Expression für nLacZ.

Resultate

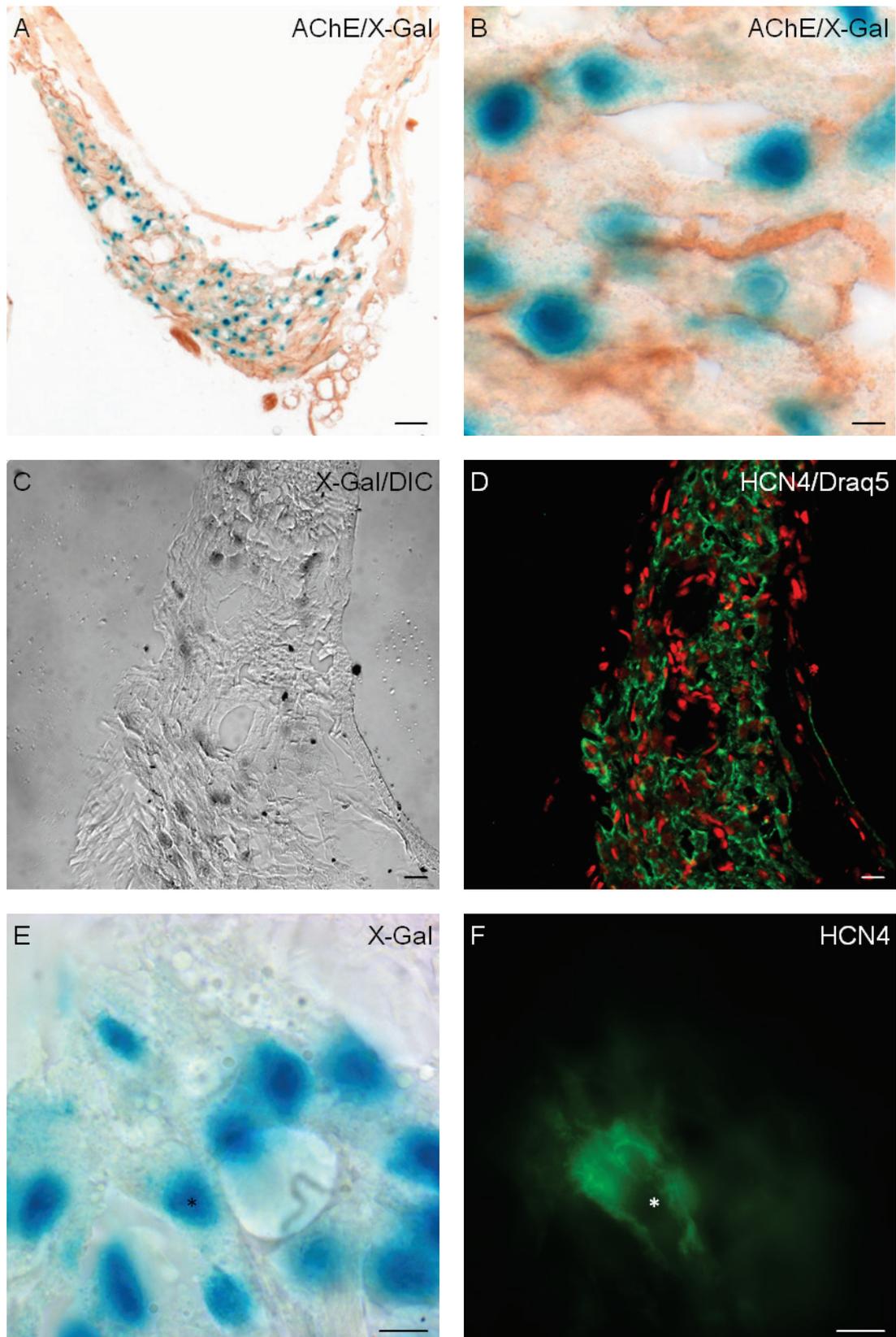


Abb. 19: Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen in der Region des Sinusknotens durch Anfärbung gegen Acetylcholinesterase und HCN4. (A) zeigt eine Anfärbung der Acetylcholinesterase (braun) in der nLacZ⁺ Region des Sinusknotens. In (B) gezeigt ist eine Detailansicht der nLacZ⁺ Zellen des Sinusknotens. Auffällig ist, dass die AChE-Färbung der nLacZ⁺ Zellen des Sinusknotens von

Resultate

geringerer Intensität ist, als bei den kardialen Ganglien. (C) zeigt die Region des Sinusknotens und der nLacZ⁺ Zellen (dunkelgraue Zellkerne) im konfokalen Differentialinterferenzkontrast DIC. In (D) ist eine Immunfluoreszenz gegen den *hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channel 4* (HCN4) und eine Markierung der Zellkerne mit dem Farbstoff DRAQ5 (rot) gezeigt. In (E) und (F) wird in der hochauflösenden Detailansicht die Koexpression von HCN4 in der Immunfluoreszenz (grün) und nLacZ nach X-Gal Färbung (blau) auf Einzelzellebene (Asteriks) dargestellt. Nur eine Zelle liegt im Fokus der verwendeten Fluoreszenzlampe und erscheint HCN4⁺. Alle HCN4⁻ erscheinenden Zellen liegen außerhalb des Fokus. Maßstabsbalken: (A) 50 µm, (B) 5 µm, (C und D) 50 µm und (E und F) 10 µm.

3.5.1 Isolation und morphologische Charakterisierung nLacZ⁺ Zellen

Der Sinusknoten setzt sich aus einer Vielzahl morphologisch und funktionell unterschiedlicher Zellen zusammen und stellt somit ein sehr heterogenes Zellgebilde dar (Monfredi et al. 2010). Innerhalb dieses Komplexes konnten morphologisch unterschiedliche Schrittmacherzellen identifiziert werden (Mangoni and Nargeot 2008). Unser Ziel war es, die nLacZ⁺ Zellen des Sinusknotens zu isolieren und morphologisch zu charakterisieren. Hierzu wurde der Sinusknoten mechanisch isoliert und nach einem modifizierten Protokoll von Mangoni und Nargeot (2001) enzymatisch verdaut und anschließend die isolierten Zellen unter dem Mikroskop morphologisch untersucht. Hierbei fand sich eine Vielzahl von Zellen mit einer kontinuierlichen autonomen Schrittmacheraktivität. Nach anschließender Fixierung und Färbung mit X-Gal konnten nLacZ⁺ Zellen unterschiedlicher Morphologie angefärbt werden. Diese sind in Abb. 20 gezeigt. Der Anteil der isolierten nLacZ⁺ Zellen an den morphologisch charakterisierten Schrittmacherzellen variierte je nach Präparation zwischen 0,1 und 5%.

Resultate

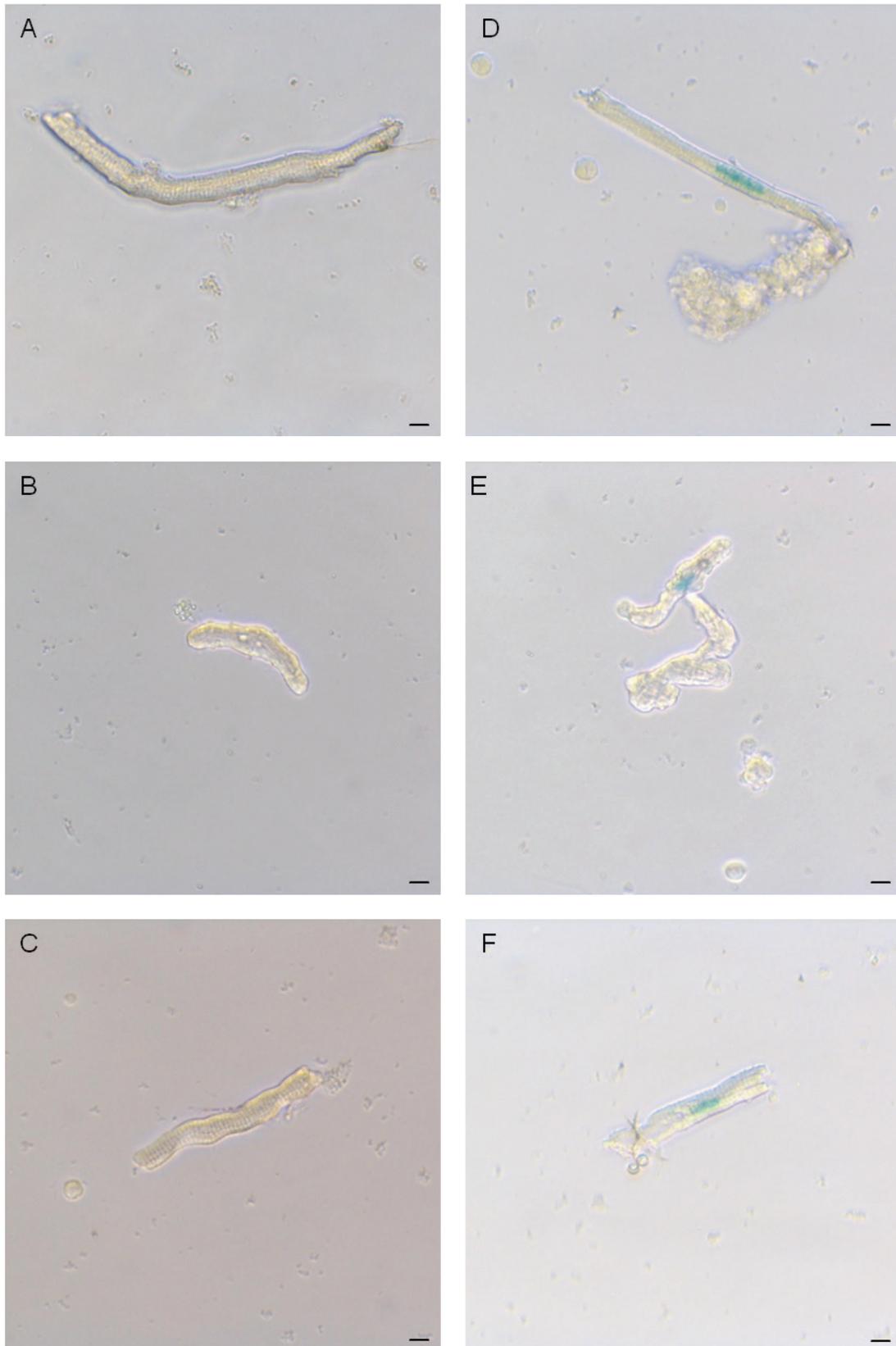


Abb. 20: Isolierte Zellen des Sinusknotens nach X-Gal-Färbung. (A und D) zeigen elongierte spindelförmige Zellen, (B und E) spindelförmige Zellen und (C und F) atriale Zellen. Gezeigt sind die charakteristischen Zelltypen des Sinusknotens. Bei allen Strukturen waren $nLacZ^+$ und $nLacZ^-$ Zellen vorhanden. Maßstabsbalken: (A - F) 5 μ m.

3.6 Islet-1 Expression im murinen und im menschlichen Herzen

Die Islet-1 Expression wurde auf Ebene der mRNA in murinen Wildtyp-Herzen untersucht. Abb. 21 zeigt, dass Islet-1 im Wildtyp-Herzen in der Region des Sinusknotens stabil exprimiert wird. Die Expression von Islet-1 wurde in C57/BL6J-Wildtyp-Tieren im Alter von 12-48 Wochen (n = 31) im Intervall von 4 Wochen untersucht. Es wurden jeweils Proben aus den verschiedenen Regionen isoliert und auf die Expression von Islet-1 mRNA untersucht. Zu erkennen ist die konstant nachweisbare Expression in der Sinusknotenregion bei in der erwarteten Größe von ca. 1000 bp sowie der fehlende Nachweis einer Expression in einer der anderen isolierten Regionen (Abb. 21).

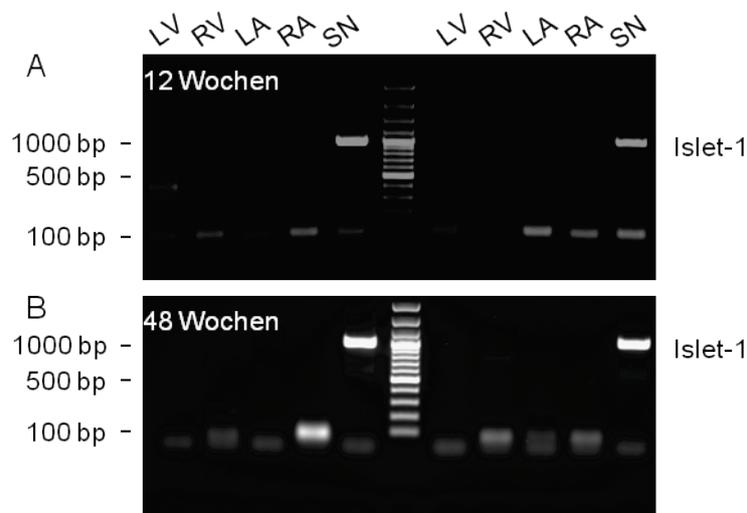


Abb. 21: Expression von Islet-1 auf mRNA Ebene im murinen Wildtyp-Herzen. Gezeigt ist in jeweils exemplarisch eine PCR-Analyse zu den Zeitpunkten 12 (A) und 48 (B) Wochen von C57/BL6J-Wildtyp-Tieren und die konstante Expression von Islet-1 mRNA für die Region des Sinusknotens bei ca. 1000 bp. RA: Rechter Vorhof, LA: Linker Vorhof, RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel, SN: Sinusknoten.

Im Ventrikel konnte bei keinem der untersuchten Tiere eine Expression festgestellt werden. In Abb. 22 sind exemplarisch Ausschnitte der untersuchten Herzen gezeigt. Insgesamt wurden pro Tier ca. 600 Gewebeschnitte auf eine Expression von nLacZ untersucht (n = 20).

Resultate

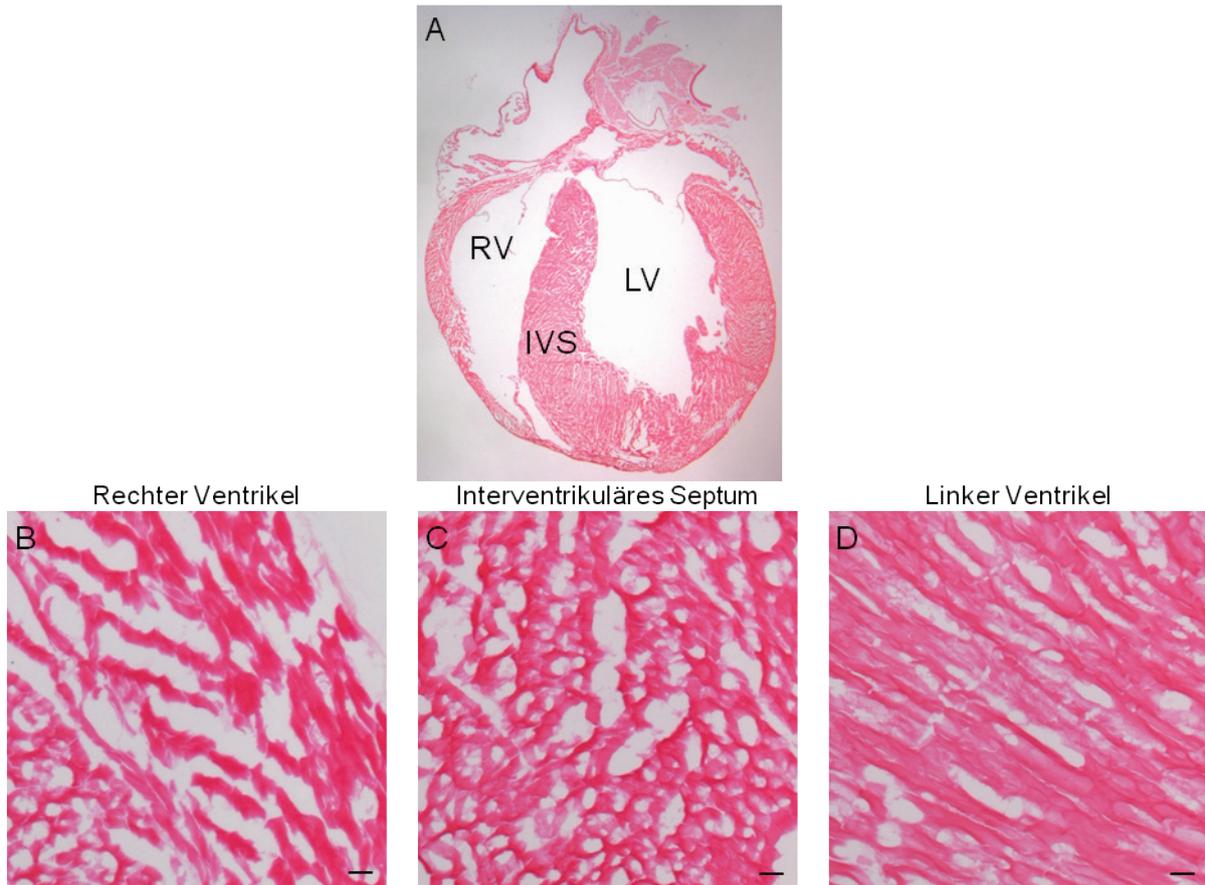


Abb. 22: Kein Nachweis einer nLacZ⁺ Expression in der adulten Maus auf Ventrikel Ebene. Die Übersicht (A) zeigt einen 4-Kammerschnitt des murinen Herzens nach Eosin und X-Gal-Färbung. In den Vergrößerungen (A-D) sind exemplarisch der rechte Ventrikel (A), das interventrikuläre Septum (B) und der linke Ventrikel (D) gezeigt. RA: Rechtes Atrium, LA: Linkes Atrium, RV: Rechter Ventrikel, LV: Linker Ventrikel, SN: Sinusknoten. Maßstabsbalken: (C-D) 20 μ m.

Es konnten ebenfalls Proben aus menschlichem Gewebe des Sinusknoten ($n = 4$) gewonnen und auf ihre Expression von Islet-1 untersucht werden. Zur Verifikation der korrekten Präparation wurden zusätzlich histologische Proben aus der Region des Sinusknoten entnommen. Diese wurden aufgearbeitet und es konnte durch Masson-Goldner-Färbung als auch durch die Expression von HCN4 die Region des Sinusknotens histologisch identifiziert werden. In allen vier Proben konnte, wie in Abb. 23 dargestellt, Islet-1 mRNA nachgewiesen werden.

Resultate

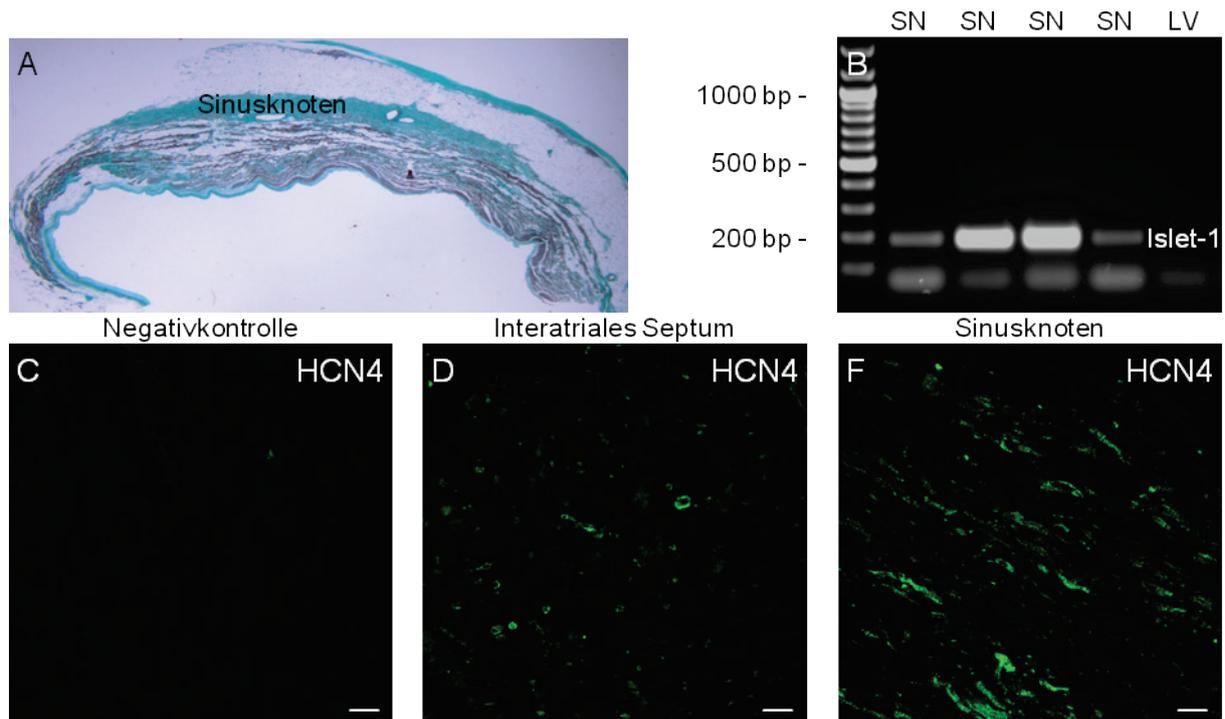


Abb. 23: Islet-1 mRNA im adulten humanen Sinusknoten. Gezeigt ist in (A) ein Paraffinschnitt in Masson-Goldner-Färbung. Grün dargestellt sind hierbei Bindegewebsfasern und Muskelgewebe ist rötlich angefärbt. Im Zentrum des Anschnitts ist eine Struktur mit hohem Bindegewebsanteil und einigen Gefäßanschnitten zu erkennen. (B) zeigt eine qualitative PCR verschiedener Patientenproben, die eine deutliche Bande für die Expression von Islet-1 bei ca. 200bp zeigt. In (C-E) ist eine Immunfluoreszenz gegen HCN4 der atrialen Region dargestellt, wobei (C) eine Negativkontrolle ohne ersten Antikörper zeigt, (D) das interatriale Septum darstellt und (E) die vermutete Sinusknotenregion. Maßstabsbalken: (C - F) 10 µm.

3.7 Expression von Islet-1 im Infarktmodell der adulten Maus

Um die Hypothese zu untersuchen, dass es während eines Myokardinfarkts zu einer gesteigerten Expression von Islet-1 kommt, führten wir in einem Myokardinfarktmodell der adulten Maus histologische Untersuchungen an Herzen von Isl1-nLacZ-Tieren (n = 13) durch. Die Induzierung des Myokardinfarkts erfolgte durch eine RIVA-Ligatur. Die anschließenden histologischen Untersuchungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Infarkt durchgeführt, um auch eine mögliche transiente Hochregulation der Expression von Islet-1 zu erfassen. Hierfür wurden die Zeiträume 2,7,14 und 28 Tage nach dem Infarkt gewählt. In Abb. 24 sind

Resultate

exemplarisch histologische (Sirius-Rot) Färbungen zu den Zeitpunkten 2 und 28 Tage nach Infarkt gezeigt. Lediglich in einem Tier des Zeitpunktes 7 Tage post-Infarkt wurden wenige Zellen mit fraglicher nukleärer LacZ-Expression im Bereich des Infarktes gefunden. Bei diesem Tier war die Infarktregion außergewöhnlich groß. Diese zeigte statt der charakteristischen homogenen Färbung eine nukleäre bis perinukleäre granuläre Anfärbung. Die Zellen sind in Abb. 25 dargestellt.

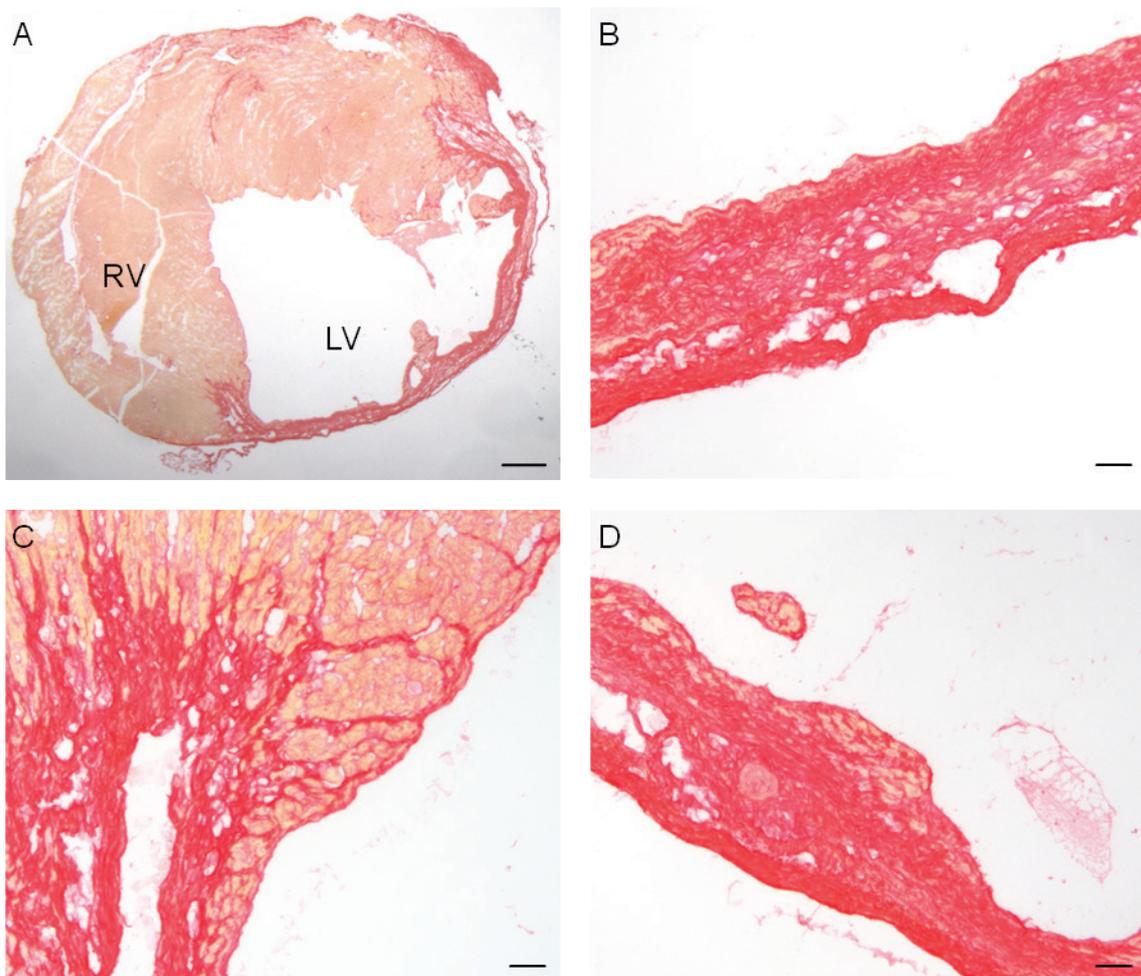


Abb. 24: Untersuchung der Islet-1 Expression im Myokardinfarktmodell. In (A) gezeigt ist eine Übersichtsfärbung in Siriusrot nach Induzierung eines Infarkts. (B und D) zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Infarktregion und in (C) ist die Periinfarktregion vergrößert dargestellt. Maßstabsbalken: 50 μ m.

Resultate

Zeitpunkt nach Induzierung des Infarkts (Tage)	Anzahl der Tiere	Anzahl der untersuchten Gebewebschnitte	Anzahl der nLacZ⁺ Zellen (Infarktbereich)
2	3	1100	0
7	3	1300	10
14	3	850	0
28	4	1000	0

Tab. 3.1: Isl-1-nLacZ-Herzen nach einem Myokardinfarkt.

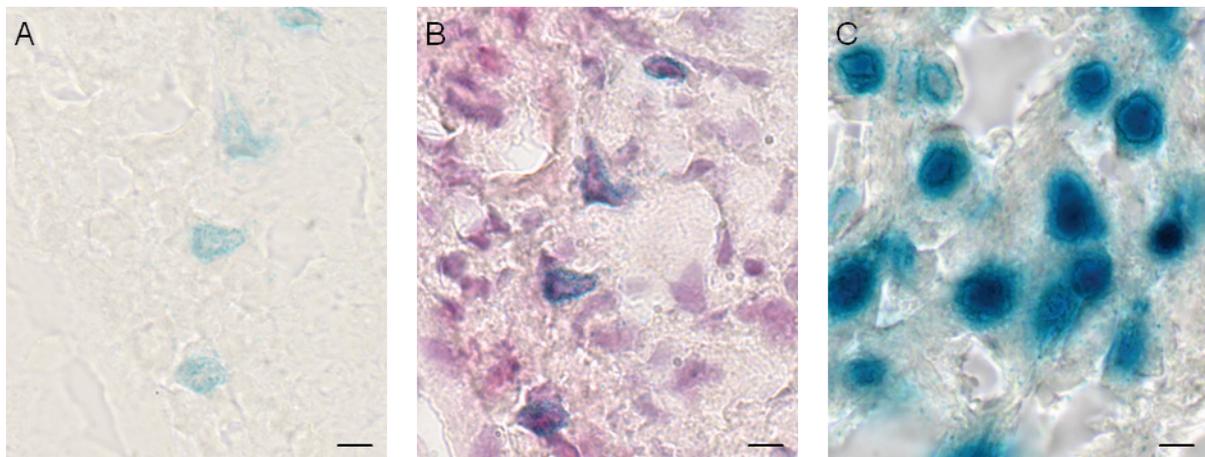


Abb. 25: Perinukleäre nLacZ⁺ Zellen in der Periinfarktregion einer Maus 7 Tage nach Induzierung des Infarkts. In (A) gezeigt sind vier nLacZ⁺ Zellen die eine perinukleäre Anfärbung aufweisen. In (B) ist die HE-Gegenfärbung gezeigt. In (C) gezeigt ist die X-Gal-Färbung der nLacZ⁺ Zellen aus der Region des Sinusknotens, die im Vergleich eine homogenere nukleäre Anfärbung aufweist. Maßstabsbalken: (A – C) 10 μ m.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Islet-1 positive Zellen im erwachsenen Herz existieren. Es konnte erstmalig eine Expression dieses Transkriptionsfaktors und Markers embryonaler kardialer Vorläuferzellen in drei distinkten Regionen des erwachsenen Herzens nachgewiesen werden. Bei diesen Regionen handelte es sich um:

1. Zellen parasymphathischer Ganglien
2. Glatte Muskelzellen im prox. Abschnitt der großen Arterien
3. Vereinzelte Kardiomyozyten im ventrikulärem Ausflusstrakt
4. Schrittmacherzellen des Sinusknotens

Islet-1 mRNA konnte ebenfalls im menschlichen Sinusknoten nachgewiesen werden und als Marker des adulten Sinusknoten etabliert werden. Es fand sich darüber hinaus kein Hinweis für eine undifferenzierte adulte Islet-1⁺ Vorläuferzellpopulation im gesunden Herzen. Auch nach einem Myokardinfarkt fanden sich bis auf 10 fraglich positive Zellen im Herzen eines Tieres keine Islet-1⁺ Zellen.

4.1 Anmerkungen zum verwendeten Modell des Nachweis von Islet-1

Für die Untersuchung der Expression von Islet-1 in der adulten Maus wurde ein heterozygoten Knock-in Reportermausmodell (1 bis 18 Monate) verwendet. Bei diesem Modell wurde in den Genlocus eines Islet-1 Allels eine β -Galactosidase künstlich inseriert. Durch die Färbung der Zellen mit X-Gal, einem Substrat der β -Galactosidase kommt es nach Abspaltung einer glykosidischen Bindung zu einer Blaufärbung aller Zellkerne, in denen unter dem aktiven Islet-1 Promotor die β -Galactosidase (nLacZ⁺) exprimiert wird. Es handelt sich um ein etabliertes Maus-Modell der Arbeitsgruppe von S. Evans. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt

Diskussion

werden, dass die Expression von Islet-1 durch die nLacZ-Expression abgebildet wird (Sun et al. 2007).

Der Vergleich mit zwei aktuellen Arbeiten zeigt, welche Vorteile die Verwendung des Reportermausmodells im Vergleich zur reinen Immunfluoreszenzdarstellung bietet. Khattar et al. (2010) beschreiben auf der Basis dieser Technik zwei unterschiedlich charakterisierte Islet-1⁺ Cluster, deren Expression in verschiedenen Mausstämmen variiert. Bei dem in der Arbeit als Cluster-1 bezeichneten Zellcluster handelte es sich um neuronale Zellen, die neben der Expression von Islet-1⁺ durch die Expression von Neurofilament charakterisiert wurden (Khattar et al. 2010). Es ist anzunehmen, dass es sich bei diesem Cluster um die von uns als Islet-1⁺ identifizierten parasympathischen Ganglien handelt. Das zweite Cluster wurde von Kardiomyozyten geformt und zeigte eine Koexpression von Troponin T. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um den Sinusknoten. Eine weitere Arbeit, die sich mit der Expression von Islet-1 beschäftigt hat, ist die Arbeit von Genead et al. (2010), die in der Ratte einzelne Islet-1⁺ Zellen beschreibt und anhand des Markerproteins Troponin T als Kardiomyozyten charakterisiert. In beiden Studien wurde Islet-1 durch Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Diese direkte Nachweismethode erlaubt bei einem ausreichend starken Signal eine gute Identifikation des Zielproteins. Jedoch ist der Nachweis von nukleär lokalisierten Transkriptionsfaktoren erschwert. Hinzu kommt, dass es bei dieser Technik schwierig ist, eine genaue Lokalisation und anatomische Zuordnung zu erreichen, da die Zellen nur in der Immunfluoreszenz-Darstellung von umgebenden Zellen zu unterscheiden sind. Um das zu untersuchende Zielprotein messen zu können, ist es notwendig, eine hohe Vergrößerung zu wählen. Dadurch geht die Übersicht verloren. Bei niedrigeren Vergrößerungen erhält man durch den größeren Bildausschnitt einen besseren Überblick, das lichtschwache Fluoreszenzsignal ist dann jedoch kaum zu detektieren. Die eigentliche Färbung ist ebenfalls technisch aufwändig und störanfällig, da die Gewebeschnitte einzeln gefärbt werden müssen.

Die Wahl des Isl1-nLacZ-Reportermausmodell ermöglichte es, diese Schwierigkeiten zu umgehen. Zum einen konnte durch das kräftige blaue Signal und die Technik der *whole-mount*-Färbung bereits vor der histologischen Aufarbeitung eine anatomische Zuordnung getroffen werden. Zum anderen ermöglichten die Einbettung der Herzen im Vier-Kammerblick und die sequenzielle Anfärbung von Gewebeschnitten

Diskussion

(ca. 25 Herzen, ca. 500-600 Schnitte pro Herz) eine genaue anatomische Orientierung. Die Verwendung weiterer Marker zur molekularen Charakterisierung, in Kombination mit dem enzymatischen Nachweis von Islet-1, ermöglichte eine eindeutige Identifikation der Zellen. Gleichzeitig bietet das Modell aufgrund der enzymatisch katalysierten Farbreaktion einen sehr sensitiven Nachweis. Dies ist besonders bei einer sehr niedrigen, aber biologisch bedeutsamen Promotoraktivität von Vorteil.

Die Verwendung eines genetischen Modells birgt allerdings auch relevante Limitationen. Die Insertion der β -Galactosidase in das Islet-1 Gen führt zu der Zerstörung eines Islet-1 Allels. Mögliche Folgen sind eine gestörte Signaltransduktion des Zielgens oder benachbarter Gene mit der Folge einer gestörter Proteinexpression im Ziel- oder in Nachbarorganen (Davis et al. 2012). Im Unterschied zum homozygoten Knock-out war dieses Modell jedoch nicht intrauterin letal und führte zu keinem erkennbaren Phänotyp während der Embryonalentwicklung oder der frühen postnatalen Entwicklung (Sun et al. 2007). In der vorliegenden Studie konnte im adulten Tier ebenfalls kein kardialer Phänotyp identifiziert werden. Ein Phänotyp kann allerdings auch bei der begrenzten Zahl und Tiefe der in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Analysen nicht zu 100% ausgeschlossen werden. Es ist darüber hinaus möglich, dass die Expression des Islet-1 Proteins durch die Ausschaltung eines Allels unterschätzt wurde. Die Tatsache, dass die Expression über den langen Untersuchungszeitraum und bei der großen Zahl untersuchter Tiere ($n = 25$) stabil war, spricht jedoch gegen einen solchen Effekt. Ebenso ist die Halbwertszeit der β -Galactosidase mit ~ 30 Stunden lang. Es erscheint deshalb unwahrscheinlich, dass eine transiente Islet-1 Expression nicht erfasst wurde. Unspezifische Farbreaktionen durch physiologisch exprimierte β -Galactosidasen sind beschrieben worden. Diese können z. B. in Makrophagen auftreten (Kiernan 2007). Gegen eine unspezifische Reaktion spricht jedoch, dass durch Kofärbung $nLacZ^+$ Zellen mit einem Antikörper gegen Islet-1 verifiziert werden konnte, dass die Zellen tatsächlich Islet-1⁺ waren. Die $nLacZ^+$ Zellen zeigten stets ein klares und strikt nukleäres Signal in der X-Gal-Färbung. Dagegen zeigte keines der untersuchten Wildtyp-Tiere ein positives nukleäres Signal in der X-Gal-Färbung.

Einzig im untersuchten Modell des Myokardinfarktes fanden sich ca. 10 Zellen, die im Perinfarktbereich nur eines Tieres identifiziert wurden und möglicherweise eine

unspezifische Expression einer β -Galactosidase darstellten (Siehe Kap. 3.7). Diese Zellen wiesen im Unterschied zu ausnahmslos allen anderen Islet-1⁺ Zellen eine nur perinukleäre Anfärbung auf. Es konnte aufgrund technischer Limitierungen, bedingt durch die äußerst geringe Zellzahl, nicht verifiziert werden, ob es sich in diesem Fall um ein Beispiel der o. g. Expression einer β -Galactosidase durch Makrophagen handelte. Möglicherweise wiesen die Zellen aufgrund der Zellschädigung und des teilweisen kompletten Zelluntergangs eine gestörte Islet-1 Expression auf. Eine genaue anatomische Lokalisation der Zellen war bedingt durch die Größe des Infarktes und der damit verbundenen Ausdünnung des Myokards, der Fibrose und letztendlich erschwerten Präparation schwierig. Insbesondere in Horizontalschnitten, wie sie zur Infarktbestimmung notwendig waren, ist die Ausflusstraktanatomie nur sehr schwer zu beurteilen, sodass nicht auszuschließen ist, dass es sich bei diesen Zellen um Zellen des ventrikulären Ausflusstrakts handelte.

4.2 Lokalisierung und Charakterisierung von Islet-1+ Zellen im adulten Herzen

4.2.1 Islet-1 wird in parasymphatischen kardialen Ganglien exprimiert

Wir konnten mehrere neuronale Islet-1⁺ Zellcluster unterschiedlicher Zellzahl pro Herz identifizieren. Diese zeigten sich in der Lokalisation variabel. Bestimmte Regionen wie das interatriale Septum wiesen jedoch stets ein größeres nLacZ⁺ Zellcluster auf. Die Zellen zeigten eine Koexpression für die neuronalen Marker AChE und ChAT. Hierbei ist zu betonen, dass die AChE von fast allen neuronalen Zellen exprimiert wird. Dahingegen ist ChAT ein Markerprotein, das fast ausschließlich von parasymphatischen Neuronen exprimiert wird (Koelle und Wagner 1955; Hoover et al. 2004). Die Morphologie und die molekulare Charakterisierung der identifizierten neuronalen Zellen legen den Schluss nahe, dass es sich hierbei um die von Khattar et. al (2010) beschriebenen Zellen des Cluster-I handelte. Wir konnten im Vergleich zu dieser Arbeit mehrere neuronale Islet-1⁺ Zellcluster identifizieren. Der Expressionszeitraum von Islet-1 war in diesen Clustern über 18 Monate konstant und ist somit als stabil für die adulte Maus anzunehmen.

Wir konnten auch sehr kleine Cluster kardialer Ganglienzellen im Bereich der Pulmonalvenen lokalisieren. Diese befanden sich vornehmlich im Bereich der Nervenfasern des kardialen Plexus, der mit seinen Nervenfasern die Pulmonalvenen begleitet. Eine aktuelle Arbeit von Zarzoso et al. (2013) fand Hinweise, dass Ganglienzellen der Pulmonalvenen (PVG) eine modulatorische Funktion der Herzfrequenz zukommen könnte. Diese wird dabei laut den Autoren von Verbindungen der Ganglienzellen zum Sinusknoten gesteuert. Die Autoren der Arbeit konnten unter anderem zeigen, dass eine Stimulation der PVG zu einer Ab- oder Zunahme der Frequenz führte. Dies war abhängig davon, ob cholinerge oder adrenerge PVG stimuliert wurden. Hieraus ergeben sich weitere Fragen, dahingehend, ob Islet-1⁺ Ganglien möglicherweise ebenfalls eine die Herzfrequenz modulierende Funktion ausüben oder ob Islet-1 einen Einfluss auf diese Funktion hat. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Funktion der Expression von Islet-1 in kardialen Ganglien des adulten Herzens unklar. Die spezifische und über den gesamten Untersuchungszeitraum nachweisbare Expression spricht jedoch dafür, dass Islet-1 eine biologische Funktion ausübt.

4.2.2 Islet-1 wird in glatten Muskelzellen des proximalen Ausflusstraktes exprimiert

In der vorliegenden Arbeit konnte im Bereich des prox. Ausflusstraktes eine weitere Population Islet-1⁺ Zellen nachgewiesen werden. Die gefundenen Zellen konnten u.a. als glatte Muskelzellen durch die Koexpression von α -SMA und SM-MHC charakterisiert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der embryonalen Abstammung einer Islet-1⁺ Zellpopulation in dieser Region (Cai et al. 2003; Sun et al. 2007). Hierdurch war gemäß diesen Arbeiten zur Embryonalentwicklung Islet-1 eine Rolle als Vorläuferzellmarker glatter Muskelzellen zugeschrieben worden. Wir konnten durch diese Arbeit zeigen, dass in diesem Bereich die Expression von Islet-1 in der Maus bis in das hohe Alter persistiert, ohne dass sich ein Anhalt für eine Proliferationsfähigkeit fand.

Es fanden sich allerdings auch Islet-1⁺ Zellen, die keine Expression des Markers SM-MHC für glatte Muskelzellen zeigten. Aufgrund der Verteilung der Islet-1⁺ Zellen innerhalb der gesamten Gefäßwand unter Einbeziehung der Endothelschicht lässt

Diskussion

sich vermuten, dass es sich hierbei um Islet-1⁺ Endothelzellen handelt. Dies erscheint plausibel, da bereits in der Arbeit von Moretti et al. (2006) gezeigt werden konnte, dass Islet-1⁺ Vorläuferzellen während der Embryonalphase zu Endothelzellen differenzieren. Ein Nachweis von CD31⁺ in den Islet-1⁺ Zellen als einem Marker für Endothelzellen schlug jedoch fehl (Daten nicht gezeigt). Eine weitere mögliche Zellpopulation - und hierfür spricht die Zunahme der Zahl der Islet-1⁺ Zellen bei längerer Kultivierungszeit - wären kardiale Fibroblasten. Diese zeigen typischerweise eine Expression für α -SMA und ein charakteristisches starkes Wachstum in Zellkultur (Zeisberg and Kalluri 2010). Allerdings finden sich in der Literatur keine Daten zu einer Islet-1 Expression in kardialen Fibroblasten, die darüber hinaus sehr wahrscheinlich einen heterogenen Zelltyp darstellen (Davis and Molkenin 2014).

Die Arbeit der Gruppe um J. Epstein konnte zeigen, dass glatte Muskelzellen des Ausflusstraktes nicht vollständig dem zweiten Herzfeld entstammen (Engleka et al. 2012). So fand sich im Bereich des Ausflusstraktes zumindest eine Subpopulation Islet-1⁺ glatter Muskelzellen, die von Vorläuferzellen der Neuralleiste abstammten. Die Ergebnisse unserer Arbeit bestätigen somit die Annahme, dass Islet-1 kein alleiniger Marker des zweiten Herzfeldes darstellt. Überraschend war jedoch, dass neben diesen Zellen im Bereich der Gefäßwände weitere Islet-1⁺ Kardiomyozyten in der Region des Ausflusstraktes gefunden wurden. Bisher galt die Annahme, dass die Expression von Islet-1 mit dem Fortschreiten der kardialen Differenzierung hin zu reifen Kardiomyozyten herunter reguliert wird. Als einzige bekannte Ausnahme galt der adulte Molch (Witman et al. 2011).

Unsere Ergebnisse zeigen jedoch, dass einige wenige ventrikuläre Kardiomyozyten, die auf den Ausflusstrakt beschränkt waren, eine Koexpression von Islet-1 und sarkomerischem α -Actinin aufweisen. Welche Funktion Islet-1 in diesen Zellen besitzt, ist allerdings auch bei dieser Population unklar. In der Arbeit von Genead et al. (2010) wurden ebenfalls verstreute Islet-1⁺Zellen im Bereich des Ausflusstraktes nachgewiesen, die Troponin T koexprimierten und als Kardiomyozyten charakterisiert wurden. Es ist möglich, dass es sich hierbei spezieübergreifend um denselben Zelltyp handelt. Jedoch wurden an diesen Zellen keine weiteren kardialen Marker untersucht, so dass sich diese Frage nicht abschließend klären lässt. In diesem Modell ließ sich darüber hinaus ebenfalls keine undifferenzierte Islet-1⁺ Zellpopulation im Bereich des Ausflusstraktes nachweisen.

4.3 Islet-1⁺ als molekularer Marker einer Schrittmacherzellpopulation des Sinusknotens

Ein zweites klar umschriebenes Zellcluster Islet-1⁺ Zellen konnte in der Region des Sinusknotens identifiziert werden. Weiterhin waren diese Zellen α -Actinin-positiv. Dieses Cluster zeigte ebenfalls eine Expression von Islet-1 und war im Bereich des rechten Atriums und des interatrialen Septums lokalisiert. Es fand sich jedoch keine weitere Charakterisierung oder Lokalisierung (Khattar et al. 2010). Hierbei zeigt sich der Vorteil der in dieser Arbeit verwendeten *whole-mount*-Färbung (siehe 74 4.1). In den Übersichtsaufnahmen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass es sich um die Region des Sinusknotens handelte. Bestätigt wurde dies durch eine Koexpression von Islet-1 und HCN4. Islet-1⁺ Zellen stellten hierbei mit einem Anteil von ca. 50% der HCN4⁺ Zellen eine Subpopulation der Zellen des Sinusknotens dar. In einem weiteren Versuch gelang es, Sinusknotenzellen zu isolieren und morphologisch zu charakterisieren. Hierbei fanden sich die charakteristischen Zelltypen des Sinusknotens. Ca. 0,1 bis 5% dieser Zellen waren nLacZ⁺. Damit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass adulte Schrittmacherzellen des Sinusknotens eine Islet-1 Expression zeigen.

Der Anteil der Islet-1⁺ Zellen an den isolierten Zellen des Sinusknotens variierte mit 0,1 bis 5% erheblich und lag auch stets unter dem Anteil der histologisch identifizierten Islet-1⁺ Zellen im Bereich des Sinusknotens (ca. 50%). Dies ist zum einen wahrscheinlich durch die technisch aufwendige Präparation und morphologische Charakterisierung der Sinusknotenzellen zu erklären. Insgesamt konnte nur eine sehr geringe Anzahl von Sinusknotenzellen isoliert werden. Die morphologische Charakterisierung führte daneben möglicherweise insbesondere aufgrund der Ähnlichkeit spindelförmiger Schrittmacherzellen und gewöhnlicher atrialer Zellen zu einer Überschätzung der Zahl der Schrittmacherzellen und damit zur einer Unterschätzung des Anteils nLacZ-positiver Sinusknotenzellen. Aufgrund der geringen Anzahl isolierter Zellen könnten bereits kleine Fehler zu größeren Abweichungen geführt haben. Eine weitere Erklärung ist, dass die nLacZ⁺ Zellen möglicherweise empfindlicher auf die Prozedur des enzymatischen Verdaus reagierten. Die Ergebnisse zeigten jedoch eindeutig, dass im erwachsenen Sinusknoten eine Islet-1⁺ und eine Islet-1⁻ Subpopulation existiert.

Diskussion

Die Tatsache, dass im Sinusknoten eine stabile Fraktion Islet-1⁺ Zellen gefunden werden konnte, steht hierbei im Einklang mit aktuellen Ergebnissen zur embryonalen Abstammung der Zellen des Sinusknotens. So ist die Abstammung der Mehrzahl der myokardialen Zellen des Herzens durch eine frühe und anhaltende Expression von Nkx2.5 gekennzeichnet. Im Unterschied hierzu wird die Region des Sinusknotens vermutlich durch eine Tbx18⁺/Islet-1⁺ Vorläuferpopulation gebildet, die keine Expression von Nkx2.5 besitzt (Mommersteeg et al. 2007; Mommersteeg et al. 2010). Diese Expression von Tbx18 und Islet-1 bleibt nach Differenzierung der Zellen weiter erhalten. Damit ist die Koexpression von Islet-1 und Tbx18 für die Entwicklung des Sinusknotens notwendig (Mommersteeg et al. 2010).

In der Arbeit von Sun et al. (2007) zur embryonalen Expression von Islet-1 konnte in einem HCN-4-H2B-GFP Knock-in Modell eine Kolo-kalisation von Islet-1 und GFP in der Region des Sinusknotens nachgewiesen werden. Somit wurde indirekt gezeigt, dass Islet-1 in embryonalen Schrittmacherzellen exprimiert wird. Die Daten von Sun et al. (2007) zeigten für den rechten Vorhof mit Fortschreiten der kardialen Entwicklung eine mehr und mehr lokalisierte Islet-1 Expression. Die Ergebnisse der Studie wurden von den Autoren dahingehend interpretiert, dass obwohl die Islet-1 Expression im Sinusknoten postnatal weiter bestand, diese in der darauf folgenden Entwicklungsphase verloren gehen würde. Unsere Ergebnisse zeigten nun erstmalig, dass auch im erwachsenden Sinusknoten Islet-1⁺ Zellen existieren. Im Unterschied zu bewährten Markern des erwachsenen Sinusknoten wie z.B. HCN4 wurde Islet-1 nicht im AV-Knoten und anderen Zellen des Reizleitungssystems exprimiert. In der Arbeit von Liang et al. (2013) wurde gezeigt, dass während der Embryonalentwicklung >99% aller Zellen des Sinusknoten eine Expression von Islet-1 zeigen. Insbesondere im zentralen Anteil des Sinusknotens sind die Zellen Islet-1⁺ und TBX18⁺ und exprimieren ab Embryonaltag 10.5 auch HCN4.

Liang et al. (2013) schlussfolgern hiernach, dass einzelne Regionen des Erregungsleitungssystems verschiedenen Vorläuferzellen zugeordnet werden können. Für die Zellen im Zentrum des Sinusknotens konnte gezeigt werden, dass es sich um Vorläuferzellen handelt, die zu einem frühen Zeitpunkt eine Expression von Islet-1 zeigen und dann nach E 16.5 ebenfalls HCN4 exprimieren. Die Aufschlüsselung dieses Transkriptionsnetzwerks ist insbesondere im Hinblick auf die Differenzierung von verschiedenen Zelltypen des Reizleitungssystems aus

Diskussion

pluripotenten Stammzellen als Ansatz zur gezielten Differenzierung kardialer Schrittmacherzellen von großem Interesse. So zeigen erste Ergebnisse an induzierten pluripotenten Stammzellen, dass eine Überexpression von Islet-1, zu einem erhöhten Anteil an nodalen Zellen während der kardialen Differenzierung führt (Goedel et al. 2014).

Eine aktuelle Arbeit zum Sinusknoten im Zebrafisch zeigt, dass Islet-1 eine weitere wichtige Rolle bei der Regulation der Herzfrequenz im embryonalen und adulten Sinusknoten besitzt (Tessadori et al. 2012). Im Unterschied zur Maus, wo der homozygote Knock-Out des Islet-1 Gens letal verläuft, ist dies beim Zebrafisch nicht der Fall. Dies ermöglichte Untersuchungen zum kardialen Phänotyp des homozygoten Knock-Outs. In der Studie von Tessadori et al. (2012) konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von Islet-1 zu einer Störung der Schrittmacherfunktion führte. Zunächst kam es zum Auftreten von Bradykardien und im weiteren Verlauf zum vermehrten Auftreten von sinuatrialen Pausen bis hin zum Sinus-Arrest.

Hoffmann et al. (2013) zeigten in ihrer Arbeit zum embryonalen Sinusknoten, dass die lokale Expression von Islet-1 im Sinusknoten durch Shox2, einem Transkriptionsfaktor der Entwicklung des Sinusknotens, stimuliert wird. Die Expression von Islet-1 wird dabei von Shox2 über direkte Interaktion mit einem Intron des Islet-1-Gens verstärkt. Der Knock-Out von Shox2 führt im Zebrafisch ähnlich wie der Knock-Out von Islet-1 zu einer Bradykardie und zu einem Verlust der Expression von Islet-1 im Bereich des Sinusknotens, nicht aber im Bereich des Ausflusstraktes. Durch künstliche Überexpression von Islet-1 während der erst 72h der Embryonalentwicklung, konnte die typische Entwicklung von Bradykardien und Ausbildung eines perikardialen Ödem verhindert werden (Hoffmann et al. 2013). Damit zeigten die Autoren der Studie erstmalig, dass Islet-1 ein Ziel von Shox2 ist und Teil eines Mechanismus zur Regulation des Transkriptionsnetzwerks des Reizleitungssystems darstellt.

Wir konnten durch die Isolierung von humaner mRNA aus dem Sinusknoten nachweisen, dass Islet-1 auch im menschlichen Sinusknoten exprimiert wird. Es ist jedoch weiterhin ungeklärt, über welche Signalwege Islet-1 seine Funktion in der Entwicklung der Schrittmacherzellen ausübt oder welche physiologische Rolle die Expression von Islet-1 im Sinusknoten nach der Embryonalentwicklung besitzt. Die

Klärung der Frage, ob und in wieweit Islet-1 und Shox2 in die Entstehung von Erkrankungen des Reizleitungssystems involviert sind, könnte dazu beitragen diese in Zukunft besser zu verstehen (Hoffmann et al. 2013).

4.4 Handelt es sich bei Islet-1 um einen Marker kardialer Vorläuferzellen im adulten murinen Herzen?

Mehrere Arbeiten haben in den letzten Jahren Hinweise liefern können, dass es im gesunden Herzen eine basale Erneuerung der Kardiomyozyten gibt (Hsieh et al. 2007; Bergmann et al. 2009). Unklar ist hierbei, ob Kardiomyozyten oder kardiale Vorläuferzellen die Quelle für die neugebildeten Zellen darstellen (Garbern and Lee 2013). Für das Herz wurde bereits eine Vielzahl solcher möglicher kardialer Vorläuferzellpopulationen beschrieben (Garbern and Lee 2013). Damit unterscheidet es sich deutlich von anderen Organen wie z. B. dem Skelettmuskel, dessen Satelliten-Zellen als Stammzellen anhand des Markerprotein *Pax7* eindeutig charakterisiert werden konnten (Seale et al. 2000). Die bis zum jetzigen Zeitpunkt beschriebenen Zellpopulationen im adulten Herzen zeigen nur Hinweise eines Vorläuferzellpotentials, das in der Regel auf Versuchen zum Nachweis einer Differenzierung zu Kardiomyozyten beruht. Sollten tatsächlich eine oder mehrere Vorläuferzellpopulationen existieren, sind die geringe Anzahl der Zellen und das physiologisch geringe Proliferationspotential einer der Hauptgründe, warum die Fähigkeit zur Zellerneuerung nach einem Infarkt nicht suffizient ist (Kühl and Kühl 2011).

Unsere Arbeit fokussierte sich auf Islet-1 als einen möglichen Marker adulter kardialer Vorläuferzellen. Es wurden dabei verschiedene Zeitpunkte untersucht, um auch eine möglicherweise nur transiente Hochregulation der Expression abbilden zu können. Eine undifferenzierte Population Islet-1⁺ Zellen, die möglicherweise ein proliferatives Potential besitzt, konnte jedoch nicht identifiziert werden. Durch das verwendete Reportermausmodell konnte eine Islet-1 Expression in den spezifischen Regionen über den gesamten Untersuchungszeitraum (Alter 1 bis 18 Monate) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Islet-1 nur in differenzierten Zellen spezifischer Gewebe

Diskussion

exprimiert wird. Hierbei handelt es sich um glatte Muskelzellen, Schrittmacherzellen, Kardiomyozyten der Ausflusstraktes und Ganglienzellen des Herzens. Eine alleinige Islet-1 Expression definiert somit nicht per se eine kardiale Vorläuferzelle. Die genaue physiologische Funktion der Islet-1 Expression in den spezifischen Geweben bleibt jedoch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Durch diese Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass das Konzept eines Markers zur Identifizierung kardialer Vorläuferzellen zumindest für Islet-1⁺ Zellen nicht zu halten ist. Wahrscheinlicher erscheint es, dass es notwendig ist, eine Kombination mehrerer molekularer Oberflächen- und Proliferationsmarker zu finden, durch die sich möglicherweise eine Vorläuferzellpopulation identifizieren lässt.

In den Untersuchungen zur Islet-1 Expression nach einem Myokardinfarkt fanden sich in 12 von 13 Herzen keine nLacZ⁺ Zellen der Infarktregion. Einzig zum Zeitpunkt 7 Tage nach Infarkt ließen sich bei einem Tier ~10 untypisch nukleär gefärbte nLacZ⁺ Zellen identifizieren, bei denen nicht eindeutig feststeht, ob diese eine Islet-1 Expression abbilden. Hieraus würden sich 10 Islet-1⁺ Zellen pro ca. 25 Millionen analysierte Zellen errechnen. Diese Zellen sind jedoch möglicherweise einer unspezifischen Farbreaktion geschuldet (siehe Kap 4.1). Wahrscheinlich handelte es sich jedoch um Islet-1⁺ Zellen aus der Region des Ausflusstraktes, die zum einen aufgrund der Zellschädigung eine untypische Anfärbung zeigten und zum Anderen aufgrund der Größe des Infarktes initial nicht dem Ausflusstrakt zugeordnet wurden. Dieser Befund zeigt zum einen die hohe Sensitivität, die es erlaubt, zehn positive Zellen bei einem von 13 untersuchten Tieren zu identifizieren. Andererseits wird hier auch eine Limitation sichtbar. Bei so wenigen, zudem nur fraglich positiven Zellen, ist eine Charakterisierung nicht sicher möglich. Eine relevante biologische Rolle erscheint jedoch bei nur 10 positiven Zellen sehr unwahrscheinlich.

Smart et al. (2011) zeigten, dass es bei Mäusen, die prophylaktisch Thymosin-β4 erhielten, zu einer Neubildung von Kardiomyozyten nach einem Myokardinfarkt kam. Ein Nebenbefund der Studie war, dass es zu einem Anstieg der Islet-1 mRNA 2 Tage nach dem Infarkt kam und die Expression bei 7 Tagen nach Infarkt einen Peak zeigte. Die Autoren interpretieren diesen Anstieg als Korrelat einer vermehrten Aktivierung kardialer Vorläuferzellen, die eine Neubildung von Kardiomyozyten in der Studie bewirkten. Im Unterschied zu den Daten von Smart et al. (2011) zeigen

Diskussion

Untersuchungen in unserem Labor keine Hinweise für eine Reexpression von Islet-1 im Bereich des epikardialen Ventrikels. Hierzu wurden ebenfalls Untersuchungen in einem Model eines mit Thymosin- β 4 aktivierten Herzens mit der Isl1-nLacZ-Reportermaus durchgeführt. Es konnte hier keine Expression oder Reexpression Islet-1⁺Zellen auf Ebene des Ventrikels gefunden werden (Nicol et al. 2014). Da es sich jedoch nicht um ein *linage-tracing* Modell handelte, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass eine Islet-1⁺Vorläuferzellpopulation nicht erfasst wurde.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen zusammenfassend aus mehreren Gründen gegen eine adulte Islet-1⁺ Vorläuferzellpopulation:

1. Alle im Herzen nachgewiesenen Islet-1⁺ Zellen zeigten einen konstant hohen Grad der Differenzierung.
2. Es konnte zu keinem Zeitpunkt eine Islet-1⁺ Zellpopulation im Bereich der Ventrikel identifiziert werden.
3. Es fand sich darüber hinausgehend auch im Model eines Myokardinfarktes kein Hinweis für ein Islet-1 Expression.

5 Ausblick

Die Behandlungsmöglichkeiten der Herzinsuffizienz als Folge eines massiven Zelluntergangs sind weiterhin nicht zufriedenstellend. Regenerative Strategien sind deshalb von großem Interesse in der klinisch orientierten Grundlagenforschung. Obwohl inzwischen viele verschiedene endogene kardiale Vorläuferzellen beschrieben wurden ist die Existenz einer solchen Population weiterhin nicht abschließend geklärt. Die in dieser Arbeit untersuchte Population Islet-1⁺ Zellen im erwachsenen Herz stellt den Ergebnissen nach keine solche endogene kardiale Vorläuferzellpopulation dar. Dies wird weiter unterstrichen durch aktuelle Arbeiten in unserem Labor, in denen die Proliferationsfähigkeit von ~28.000 adulten Islet-1⁺ Zellen mit einem Tritium-Thymidin verwendenden Proliferations-Assay untersucht wurde (Weinberger et al. 2015). Hierzu wurde ebenfalls das Isl1-nLacZ-Reportermausmodell verwendet. In diesen Untersuchungen konnte keine proliferierende Islet-1⁺ Zelle nachgewiesen werden (n = 3 Tiere).

Dieses Ergebnis unterstreicht die aus dieser Arbeit gewonnenen Hinweise und lässt den Schluss zu, dass Islet-1 kein Marker adulter kardialer Vorläuferzellen darstellt.

Islet-1 scheint hingegen eine wichtige neue Rolle im Sinusknoten zu besitzen. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass Islet-1 einen Marker für erwachsene Sinusknotenzellen darstellt. Mehrere Arbeiten haben inzwischen gezeigt, dass Islet-1 zur Aufrechterhaltung der Sinusknotenfunktion im Embryo notwendig ist. Aktuell ist unklar, ob Islet-1 im Sinusknoten des erwachsenen Herz ebenfalls notwendig ist und insbesondere ob Islet-1 eine Rolle bei der Entstehung von Sinusknotendysfunktionen spielt.

6 Zusammenfassung

Islet-1 ist ein Transkriptionsfaktor und molekularer Marker kardialer Vorläuferzellen in der Embryonalentwicklung. Ziel dieser Arbeit war es die regionale Verteilung und Identität von Islet-1⁺ Zellen im adulten murinen Herzen zu untersuchen. Hierfür wurde ein transgenes Reportermausmodell mit einer im Lokus des Islet-1 Gens inserierten nukleären β -Galactosidase verwendet (Isl-1-nLacZ-Maus). Die Mausherzen wurden mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) gefärbt und sequenzielle Kryoschnitte in einem Vierkammerblick wurden angefertigt. Anschließend wurden die Zellen immunhistochemisch und in der Immunfluoreszenz charakterisiert. Um die Rolle von Islet-1 während der kardialen Regeneration zu untersuchen, führten wir die genannten Untersuchungen ebenfalls in einem Modell des künstlich induzierten Myokardinfarktes durch. Die Studie zeigte folgende Erkenntnisse:

- Islet-1⁺ Zellen wurden im adulten murinen Herz in drei verschiedenen Regionen nachgewiesen. Bei diesen handelte es sich um definierte Populationen des Sinusknotens, kardiale Ganglien sowie Zellen im Bereich des proximalen Ausflusstraktes.
- Es wurden keine Islet-1⁺ Zellen im gesunden Ventrikel des adulten murinen Herzens nachgewiesen.
- Es wurden keine Islet-1⁺ Zellen nach einem Myokardinfarkt im Ventrikel lokalisiert.
- Diese Arbeit etablierte Islet-1 als molekularen Marker des Sinusknotens.

Islet-1 markiert somit nach den Ergebnissen dieser Arbeit im Herzen der erwachsenen Maus, anders als in der Embryonalentwicklung, keine Vorläuferzellpopulation. Vielmehr sprechen die vorliegenden Befunde für eine Rolle von Islet-1 im adulten Sinusknoten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um mögliche Zusammenhänge zwischen einer gestörten Expression von Islet-1 und kardialen Arrhythmien oder Erkrankungen des Sinusknotens aufzudecken.

7 Summary

The transcription factor Islet-1 (Isl-1) is a marker of cardiovascular progenitors. The aim of this study was to investigate the distribution of Islet-1 positive cells, further characterize these cells and to evaluate whether they possess a regenerative potential after myocardial infarction (MI). The distribution of Islet-1⁺ cells in adult heart was investigated using gene targeted mice with nuclear β -galactosidase inserted into the Islet-1 locus (Isl-1-nLacZ-mice). Mouse hearts were stained with bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside (X-gal) and subsequently cryosections were performed in a four-chamber view. Further characterization was done by immunohistochemistry and immunofluorescence.

- Islet-1 was expressed in three different regions of the adult murine heart. These were a defined population of sinus node cells, cardiac ganglion cells as well as cells in the region of the proximal outflow tract.
- Islet-1 was not expressed in the healthy ventricle of the adult murine heart.
- Islet-1 was not expressed in the region of the ventricles after induced myocardial infarction.
- This work established Islet-1 as molecular marker of the sinus node.

We did not find any evidence for Islet-1 being a marker for a population of cardiac progenitors in the adult heart. The absence of Islet-1⁺ cells in the infarct region argues against a role of Islet-1 in cardiac regeneration after MI. However, our data point to a role for islet-1 in the adult sinus node. Further studies are necessary to elucidate this function. They could reveal a possible relationship of a disturbed expression of Islet-1 and cardiac arrhythmias or diseases of the sinus node.

8 Literaturverzeichnis

- Andersen DC, Andersen P, Schneider M, et al. (2009) Murine “cardiospheres” are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells* 27:1571–81.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. (2003) Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* 114:763–776.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. (2001) Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 344:1750–1757.
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98–102.
- Van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, et al. (2014) C-Kit⁺ Cells Minimally Contribute Cardiomyocytes To the Heart. *Nature* 509:337–41.
- Bolli R, Chugh AR, D’Amario D, et al. (2011) Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 378:1847–57.
- Brade T, Pane LS, Moretti A, et al. (2013) Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a013847.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S (2005) Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6:826–35.
- Bui AL, Horwich TB, Fonarow GC (2011) Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nat Rev Cardiol* 8:30–41.
- Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. (2003) Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5:877–889.
- Cai C-L, Martin JC, Sun Y, et al. (2008) A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454:104–8.
- Chen J, Hsieh AF-C, Dharmarajan K, et al. (2013) National trends in heart failure hospitalization after acute myocardial infarction for Medicare beneficiaries: 1998-2010. *Circulation* 128:2577–84.
- Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, et al. (2009) Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* 458:E8–9; discussion E9–10.
- Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, et al. (2012) Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD006536.
- Davie A (1997) Assessing diagnosis in heart failure: which features are any use? *QJM* 90:335–339.

Literaturverzeichnis

- Davis J, Maillet M, Miano JM, Molkentin JD (2012) Lost in Transgenesis: A User's Guide for Genetically Manipulating the Mouse in Cardiac Research. *Circ Res* 111:761–777.
- Davis J, Molkentin JD (2014) Myofibroblasts: trust your heart and let fate decide. *J Mol Cell Cardiol* 70:9–18.
- Dong J, Asa SL, Drucker DJ (1991) Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*. *Mol Endocrinol* 5:1633–41.
- Du A, Hunter CS, Murray J, et al. (2009) Islet-1 is Required for the Maturation, Proliferation, and Survival of the Endocrine Pancreas. *Diabetes* 58:2059–2069.
- Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, et al. (2013) Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell* 154:827–42.
- Elshatory Y, Deng M, Xie X, Gan L (2007) Expression of the LIM-homeodomain protein *Isl1* in the developing and mature mouse retina. *J Comp Neurol* 503:182–97.
- Engleka KA, Manderfield LJ, Brust RD, et al. (2012) Islet1 Derivatives in the Heart Are of Both Neural Crest and Second Heart Field Origin. *Circ Res* 110:922–926.
- Eschenhagen T (2008) Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die. *Nat Med* 14:485–7.
- Francis DP, Mielewczik M, Zargaran D, Cole GD (2013) Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in heart disease: Discrepancies and contradictions. *Int J Cardiol*. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.04.152
- Garbern JC, Lee RT (2013) Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. *Cell Stem Cell* 12:689–698.
- Genead R, Danielsson C, Andersson AB, et al. (2010) Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan: from the embryonic stage to adulthood. *Stem Cells Dev* 19:1601–1615.
- Goedel A, Dorn T, Lam J, et al. (2014) V1176 - Direct Nkx2.5 inhibition of *Isl1* controls cardiomyocyte lineage restriction. *Clin Res Cardiol* 103:1–1.
- Guo T, Wang W, Zhang H, et al. (2011) ISL1 Promotes Pancreatic Islet Cell Proliferation. *PLoS One* 6:e22387.
- Hoffmann S, Berger IM, Glaser A, et al. (2013) Islet1 is a direct transcriptional target of the homeodomain transcription factor *Shox2* and rescues the *Shox2*-mediated bradycardia. *Basic Res Cardiol* 108:339.
- Hong KU, Bolli R (2014) Cardiac stem cell therapy for cardiac repair. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 16:324.

Literaturverzeichnis

- Hoover DB, Ganote CE, Ferguson SM, et al. (2004) Localization of cholinergic innervation in guinea pig heart by immunohistochemistry for high-affinity choline transporters. *Cardiovasc Res* 62:112–21.
- Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. (2007) Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 13:970–4.
- Hudson REB (1963) The human conducting-system and its examination. *J Clin Pathol* 16:492–498.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. (2005) ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guideli. *Circulation* 112:e154–235.
- Jesty SA, Steffey M a, Lee FK, et al. (2012) C-Kit+ Precursors Support Postinfarction Myogenesis in the Neonatal, But Not Adult, Heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:13380–5.
- Jhund PS, Macintyre K, Simpson CR, et al. (2009) Long-term trends in first hospitalization for heart failure and subsequent survival between 1986 and 2003: a population study of 5.1 million people. *Circulation* 119:515–23.
- Johnston P V, Sasano T, Mills K, et al. (2009) Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 120:1075–83, 7 p following 1083.
- Karlsson O, Thor S, Norberg T, et al. (1990) Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344:879–882.
- Khattar P, Friedrich FW, Bonne G, et al. (2010) Distinction Between Two Populations of Islet-1-Positive Cells in Hearts of Different Murine Strains. *Stem Cells Dev.* doi: 10.1089/scd.2010.0374
- Kiernan JA (2007) Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotech Histochem* 82:73–103.
- Koelle GB, Wagner HH (1955) THE HISTOCHEMICAL IDENTIFICATION OF ACETYLCHOLINESTERASE IN CHOLINERGIC, ADRENERGIC AND SENSORY NEURONS. *J Pharmacol Exp Ther* 114:167–184.
- Kühl SJ, Kühl M (2011) Improving cardiac regeneration after injury: are we a step closer? *Bioessays* 33:669–73.
- Laflamme MA, Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nature* 473:326–35.
- Laugwitz KL, Moretti A, Caron L, et al. (2008) Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 135:193–205.

Literaturverzeichnis

- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433:647–653.
- Lee S-T, White AJ, Matsushita S, et al. (2011) Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 57:455–65.
- Li A, Ponten F, dos Remedios CG (2012) The interactome of LIM domain proteins: the contributions of LIM domain proteins to heart failure and heart development. *Proteomics* 12:203–25.
- Liang X, Wang G, Lin L, et al. (2013) HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res* 113:399–407.
- Liu SS, Monti J, Kargbo HM, et al. (2013) Frontiers of therapy for patients with heart failure. *Am J Med* 126:6–12.e6.
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2095–128.
- Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. (2012) Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379:895–904.
- Mangoni ME, Nargeot J (2001) Properties of the hyperpolarization-activated current (I_f) in isolated mouse sino-atrial cells. *Cardiovasc Res* 52:51–64.
- Mangoni ME, Nargeot J (2008) Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol Rev* 88:919–982.
- Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al. (2004) Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 265:262–275.
- Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al. (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 279:11384–91.
- McMurray JJ V, Adamopoulos S, Anker SD, et al. (2012) ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *Eur Heart J* 33:1787–847.
- Meilhac SM (2003) A retrospective clonal analysis of the myocardium reveals two phases of clonal growth in the developing mouse heart. *Development* 130:3877–3889.
- Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 95:911–21.

Literaturverzeichnis

- Mommersteeg MT, Dominguez JN, Wiese C, et al. (2010) The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. *Cardiovasc Res* 87:92–101.
- Mommersteeg MT, Hoogaars WM, Prall OW, et al. (2007) Molecular pathway for the localized formation of the sinoatrial node. *Circ Res* 100:354–362.
- Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, et al. (2010) The Anatomy and Physiology of the Sinoatrial Node—A Contemporary Review. *Pacing Clin Electrophysiol* 33:1392–1406.
- Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. (2006) Multipotent embryonic *Isl1*⁺ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127:1151–1165.
- Moretti A, Lam J, Evans SM, Laugwitz KL (2007) Biology of *Isl1*⁺ cardiac progenitor cells in development and disease. *Cell Mol Life Sci* 64:674–682.
- Nicol P, Weinberger F, Starbatty J, et al. (2014) V1180 - The effect of thymosin beta-4 on the *Islet-1* expression in the adult murine heart. *Clin Res Cardiol* 103:1–1.
- Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, et al. (1996) Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. *Cell* 84:309–320.
- Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. (2005) CD31⁻ but Not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res* 97:52–61.
- Reinecke H, Minami E, Zhu W-Z, Laflamme MA (2008) Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circ Res* 103:1058–71.
- Rudat C, Kispert A (2012) *Wt1* and epicardial fate mapping. *Circ Res* 111:165–9.
- Saga Y, Miyagawa-Tomita S, Takagi a, et al. (1999) *MesP1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126:3437–47.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-gabardo A, et al. (2000) *Pax7* Is Required for the Specification of Myogenic Satellite Cells. *Circ Res* 102:777–786.
- Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493:433–6.
- Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. (2011) De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature*. doi: 10.1038/nature10188
- Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. (2007) Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 115:896–908.

Literaturverzeichnis

- Snippert HJ, Clevers H (2011) Tracking adult stem cells. *EMBO Rep* 12:113–22.
- Soonpaa MH, Field LJ (1998) Survey of Studies Examining Mammalian Cardiomyocyte DNA Synthesis. *Circ Res* 83:15–26.
- Statistisches Bundesamt (2013) Statistisches Bundesamt Gesundheit Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle).
- Stewart S (2003) Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 89:49–53.
- Sun Y, Liang X, Najafi N, et al. (2007) Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* 304:286–296.
- Tallini YN, Greene KS, Craven M, et al. (2009) C-Kit Expression Identifies Cardiovascular Precursors in the Neonatal Heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1808–13.
- Tessadori F, van Weerd JH, Burkhard SB, et al. (2012) Identification and functional characterization of cardiac pacemaker cells in zebrafish. *PLoS One* 7:e47644.
- Thor S, Andersson SG, Tomlinson A, Thomas JB (1999) A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397:76–80.
- Vincent SD, Buckingham ME (2010) How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol* 90:1–41.
- Weinberger F, Mehrkens D, Starbatty J, et al. (2015) Biochemical and Biophysical Research Communications Assessment of DNA synthesis in Islet-1 + cells in the adult murine heart. *Biochem Biophys Res Commun* 456:294–297.
- Witman N, Murtuza B, Davis B, et al. (2011) Recapitulation of developmental cardiogenesis governs the morphological and functional regeneration of adult newt hearts following injury. *Dev Biol* 354:67–76.
- Zaruba M-M, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ (2010) Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation* 121:1992–2000.
- Zarzoso M, Rysevaite K, Milstein ML, et al. (2013) Nerves projecting from the intrinsic cardiac ganglia of the pulmonary veins modulate sinoatrial node pacemaker function. *Cardiovasc Res* 99:566–75.
- Zeisberg EM, Kalluri R (2010) Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res* 107:1304–12.
- Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454:109–13.

Literaturverzeichnis

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, et al. (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. 7:1028–1034.

9 Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

F. Weinberger*, **D. Mehrkens***, F.W. Friedrich, M. Stubbendorff, X. Hua, J.C. Müller, S. Schrepfer, S.M. Evans, L. Carrier, T. Eschenhagen. (2012) *Localization of Islet-1-Positive Cells in the Healthy and Infarcted Adult Murine Heart*. *Circ Res*. 110:1303–1310. * geteilte Erst-Autorenschaft

Weinberger F*, **Mehrkens D***, Starbatty J, et al. (2015) *Assessment of DNA synthesis in Islet-1(+) cells in the adult murine heart*. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 456:294–297. * geteilte Erst-Autorenschaft

9.2 Kongressbeiträge

D. Mehrkens, F. Weinberger, X. Hua, F. W. Friedrich, S. Evans, S. Schrepfer, L. Carrier, T. Eschenhagen. *Islet-1 marks the sinoatrial node and parasympathetic ganglia in the adult murine and human heart*. The XXX Annual Meeting of the European Section of the International Society of Heart Research. 26-29 June 2011, Technion IIT Haifa, Israel

F. Weinberger, **D. Mehrkens**, X. Hua, F. W. Friedrich, S. Evans, S. Schrepfer, L. Carrier, T. Eschenhagen. *Islet-1 in the adult murine heart*. *Clin Res Cardiol* 100, Suppl 1, April 2011, 706 Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2011, Mannheim

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen danke ich für die Vergabe des Promotionsthemas und der Möglichkeit diese Arbeit in dem Institut der Experimentellen Pharmakologie unter ausgezeichneten Bedingungen durchführen zu können. Insbesondere für die wöchentlichen Besprechungen und die stetige Förderung die eigenen Ergebnisse präsentieren und diskutieren zu können, bin ich sehr dankbar.

Ganz besonders großen Dank schulde ich meinem Betreuer Florian Weinberger, der mir von Beginn an viel Freude beim wissenschaftlichen Arbeiten vermittelte und früh ein guter Freund geworden ist. Seine wissenschaftliche Expertise, sein Enthusiasmus und seine Ideen haben mich in einer Weise geprägt, wie es sicherlich kaum jemand anderes getan hätte.

Jutta Starbatty danke ich für die freundliche Aufnahme und Einweisung in die Labortätigkeiten in unserer zunächst kleinen Arbeitsgruppe, die stetig an Größe zunahm. Zusammen erarbeiteten wir unzählige histologische Proben und sie brachte mir alles von der „Pike“ auf bei. Besonders in Erinnerung geblieben ist sicherlich auch die Reise zum Kongress nach Haifa mit Marc Hirt, die zu den ganz besonderen Erfahrungen während meiner Doktorarbeit zählte.

Ich danke auch Dr. rer. nat. Melanie Neumann von der HEXT *Mousepathology Facility* für die Hilfe bei den immunhistochemischen Färbungen. Weiterhin danke ich der Werner-Otto-Stiftung für die Gewährung eines Stipendiums und die finanzielle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Eltern bin ich für die fortdauernde, liebevolle Unterstützung während meines Lebens dankbar. Zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin Natalie, die stets Verständnis zeigte, wenn ich meine Zeit am Wochenende im Labor verbrachte und die immer für mich da war.

Lebenslauf

11 Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12 Eidesstaatliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Datum.....

Unterschrift.....