

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

Der Einfluss von Thymosin Beta-4 auf die Expression von Islet-1 im adulten Herzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizinischen Fakultät der

Universität Hamburg

vorgelegt von

Philipp Nicol

aus Stuttgart

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 30.09.2016

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Michael Rink

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Karsten Sydow

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	Komplementäre DNA
ChAT	Cholinacetyltransferase
DIC	Differential interference contrast
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSMO	Dimethylsulfoxid
ES	Embryonale Stammzellen
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunden
HE	Hämatoxylin und Eosin
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
LVAD	Left ventricular aiding device
M	Mol/l
Mg ²⁺	Magnesium
Min	Minuten
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Sek	Sekunden
β-Gal	β-Galactosidase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Herzinsuffizienz	7
1.1.1	Epidemiologie	7
1.1.2	Pathophysiologie	7
1.2	Kardiale Regeneration	9
1.3	Vorläuferzellen	11
1.3.1	Epikardiale Vorläuferzellen (EPDC)	12
1.4	Herzentwicklung und Islet - 1	14
1.5	Thymosin Beta-4 (TB4)	18
1.5.1	TB4 im Herzen	19
1.6	Islet-1 unter dem Einfluss von TB4	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Mausmodell	22
2.2	Histologie	22
2.2.1	X-Gal-Färbung von ganzen Herzen	22
2.2.2	Einbettung von Gewebe für Kryoschnitte	23
2.2.3	Anfertigung von Kryoschnitten	24
2.2.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	24
2.2.5	Sirius-Rot-Färbung	26
2.2.6	Acetylcholinesterasefärbung	27
2.2.7	Immunfluoreszenz	28
2.3	Zellbiologische Methoden	30
2.3.1	Kultur von EPDCs aus Isl1-nLacZ-Mäusen	30
2.3.2	X-Gal-Färbung von EPDCs	31
2.3.3	Immunfluoreszenz von EPDCs	31
2.4	Myokardinfarktmodell der Maus	31
2.5	Applikation von Thymosin Beta-4 (TB4)	32
2.6	Messung von CD31 in Gewebeschnitten	32
2.7	Geräte	33
2.8	Materialien	34
2.9	Substanzen und Lösungen	34
2.10	Verwendete Antikörper	37

2.10.1	Erste Antikörper	37
2.10.2	Zweite Antikörper	38
2.11	Verwendete Computerprogramme	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Gewichtskontrolle im Laufe der Intervention	40
3.2	Einfluss von TB4 auf Islet-1 ohne LAD-Ligatur	40
3.3	Einfluss von TB4 auf Islet-1 nach LAD-Ligatur	42
3.3.1	Bestimmung der Infarktgröße	43
3.3.2	Islet-1-positive Zellen	45
3.4	Nachweis von CD31 im infarzierten Herzen nach 7 Tagen	54
3.5	Kultivierung von Zellen aus Islet1-nLacZ-Mäusen	56
3.5.1	Kultivierung von Zellen aus verschiedenen Bereichen des Herzens und immunzytologische Charakterisierung	56
3.5.2	Kultivierung von Zellen über 14 Tage	65
4	Diskussion	68
4.1	Der Nachweis von Islet-1 mittels eines transgenen Mausmodells – Vorteile und Limitationen	68
4.2	Wirkung von TB4 auf gesundes Myokard	70
4.3	Wirkung von TB4 auf infarziertes Myokard	71
4.3.1	Infarktgröße	71
4.3.2	Islet-1-positive Zellen	72
4.3.3	Neoangiogenese	77
4.4	Einfluss von TB4 auf Zellen in-vitro	78
4.5	Diskrepanzen zu veröffentlichten Arbeiten	80
5	Ausblick	85
6	Zusammenfassung	86
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	88
9	Veröffentlichungen/Kongressbeiträge	95
10	Danksagung	96
11	Lebenslauf	97

12 Eidesstaatliche Versicherung

98

13 Anhang

99

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Epidemiologie

Herz-Kreislaufkrankungen sind nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Hierbei steht die Herzinsuffizienz mit über 45.000 Todesfällen jährlich an dritter Stelle in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2014). Eine Herzinsuffizienz besteht, wenn das Herz als zentrales Pumporgan des Kreislaufs nicht mehr in der Lage ist, ohne Erhöhung des enddiastolischen Drucks die Körperperipherie ausreichend mit oxygeniertem Blut zu versorgen. Die muskuläre Pumpschwäche des Ventrikels kann Folge einer lang bestehenden arteriellen Hypertonie, eines Myokardinfarkts oder einer Stenose der Aortenklappe sein. Infektionen und genetische Mutationen an Proteinen des kontraktile Apparates der Kardiomyozyten können ebenso ursächlich sein (Ho et al. 1993). Langfristig kommt es über eine Ischämie der Herzmuskulatur zu einem irreversiblen Untergang von kontraktionsfähigen Kardiomyozyten und letztendlich zur Dilatation des Herzmuskels. Über verschiedene Mechanismen versucht der Organismus den nicht gedeckten Sauerstoffbedarf auszugleichen. Insbesondere neuroendokrine Vorgänge (vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen, Sympathikusaktivierung, Aktivierung des RAAS, erhöhte Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (ADH)) helfen im Anfangsstadium der Erkrankung, das benötigte Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. Sie steigern die Frequenz und Kontraktionskraft des Herzens und führen über Flüssigkeitsretention zur Erhöhung des Herzzeitvolumens. Im weiteren Krankheitsverlauf verschlechtern die initial positiven Mechanismen, z.B. über eine durch die Vasokonstriktion bedingte Erhöhung der Nachlast, das klinische Bild des kranken Herzens (Abb. 1).

1.1.2 Pathophysiologie

Leitsymptom der Herzinsuffizienz ist die Dyspnoe, zunächst bei körperlicher Belastung, später auch unter Ruhe. Weitere Symptome sind Abgeschlagenheit und periphere Ödeme. Die Einteilung der Herzinsuffizienz erfolgt nach dem Leitsymptom Dyspnoe in die Stadien NYHA I (keine körperliche Einschränkung) bis NYHA IV (Dyspnoe in Ruhe). Die Herzschwäche kann z.B. über lebensbedrohliche

Arrhythmien zum plötzlichen Herztod führen. Letztlich geht die Tatsache, dass mehr Menschen einen Herzinfarkt überleben, mit einer erhöhten Prävalenz der Herzinsuffizienz einher (Velagaleti et al. 2008).

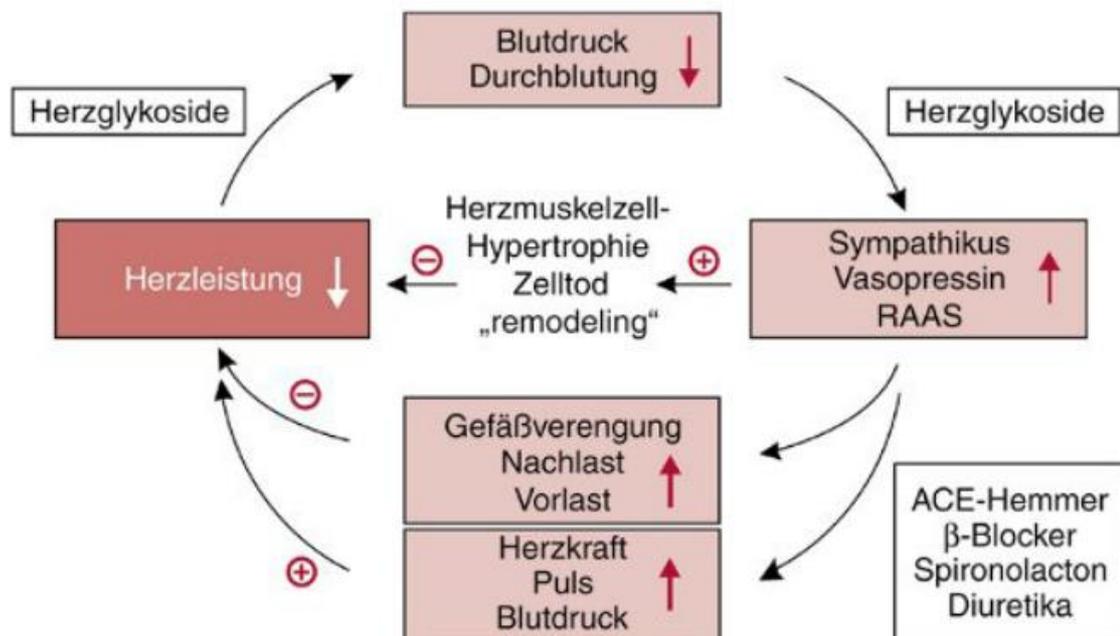


Abb. 1: Pathophysiologischer Mechanismus bei Herzinsuffizienz. Die Herzinsuffizienz führt zu einem reduzierten Herzzeitvolumen, welches durch protektive Mechanismen versucht wird auszugleichen. Diese kurzfristig positiven Vorgänge führen bei chronischer Aktivierung allerdings zu einer Verschlechterung (aus: El-Armouche and Eschenhagen 2009).

Standard in der medikamentösen Behandlung sind: Diuretika, Beta-Adrenorezeptorblocker (Beta-Blocker), ACE-Hemmer und Aldosteron-Antagonisten. Vor kurzem ist ein kombinierter Angiotensin-Rezeptorantagonist und Neprilysin-Inhibitor als neues Therapieprinzip dazugekommen (PARADIGM-Studie, Lefkowitz et al. 2014). Die einzige kausale Therapie besteht momentan in einer Herztransplantation, die jedoch aufgrund vielfältiger Probleme (geringe Anzahl von Spendern, immunologische Probleme) nur einem ausgewählten Patientenkreis zur Verfügung steht. Auch der Ansatz, die linksventrikuläre Pumpleistung über die Implantation eines LVAD (*left-ventricular assist device*) zu verbessern, stellt bei den meisten Patienten nur eine Übergangslösung dar („Bridge to transplant“), sodass die Prognose der Herzinsuffizienz nach wie vor schlecht ist. 40% aller wegen einer akuten Herzinsuffizienz hospitalisierten Patienten versterben in den nachfolgenden 12 Monaten (Scrutinio et al. 2014). Zudem waren auch neuere pharmakologische

Ansätze wie z.B. TNFalpha-Antagonisten oder Endothelinantagonisten nicht erfolgreich (Liu et al. 2013).

1.2 Kardiale Regeneration

Ein ungelöstes Problem bei der Therapie der Herzinsuffizienz ist der irreversible Verlust an Muskelmasse. Deswegen ist in den letzten Jahren ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt in den Fokus geraten: die Regeneration kardialen Gewebes.

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass das menschliche Herz als post-mitotisches Organ nicht fähig ist, verlorengegangene Kardiomyozyten zu regenerieren und deshalb auf wachsende Arbeitsleistung ausschließlich durch Zellhypertrophie reagieren kann. Verschiedene Forschungsergebnisse stellen dieses Dogma zunehmend in Frage. Dabei nutzte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Jonas Frisén die globale Erhöhung der atmosphärischen C_{14} -Konzentration während der Atomwaffentests im Kalten Krieg als Möglichkeit, das Alter von Zellen zu ermitteln. Die nach dem 2. Weltkrieg durchgeführten Tests führten zu einem schnellen Anstieg der C_{14} -Konzentration in der Atmosphäre. Nach dem Atomwaffensperrvertrag von 1963 nahm die atmosphärische C_{14} -Konzentration wieder rapide ab. C_{14} reagiert mit Sauerstoff zu CO_2 und wird im Zuge der Photosynthese von Pflanzen aufgenommen. Werden diese Pflanzen oder Tiere, die von diesen Pflanzen leben, von Menschen gegessen, so erhöht sich die Gesamtkonzentration an C_{14} im Körper. C_{14} wird in neu gebildete DNA inkorporiert. Dies geschieht insbesondere bei proliferierenden Zellen. Nach der Zellteilung bleibt die C_{14} -Konzentration weitestgehend stabil. Durch den Vergleich zwischen dem C_{14} -Gehalt in der DNA mit der atmosphärischen Konzentration kann auf das Entstehungsdatum der Zelle geschlossen werden. Wie erwartet, waren etwa 18% der nicht-Kardiomyozyten (z.B. Fibroblasten, glatte Muskelzellen) im Herzen jünger als der Patient, hatten sich also im Laufe des Lebens neu gebildet. Erstaunlicherweise hatten sich aber auch Kardiomyozyten regeneriert. Mathematische Modelle ergaben, dass im Alter von 10 Jahren circa 1% und im Alter von 75 Jahren ca. 0,4% der Kardiomyozyten jährlich neu gebildet werden. Rechnerisch würden sich dadurch im Laufe eines Lebens 45% der Kardiomyozyten erneuern (Bergmann et al. 2009; Bergmann et al. 2015). Diese Ergebnisse passen gut zu Ergebnissen von anderen Gruppen an Mäusen (Soonpaa and Field 1998).

Zu einem gänzlich anderen Ergebnis kommt die Arbeitsgruppe um Pierro Anversa. Diese nutzte das Thymidin-Analogon Iododeoxyuridin (IdU), welches bei der Tumorbehandlung eingesetzt wird. IdU wird in neu gebildete DNA eingebaut (z.B. in schnell proliferierende Tumorzellen) und macht diese Zellen sensibel für eine Strahlentherapie. In der histologischen Analyse von post-mortem Herzgewebe konnte IdU in 2,5% bis 46% der Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass eine deutliche höhere Anzahl an Kardiomyozyten proliferiert. Mathematisch wurde so auf einen jährlichen Kardiomyozytenumsatz von 22% geschlossen (Kajstura et al. 2010). Diese Zahlen bezüglich des Zellumsatzes liegen sehr hoch und sind fast so hoch wie bei einem Sarkom (50 – 70%). Sie überschätzen damit sehr wahrscheinlich das kardiale Regenerationspotential (Laflamme und Murry 2011).

Erstaunlicherweise ist das Herz neonataler Mäuse zu einer weitreichenden Regeneration fähig, verliert dieses Potential allerdings wenige Tage nach Geburt. (Porrello et al. 2011). Letztlich zeigt eine zunehmende Anzahl von Arbeiten, dass die Idee des Herzens als Organ, welches überhaupt nicht zur Regeneration fähig ist, in Frage gestellt werden muss. Andererseits stimmen die meisten Arbeiten darin überein, dass die Regenerationsrate im erwachsenen Säugetierherzen sehr niedrig liegt.

Unklar ist, aus welcher Quelle neue Kardiomyozyten entstehen. Einerseits könnten existierende Kardiomyozyten proliferieren, andererseits könnten kardiale Stamm- bzw. Vorläuferzellen zu Kardiomyozyten differenzieren. Bei Zebrafischen regeneriert das Herz nach experimenteller Amputation des Apex vollständig. Ein transgenes Modell konnte die Herkunft der Zellen aufklären. Es zeigte sich, dass die neugebildeten Kardiomyozyten durch die Proliferation von existierenden Kardiomyozyten entstanden (Jopling et al. 2010; Kikuchi et al. 2010).

Komplizierter ist die Situation bei Säugetieren. Hier gibt es aktuell widersprüchliche Befunde. Initial zeigte eine Arbeit, dass auch bei Mäusen nach einer Verletzung des Myokards neue Herzmuskelzellen entstehen. In diesem Modell ging die myokardiale Regeneration nach experimenteller Infarzierung von einem Vorläuferzellpool aus (Hsieh et al. 2007). Eine weitere Arbeit derselben Arbeitsgruppe zeigte allerdings, dass auch bei erwachsenen Mäusen die Neubildung von Kardiomyozyten durch die Proliferation von Kardiomyozyten zustande kommt. (Senyo et al. 2013). Weitere

Arbeiten unterstützen diese Hypothese (Mollova et al. 2013), konnten aber nach Myokardinfarkt keine verstärkte Regeneration zeigen (Ali et al. 2014).

Unabhängig davon, ob eine myokardiale Regeneration aus Vorläuferzellen oder aus vorhandenen Kardiomyozyten entsteht - eine gezielte pharmakologische Stimulation des möglicherweise bestehenden Regenerationspotentials wäre ein enormer Schritt und ist zu mindestens bei Mäusen möglich (Eulalio et al. 2012, Review in Breckwoldt et al. 2015).

1.3 Vorläuferzellen

Verschiedene Arten von möglichen kardialen Vorläuferzellen sind in Tiermodellen beschrieben worden. Letztlich ist die Existenz und Relevanz dieser Zellen aber unklar. Unterschieden werden die verschiedenen möglichen kardialen Vorläuferzellpopulationen anhand von stammzelltypischen Oberflächenantigenen sowie ihrem möglichen Differenzierungspotential (Entwicklung zu Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen und/oder Fibroblasten). Allerdings zeigt sich eine Überlappung der Oberflächenmarker zwischen verschiedenen charakterisierten Zellpopulationen. Es erscheint unwahrscheinlich, dass das Herz eine so breite Anzahl von verschiedenen Stammzellreservoirs beheimatet, die alle zur Regeneration fähig sind. Möglich ist, dass teilweise die gleiche Zellart zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten untersucht wurde. Snippert und Clevers (2011) legen deshalb nahe, dass sich echte Stammzellen nur durch zwei Merkmale auszeichnen: *self-renewal* (Selbsterneuerung, die Zellen können sich über einen langen Zeitraum teilen und dabei selbst erneuern) und *multipotency* (Pluripotenz, die Zellen können sich in alle Zellen des spezifischen Gewebes differenzieren). Anhand dieser Charakteristika kann man die Unterscheidung zwischen *stemness* (echtes Stammzellverhalten) und *stemness potential* treffen (Zellen können z.B. durch Transplantation Stammzell-ähnliches Verhalten zeigen, welches aber unter physiologischen Bedingungen nicht zwangsläufig der Fall wäre). So wären auch im letzteren Fall *in-vitro* beobachtete Ergebnisse kein Anzeichen für echte *stemness*, da Zellen durch die veränderte Umgebung (echtes Gewebe gegenüber künstlichen Bedingungen in der Petrischale) andere Verhaltensweisen zeigen können, z.B. bei der Regulierung bestimmter Gene.

1.3.1 Epikardiale Vorläuferzellen (EPDC)

Epikardiale Stammzellen wären ein Paradebeispiel für die Idee, dass die Rekapitulation embryonaler Vorgänge bei der Therapie und Regeneration zugrunde gegangener Zellen von Nutzen sein könnte. Das Epikard ist während der Embryonalentwicklung essentiell für die Ausbildung der Koronargefäße. Dabei bilden sich aus den epikardialen Zellen des proepikardialen Organs (PEO) im Zuge der epithelialen-zu-mesenchymalen Transformation (EMT) Zellen, welche ins Myokard migrieren. Umstritten ist, ob diese Zellen auch zu Kardiomyozyten differenzieren können. Dafür sprechen zwei Befunde. (1) Cai et al. (2008) beschreiben eine Population von Tbx-18 positiven Vorläuferzellen, die während der Embryonalentwicklung aus dem Epikard in das Myokard einwandern. Dort bilden sie Endothelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten. (2) Zhou et al. (2008) identifizierten im Epikard ebenfalls einen Pool von Zellen, welche zu Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Kardiomyozyten differenzieren können. Diese sind positiv für den Transkriptionsfaktor Wilms-Tumor-1 (WT1). Somit gibt es zwei Arbeiten, die einen Beitrag epikardialer Zellen zum Myokard während der Embryonalentwicklung beschreiben.

Diese Ergebnisse werden jedoch auch kritisch gesehen: Rudat und Kispert (2012) und Christoffels et al. (2009) zweifeln die Effizienz des verwendeten genetischen Modell an und verweisen darauf, dass sowohl Tbx18 als auch WT1 keine strikt auf das Epikard beschränkten Marker sind. Rückschlüsse auf neu gebildete, aus epikardialen Vorläuferzellen entstandene Zellen wären deswegen hinfällig.

Interessant wäre die Frage, ob diese embryonalen Vorgänge im adulten Herzen reaktiviert werden können, z.B. nach einem massiven Zelluntergang durch einen Myokardinfarkt. Zhou et al. (2011) fanden Hinweise für eine embryonal-ähnliche Reaktivierung des Epikards nach Infarzierung. Einhergehend mit einer erhöhten Aktivität fetaler (möglicherweise epikardialer) Gene wie WT1, Tbx18 und Raldh2 zeigte sich eine Zellhypertrophie/-proliferation im Bereich des Epikards. Die genetische Markierung von Zellen epikardialer Herkunft zeigte Zellen, welche nach Infarkt zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen differenzierten. Einen Anhaltspunkt dafür, dass sich diese Zellen auch zu Kardiomyozyten entwickelt hatten, fanden die Autoren nicht.

Smart et al. (2007) zeigten, dass Thymosin Beta-4 (TB4) ein essentieller Faktor für die Ausbildung der Koronargefäße während der Herzentwicklung ist. Dies gelang durch Generierung zweier unterschiedlicher Knockdown-Modelle, bei denen die Aktivität von TB4 mittels einer shRNA komplett herabgesetzt war. Die Tiere zeigten einen schwer kranken, meist pränatal letalen embryonalen Phänotyp mit epikardialen Defekten, Ödemen und beginnender Nekrose. Aus diesen Ergebnissen heraus entstand die Idee, dass TB4 möglicherweise ebenfalls einen protektiven Effekt in-vivo haben könnte, z.B. durch die Aktivierung epikardialer Vorläuferzellen nach Infarzierung im adulten Herzen. Diese Hypothese wurde in einem transgenen Mausmodell untersucht. Als Marker für die epikardiale Herkunft der Zellen wurde Wilms-Tumor 1 (WT1) in einer Weise genutzt, dass Zellen, die irgendwann den WT1-Lokus angeschaltet haben, dauerhaft mit GFP markiert waren. Den Mäusen wurde über 7 Tage TB4 intraperitoneal injiziert, anschließend erfolgte die operative Infarzierung des Myokards (LAD-Ligatur). Die Autoren fanden anschließend neu gebildete Kardiomyozyten, welche GFP-positiv und damit aus den WT1-positiven Zellen entstanden waren (Abb. 2).

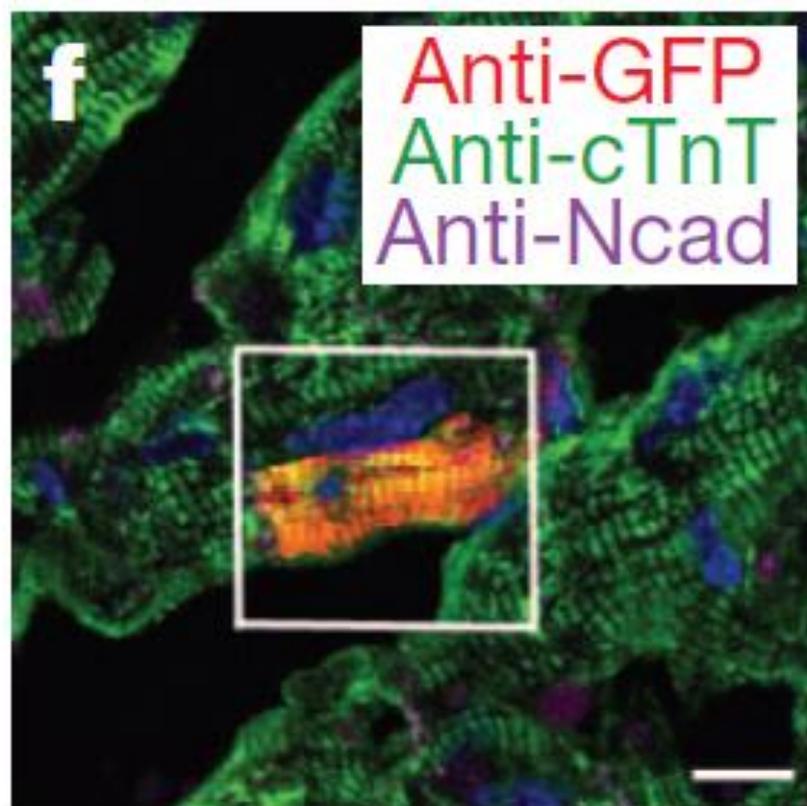


Abb. 2: Zellen im TB4-behandelten Myokard. Die gezeigte Zelle ist positiv für cTnT, einem Marker für Kardiomyozyten. Zusätzlich ist sie GFP⁺, was in diesem Mausmodell die epikardiale Herkunft zeigt. Ncad (N-cadherin) als Protein für die Zell-Zellverbindung zeigt die Einbettung der neu gebildeten Zelle in das umgebende Myokard (aus: Smart et al. 2011).

Erstaunlicherweise zeigte sich, dass im Zuge der Neubildung von Kardiomyozyten auch Islet-1 exprimiert wurde. Außerdem fanden sich epikardiale Zellen, die GFP und Islet-1 positiv waren. Mit diesem Modell konnte jedoch nicht geklärt werden, ob sich die Islet-1-positiven Zellen in die neu entstandenen Kardiomyozyten differenziert hatten (Smart et al. 2011) (Abb. 3).

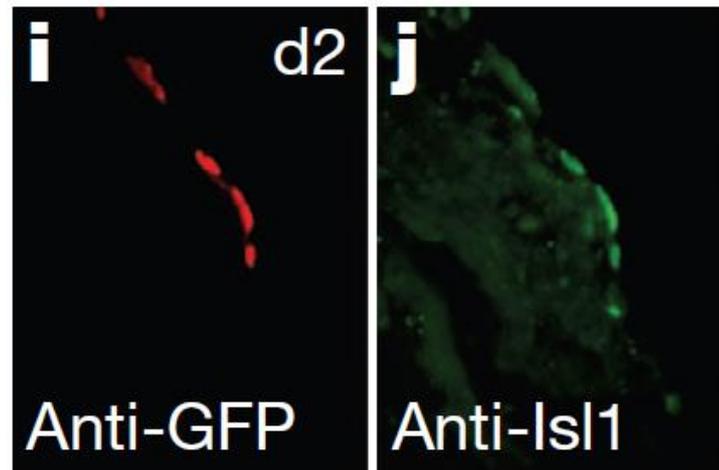


Abb. 3: Ko-Lokalisation von WT1 und Islet-1 in epikardialen Zellen nach TB4-Behandlung. In diesem Mausmodell sind Wilms-Tumor-1 positive Zellen mit dem Farbstoff GFP markiert. Die Immunfluoreszenz zeigt, dass diese Zellen positiv für Islet-1 sind (aus: Smart et al. 2011).

1.4 Herzentwicklung und Islet - 1

Das Herz entwickelt sich während der Embryonalzeit aus insgesamt drei unterschiedlichen Quellen: dem Mesoderm (welches zusammen mit dem Ekto- und Endoderm die drei Schichten des Keimblattes bildet), aus der Neuralleiste (einer Zusammenfaltung des Ektoderms) sowie aus dem Proepikardialen Organ (PEO), dem späteren Epikard. Alle drei sind für die Ausbildung unterschiedlicher Strukturen von Bedeutung und sind, zeitlich begrenzt, Ausgangspunkt für unterschiedliche Vorläuferzellpopulationen (Abb. 4). Den größten und frühesten Anteil hat dabei das Mesoderm: in der Maus entwickelt sich ab E7.5 (Tag der Embryonalentwicklung) aus diesem der längliche Herzschlauch (*linear heart tube*). Nach Faltung dieser länglichen Struktur („looping“) entsteht daraus der Großteil des späteren Arbeitsmyokards. Ab E10.5 trägt dann die Neuralleiste, welche aus dem Neuroektoderm entsteht, zur Herzbildung bei. Aus der Neuralleiste migrieren Zellen in Richtung Herz, die sich dort dann in glatte Muskelzellen des Ausflusstraktes sowie in kardiale Nervenzellen

differenzieren. Das PEO lagert sich an den venösen Pol des Herzens, den späteren Einflusstrakt, an. Hiervon ausgehend wandeln sich epitheliale in mesenchymale Zellen um („epithelial-mesenchymale Transition“, EMT), die zur Ausbildung der Koronargefäße von Bedeutung sind: aus diesen Zellen entstehen glatte Muskelzellen, Fibroblasten und möglicherweise Endothelzellen (Laugwitz et al. 2008; Vincent and Buckingham 2010).

Besonderes Augenmerk ist auf das kardiogene Mesoderm zu richten: genetische Markierung der Zellen, die aus dem Mesoderm entstehen, haben gezeigt, dass sich das Mesoderm aus zwei Strukturen („Feldern“) zusammensetzt. Beide tragen, zeitlich getrennt, zur Ausbildung von unterschiedlichen Teilen des Herzens bei (Waldo et al. 2001; Kelly et al. 2001; Mjaatvedt et al. 2001). Zunächst entwickelt sich aus dem anterioren Mesoderm das primäre Herzfeld (FHF) und bildet den linken Ventrikel, Teile des rechten Ventrikels sowie der Vorhöfe aus. Später entsteht aus dem pharyngealen Mesoderm das sekundäre Herzfeld (SHF) und trägt zur Bildung des Ausflusstraktes, der Atriae, des rechten Ventrikels und zu einem kleinen Teil zum linken Ventrikel bei. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Strukturen gelang mithilfe des Transkriptionsfaktors Islet-1.

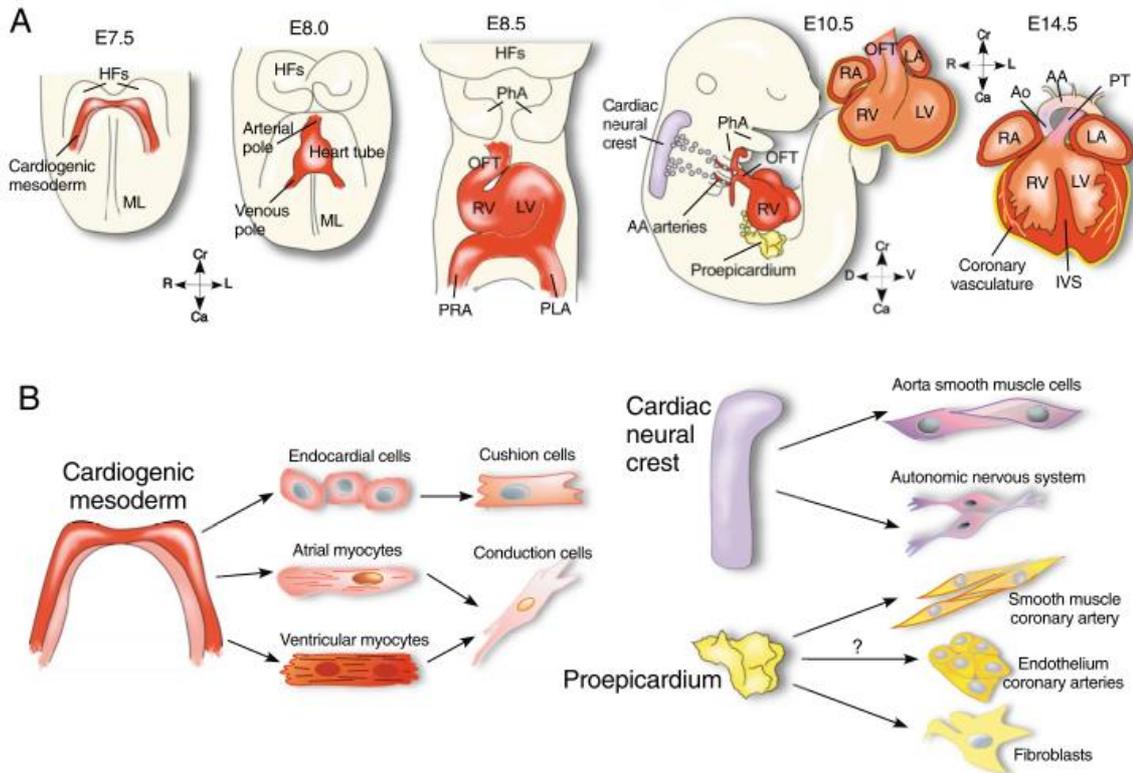


Abb. 4: Herkunft verschiedener Zellpopulationen während der Herzentwicklung. In der Embryonalentwicklung sind drei Quellen Ausgangspunkt für die unterschiedlichen Zellen, die später in ihrer Gesamtheit das Herz bilden: das kardiogene Mesoderm, die Neuralleiste (*Cardiac neural crest*) sowie das proepikardiale Organ (PEO; aus: Laugwitz et al. 2008).

Islet-1 ist ein LIM-Homeodomain (HD)-Transkriptionsfaktor. LIM-HD-Proteine sind eine Unterform der HD-Proteine, welche sich durch eine cystein- und histidinreiche Zinkfingerregion auszeichnet. Über diese Region binden die Faktoren direkt an die DNA und vermitteln dadurch ihre Wirkung auf die Expression bestimmter Genabschnitte. Islet-1 beheimatet zwei N-terminale LIM-Domänen sowie eine C-terminale HD-Domäne. LIM steht dabei für die drei ersten identifizierten Proteine dieser Gattung, LIN-11, Isl1 und MEC-3. Islet-1 wurde zuerst in den β -Zellen des Pankreas entdeckt. Im Bereich der Neurobiologie spielt der Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Motoneuronen (Ericson et al. 1992; Thor et al. 1999).

Cai et al. (2003) konnten erstmals die Bedeutung für Islet-1 in der Herzentwicklung zeigen. Sie untersuchten die Herzen von Islet-1-Knockout-Mäusen. Diese Tiere hatten in früheren Arbeiten, in denen der Einfluss auf die Motoneuron- und Pankreasentwicklung untersucht worden war, eine Wachstumsverzögerung ab E9.5

gezeigt und starben ab E10.5 (Varela-Echavarría et al. 1996; Ahlgren et al. 1997). Bei der Untersuchung der Herzen fiel der Phänotyp der *Isl1*-KO-Tiere auf. Im Gegensatz zu normalen Tieren fehlten den *Isl1*-KO-Tieren der rechte Ventrikel sowie der ventrikuläre Ausflusstrakt (Abb. 5).

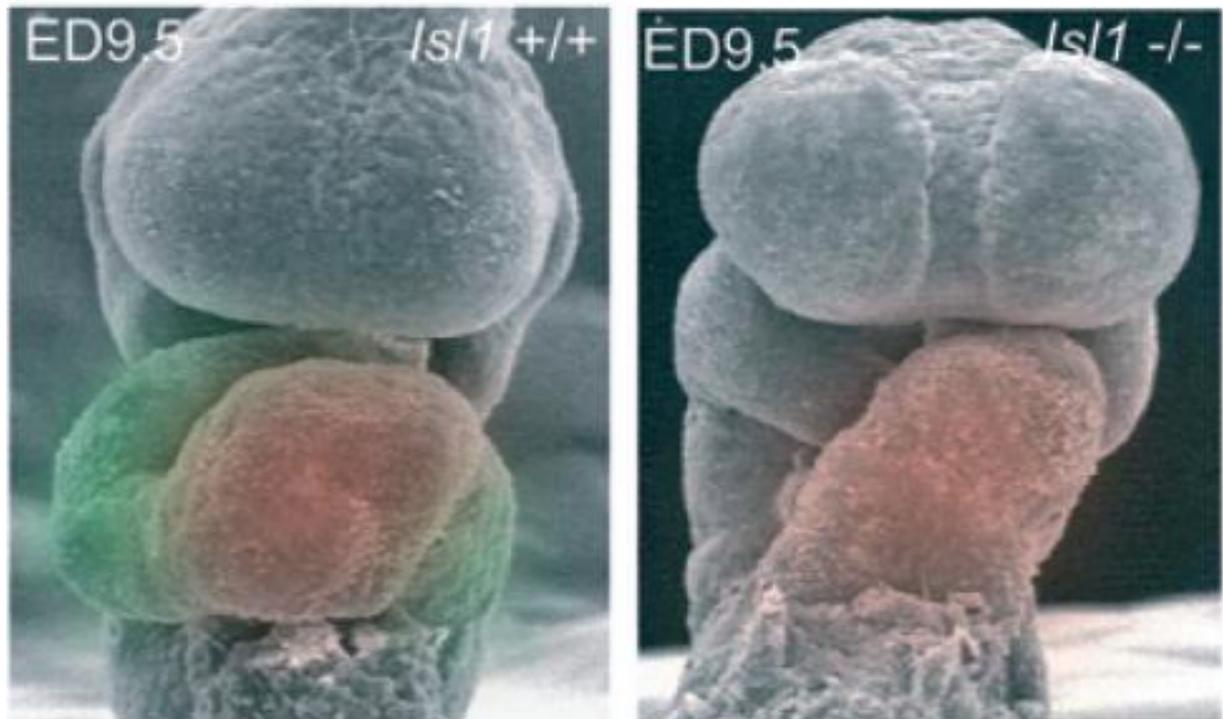


Abb. 5: Vergleich des Phänotyps von Wildtyp (WT)- und *Isl1*-defizienten Mäusen (KO). Die Wildtyp-Maus (links) zeigt eine normale Herzentwicklung mit ventrikulärem Ausflusstrakt, rechtem und linkem Ventrikel und Atrium. Der *Isl1*-Mutante (rechts) fehlt dagegen der Ausflusstrakt sowie das rechtsventrikuläre Segment. Es bilden sich univentrikuläre Vorhöfe und Kammern (aus: Cai et al. 2003)

Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass *Isl1* ein unerlässlicher Faktor für die Ausbildung dieser Herzregionen ist und eine embryonale Vorläuferzellpopulation markiert. Im adulten Herzen ist *Isl1* nur noch in wenigen spezialisierten Zellen zu finden.

Nach Isolation von *Isl1*⁺-Zellen aus embryonalen Stammzellkulturen, neonatalen Herzen und auch kurz postnatal können diese Zellen *in-vitro* vermehrt und differenziert werden. Dabei zeigt sich das breite Entwicklungspotential der Zellen: sie können sich in Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten differenzieren (Moretti et al. 2006). Mithilfe eines transgenen Modells (Sun et al., 2007) konnte die genaue Lokalisation und Charakterisierung der *Isl1*⁺-Zellen im adulten

Mäuseherz bestimmt werden: dabei wurden Zellen im Bereich des rechts- und linksventrikulären Ausflusstraktes, des Sinusknotens und kardialer Ganglien gefunden. Es handelte sich dabei um Schrittmacherzellen des Sinusknotens (positiv für den Ionenkanal HCN4), Zellen der parasymphatischen kardialen Ganglien, glatte Muskelzellen sowie einige wenige Kardiomyozyten (Weinberger et al. 2012).

1.5 Thymosin Beta-4 (TB4)

TB4 ist ein 43-Aminosäuremonomer. Es ist ubiquitär in vielen Geweben vorhanden und kann intrazellulär Konzentrationen bis 0,5 mM erreichen (Hannappel 2007). Seine Hauptwirkung übt TB4 über die Bindung an G-Actin aus, welches dadurch nicht mehr zu F-Actin polymerisieren kann. Dies ist beispielsweise in Thrombozyten von Bedeutung: in diesen Zellen gibt es hohe Konzentrationen an G-Actin. Im Zuge der Blutgerinnung wird enorm viel polymerisiertes Actin gebraucht, welches durch das TB4-gebundene G-Actin bereitgestellt wird. Dadurch stellt dieses gebundene Actin ein Reservoir dar (Lodish et al. 2000). Gleichzeitig werden TB4 pleiotrope Effekte in der Gewebsregeneration zugesprochen, die sich nicht alleine durch die Bindung an Actin erklären lassen, zumal in vielen Zellen schon hohe Konzentrationen an TB4 vorhanden sind. Eine Erklärung könnte im sogenannten „protein moonlighting“ liegen (Jeffery 1999). Moleküle wie TB4 haben in wässriger Lösung keine stabile Konfiguration, sie sind „intrinsisch unstrukturierte Proteine“ (IUP). Durch die Möglichkeit, verschiedene Konformationszustände anzunehmen, kann TB4 so extrazellulär auf unterschiedliche Membranrezeptoren wirken. Ein Rezeptor mit hoher Affinität für TB4 ist die β -Untereinheit der ATP-Synthase. TB4 kann dadurch die Konzentration an ATP auf der Zelloberfläche erhöhen. Das gebildete ATP wiederum kann über purinerge Signalwege seine Wirkung entfalten. Versuche haben gezeigt, dass TB4 möglicherweise an diese ATP-Synthase bindet und dadurch die Migrationsgeschwindigkeit von Endothelzellen (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) in-vitro erhöht (Freeman et al. 2011).

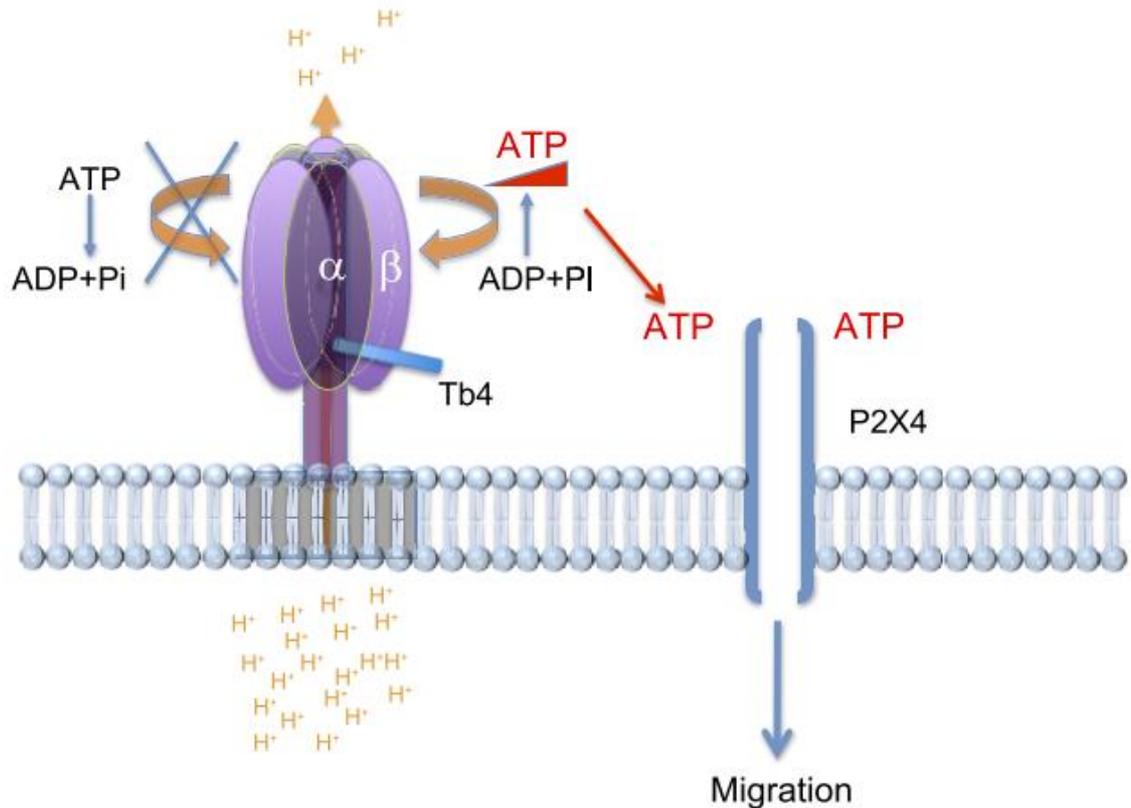


Abb. 6: Mögliche Wirkung von Thymosin Beta 4 bei exogener Applikation. TB4 kann durch die Bindung an eine Untereinheit der ATP-Synthase zu einer erhöhten Bildung von ATP an der Zelloberfläche führen. Dieses ATP kann dann über purinerge Rezeptoren seine Wirkung entfalten. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum von außen zugeführtes TB4 zu dramatisch anderen Effekten führen kann als das innerhalb der Zelle befindliche TB4 (aus: Freeman et al. 2011).

1.5.1 TB4 im Herzen

Bock-Marquette et al. (2004) zeigten erstmals, dass TB4 eine Rolle in der Herzentwicklung und bei der Regeneration des Herzens spielt. Die Autoren gehen davon aus, dass TB4 wichtig ist, um im embryonalen Herzen die Migration von Myozyten und Endothelzellen zu ermöglichen. Es wurde angenommen, dass diese Fähigkeit im adulten Herzen erhalten bleibt. In-vivo führte die Gabe von TB4 nach LAD-Ligatur zu einer Hochregulation der Proteinkinase B, der „survival kinase“.

Spezifische kardiale Herunterregulation von TB4 führte zu einer herabgesetzten Aktivität von N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline (AcSDKP), einem pro-angiogenen Faktor, und damit einhergehend zu einer Fehlbildung der Koronargefäße (Smart et al.

2007). In einer weiteren Arbeit konnte dieser Einfluss genauer beschrieben werden: es zeigte sich, dass TB4 vom Endothel ausgehend über den TGF β -Signalweg (transforming growth factor-beta) für die Migration von Myozyten in die Gefäßwänden des Herzens sorgt. Fehlte dieser Faktor, so bilden sich Gefäße mit dünnen Wänden aus, die anfällig für Aneurysmen und Ruptur waren (Rossdeutsch et al. 2012). Diese Ergebnisse wurden als Beweis für die wichtige Rolle von TB4 bei der Koronargefäßentwicklung angesehen.

1.6 Islet-1 unter dem Einfluss von TB4

Thymosin Beta 4 könnte in der Lage sein, Gewebsregeneration zu beschleunigen. Smart et al. (2007) konnten mit der Gabe von TB4 vor Infarzierung WT-1-positive epikardiale Vorläuferzellen mobilisieren und beobachteten eine verstärkte Vaskulogenese in-vitro. Spätere, in der vorliegenden Arbeit in Abb. 2 und Abb. 3 gezeigte, Versuche sprachen dafür, dass sich aus diesen epikardialen WT-1 positiven Vorläuferzellen de-novo Kardiomyozyten entwickeln und hierbei eine Islet-1 positive Zwischenstufe einnehmen (Smart et al. 2011). Unklar ist aber, ob diese Islet-1 positiven Zellen wirklich zu Kardiomyozyten differenzieren. Wird nach einigen Tagen die Islet-1-Expression im Zuge z.B. einer möglichen Kardiomyozytendifferenzierung herabgesenkt, so sind diese ursprünglich Islet-1 positiven Zellen nicht mehr als solche zu identifizieren. Diese Fragestellung konnte mit dem verwendeten Tiermodell nicht beantwortet werden, da eine dauerhafte Markierung Islet-1 positiver Zellen damit nicht möglich ist. Andererseits ist unklar, ob die gezeigten WT1-positiven epikardialen Zellen wirklich auch Islet-1 positiv sind. Dies liegt an der Detektionsmethode: Islet-1 ist ein nukleäres Signal und mit gängigen Antikörpern für Immunfluoreszenz nur schwierig nachzuweisen. Mit einem anderen, von uns verwendeten und ausführlich charakterisierten transgenen Modell (Weinberger et al. 2012), der ISL1-nLacZ-Maus, ist die Detektion von Islet-1-positiven Zellen deutlich einfacher und sensitiver. Damit wären wir in der Lage, die initialen Ergebnisse von Smart et. al (2011) nachzuvollziehen und die Herkunft neu entstandener Kardiomyozyten zu überprüfen.

Daraus ergab sich folgende Zielsetzung:

1. Evaluation der TB4-Wirkung auf die Expression von Islet-1 nach Myokardinfarkt.

2. Evaluation der TB4-Wirkung *in-vitro* hinsichtlich der Expression von Islet-1 in Zellkulturen.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel sind verschiedene Versuche und Protokolle aufgeführt, welche auch schon in früheren Arbeiten in unserem Institut beschrieben sind. Zur besseren Lesbarkeit sind manche Beschreibungen aus einer Vorgängerarbeit wörtlich übernommen (Dennis Mehrkens, Dissertation an Universität Hamburg, 2015)

2.1 Mausmodell

Das Islet-1-Mausmodell (ISL1-nLacZ) erlaubt mit hoher Sensitivität und Spezifität einen indirekten Nachweis von Islet-1. In diesem Tiermodell wird eine β -Galaktosidase unter der Kontrolle des Islet-1-Promoters auf der DNA im Exon 1 des Islet-1-Gens exprimiert. Islet-1-positive Zellen exprimieren somit eine nukleär lokalisierte Galaktosidase. Diese kann dann durch das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysieren. Anschließend wird dieses sauerstoffabhängig zu 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, einem tiefblauen Farbstoff, oxidiert. Dieser Farbstoff führt zu einer eindeutigen und dauerhaften Markierung der Zellen, die zum Zeitpunkt der Färbung Islet-1 exprimieren.

2.2 Histologie

2.2.1 X-Gal-Färbung von ganzen Herzen

Die Analyse der LacZ-Expression geschah durch Anfärbung des Herzens nach der Organentnahme mit dem Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal). Dabei setzt die in unserem Mausmodell nukleär lokalisierte β -Galactosidase X-Gal zu einem blauen Farbstoff um. Die Herzen wurden nach der Entnahme zweimal in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das Überführen in ein lichtgeschütztes Falcon mit ca. 3 ml X-Gal-Färbelösung. Die Herzen wurden dann bei 37 °C für ca. 2 h gefärbt. Zur Herstellung der X-Gal-Lösung wurde folgendes Protokoll verwendet (Tab. 1).

Substanz	Konzentration	Menge
Potassium Ferrocyanide	100 mM	0,5 ml
MgCl ₂	1 M	20 µl
PBS-A	10 x	1,0 ml
Aqua bidest.	-	7,9 ml
X-Gal-Substrat (Fermentas), gelöst in DMSO	40 mg/ml	100 µl
NP40	10%	20 µl
Sodium Deoxycholate	5%	20 µl
Tris pH=7,4	1 M	200 µl

Tab. 1: Protokoll zur Anfertigung der X-Gal-Färbelösung

Die Färbelösung wurde, ohne X-Gal, in größeren Mengen angesetzt und in 10 ml aliquotiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -20 °C. Zur Verwendung wurden die Aliquots auf Raumtemperatur erwärmt und direkt mit dem in DMSO gelösten X-Gal versetzt. X-Gal wurde, in DMSO gelöst, ebenfalls bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Einbettung von Gewebe für Kryoschnitte

Zur Entnahme der Herzen wurde nach Eröffnung des Thorax zunächst der rechte Ventrikel apikal punktiert und danach 10 ml einer Formaldehydlösung (4%) in den linken Ventrikel appliziert. Dies ermöglicht eine rasche Vorfixierung des Herzens. Anschließend wurden die Herzen entnommen, in PBS gewaschen und in einem mit Parafilm verschlossenen Plastikgefäß in einer 1:1 Mischung aus Tissue-Tek® O.C.T™ Compound und 30% Saccharose eingebettet. Dafür wurden die Proben, auf einem Stück Alufolie schwimmend, in eine Wanne mit flüssigem Stickstoff überführt. Beim Einbetten wurden die Herzen so platziert, dass Frontal- bzw. Transversalebene schnitte angefertigt werden konnten. Die weitere Lagerung erfolgte bei -20 °C.

30% Saccharoselösung:	30 g Saccharose in 100 ml PBS pH 7,4 lösen.
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound /Sucrose:	25 ml 30% Saccharose mit 25 ml Tissue-Tek® O.C.T™ Compound mischen.
4% Formaldehydlösung:	4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung) 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 Aliquots zu 2 ml bei – 20 °C.
PBS:	<i>PBS Tablets</i> (gibco®, lifetechnologies™), 2 Tabletten in 1000 ml Aqua bidest lösen.

2.2.3 Anfertigung von Kryoschnitten

Aus den eingebetteten und tiefgefrorenen Herzen wurden mittels eines Kryotoms, (bei Kammertemperaturen zwischen -20 und -25 °C) 10 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf *SuperFrost/Plus®*-Objektträger aufgezogen und dann bei Raumtemperatur für 30-40 Minuten getrocknet. Die anschließende Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Kombination zweier Einzelfärbungen. Hämatoxylin färbt als basische Substanz basophile (saure) Strukturen, wie z.B. DNA, blauviolett an. Eosin als saure Substanz färbt entsprechend azidophile (basische) Strukturen, z.B. Proteine des Zytoplasmas, rot an. Folgendes Protokoll wurde verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (Tab. 2).

Färbungsschritt	Funktion	Dauer
4% Formaldehyd	Nachfixierung	10 Min
2 x PBS	Spülen	5 Sek
Hämalaun nach Meyer	Kernfärbung	5 Sek*
Lauwarmes Leitungswasser	Bläuen	10 Min
1 x PBS	Spülen	5 Sek
Eosin-Lösung 0,5%	Zytosolfärbung	4 Min
2 x PBS	Spülen	5-10 Sek
70% Ethanol	Entwässern	30 Sek
2 x 96% Ethanol		30 Sek
2 x 100% Ethanol		30 Sek
2 x Roti-Histol®	Klären	1 Min
Roti-Histokitt®	Eindeckeln	-

Tab. 2: Protokoll für die Anfertigung von HE-Färbungen von Kryogewebeschnitten

* Entgegen der sonst üblichen Kernfärbungszeit von 10 min wurden die X-Gal-gefärbten Gewebeschnitte der Islet-1-nLacz-Mäuse nur für kurze Zeit (5 Sekunden) kerngefärbt. Damit wurde das Überfärben des nukleär lokalisierten X-Gal-Signals verhindert.

Eosin G-Lösung:

0,5 g Eosin in 500 ml Aqua bidest. lösen; dunkel lagern

Hämalaun-Lösung

nach Meyer:

1,0 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua bidest. gelöst, 0,2 g NaJO₃ und 50,0 g KAl(SO₄)₂ einrühren (blauviolette Lösung), 50,0 g Choralhydrat und 1 g Zitronensäure zugeben bis die Lösung rotviolett wird; vor Gebrauch filtrieren.

Die Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem Lichtmikroskop (Axioplan 2 Mikroskop, Zeiss) untersucht.

2.2.5 Sirius-Rot-Färbung

Die Siriusrot-Färbung wird für die Anfärbung von Kollagenfasern verwendet. Sie eignet sich damit besonders gut, um vernarbte Areale im infarzierten Herzgewebe darzustellen. Kollagenfasern färben sich rot, während sich Herzmuskulatur gelb darstellt. Folgendes Protokoll wurde verwendet. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt (Tab. 3).

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
4% Formaldehyd	Nachfixieren	15 Min
2 x PBS	Spülen	5 Sek
Siriusrot-Lösung	Kollagenfärbung	20 Sek
Essigsäure 0,5%	Spülen	20 Sek
1 x PBS	Spülen	5 Sek
100% Ethanol	Entwässern	10 Sek
2 x Roti-Histol®	Klären	1 Min
Roti-Histokitt®	Eindeckeln	-

Tab. 3: Protokoll für die Anfertigung von Siriusrot-Färbungen von Kryogewebeschnitten

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

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

Mowiol: 0,2 M Tris-HCl Puffer (pH = 8,5) und 2,42 g Tris-base (ultrapure®) in 100 ml Apo-H₂O lösen, mit HCl auf pH 8,5 einstellen. 12 g Mowiol 4-88 in 30 ml

Apo-H₂O, 1 ml 0,2 M Tris-HCl-Puffer zugeben. Lagerung im Kühlschrank. Lösung im Schüttelbad langsam auf 90°C erhitzen und 45 min bei dieser Temperatur schütteln. Langsam auf 50°C abkühlen lassen und 30 g fluoreszenzfreies Glycerin (=23,8 ml) vorsichtig einrühren. Auf pH 8,5 einstellen. Bei 4°C lagern.

2.2.6 Acetylcholinesterasefärbung

Zur Darstellung parasymphatisch innervierter Strukturen (z.B. des Sinusknotens) oder kardialer Ganglien eignet sich die Acetylcholinesterase-Färbung. Dabei kommt es im enzym-aktiven Bereich zum Ausfallen von Kupfer(II) als Kupfer-Eisen(II)cyanid (*Hatchett's Brown*). Acetylcholinesterase-positive Areale sind durch Ablagerung von rötlich-braune Granula gekennzeichnet. Zur Herstellung des Inkubationsmediums wurde folgendes Protokoll benutzt (Tab. 4):

Substanz	Ansatz	Menge
Acetylthiocholin-Jodid	25 mg	25 mg
0,06 N (0,82%) Natriumacetat	2,46 g in 10ml H ₂ O (3M); 2 ml + 98 ml H ₂ O (0,06N)	31,6 ml
0,1N (0,6%) Essigsäure: aus 100% Essigsäure	0,6 ml + 99,4 ml H ₂ O (0,1N)	1,0 ml
0,1M (2,94%) Tri-Natriumcitrat-Dihydrat:	2,94 g in 100 ml H ₂ O (0,1M)	2,4 ml
30mM (0, 75%) Kupfer-II-Sulfat-Pentahydrate	1,872 g in 25 ml H ₂ O (0,3M); 2,5 ml + 22,5 ml H ₂ O (0,03M)	5,0 ml

5mM (0,165%) Kaliumeisencyanid (Eisen(III)cyanid)	0,823 g in 50 ml H ₂ O (0,05M)	5,0 ml
	2 ml + 18 ml H ₂ O (0,005M)	
		= 46 ml
		+ 4,0 ml H ₂ O
		= 50 ml

Tab. 4: Protokoll zur Anfertigung des Inkubationsmediums für die Actelycholinesterase-Färbung

Zur Anfärben der Acetylcholinesterase-aktiven Bereiche wurde folgendes Protokoll benutzt (Tab. 5). Alle Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
4% PFA	Nachfixieren	10 Min
2 x PBS	Spülen	5 Sek
50 ml Inkubationsmedium (siehe Tab. 4)	Anfärbung der Enzym- aktiven Bereiche	2 h bei 37 °C
1 x PBS	Spülen	5 Sek
Mowiol	Eindeckeln	-

Tab. 5: Protokoll zur Anfertigung von Acetelycholinesterase-Färbungen

2.2.7 Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenz werden Antigene mit Hilfe von Antikörpern (AK) markiert. Zur Visualisierung wird ein zweiter fluoreszenz-gekoppelter AK gegen den primären AK verwendet. Die angefertigten Kryoschnitte wurden, abhängig von dem verwendeten ersten Antikörper, entweder mit 4% PFA oder mit Aceton-Methanol nachfixiert. Zellen wurden mit 0,05% Glutaraldehyd fixiert.

Aceton-Methanol:

200 ml Aceton mit 800 ml Methanol
versetzen, bei -20 °C lagern.

Glutaraldehyd:

5 µl Glutaraldehyd in 10 ml PBS lösen.

Die Zellkerne wurden mit DRAQ5™ (Biostatus Limited) angefärbt. Der zweite Antikörper und DRAQ5 wurden in einem gemeinsamen Färbeschritt auf die Schnitte gegeben. Die optimalen Verdünnung der verwendeten Antikörper musste für jeden Antikörper einzeln bestimmt werden und ist in Kapitel 2.10 angegeben. Zur Immunfärbung der Kryoschnitte wurde folgendes Protokoll verwendet (Tab. 6). Alle Schritte wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

Arbeitsschritt	Funktion	Dauer
4% PFA bzw. Aceton-Methanol	Fixieren	10 Min bzw. 7 Min. bei -20 °C
3 x PBS	Spülen	jeweils 10 Min
10% Serum in DAKO <i>antibody diluent</i>	Blocken	30 Min
1. AK in DAKO <i>antibody diluent</i>	Antigenmarkierung	12 h bei 4 °C
3 x PBS	Spülen	jeweils 10 Min
2. AK, DRAQ5 in DAKO <i>antibody diluent</i>	Markierung des 1. AK und Zellkernfärbung	1,5 h
3 x PBS	Spülen	jeweils 10 Min
Mowiol	Eindeckeln	-

Tab. 6: Protokoll zur Anfertigung von Immunfluoreszenzfärbungen

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultur von EPDCs aus Isl1-nLacZ-Mäusen

Smart et al. beschreiben ein Protokoll zur Kultivierung von epikardialen Zellen (EPDCs) aus den Herzen von adulten Mäusen (Smart and Riley 2009). Um *Epicardium-derived cells* (EPDCs) zu kultivieren, wurden Isl1-nLacZ-Mäuse im Alter zwischen 10 und 20 Wochen durch cervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Herzentnahme mithilfe von sterilem Präparationsbesteck. Das Herz wurde gründlich zweimal in PBS gespült und anschließend in eine 60 mm-Kulturschale überführt. In einigen Versuchsreihen wurden die Vorhöfe sowie der Ausflusstrakt entfernt. Dies erfolgte mithilfe eines Operationsbinokulars. Das Herz wurde unterhalb der Ventilebene in einen basalen und einen apikalen Teil getrennt und nochmals zweimal mit PBS gespült. Herzbasis und Apex wurden jeweils separat in 60 mm-Kulturschalen inkubiert. Mithilfe eines sterilen Skalpell wurde das Gewebe in kleine Stücke zerschnitten (ca. 0,5 – 1 mm³) und mittig in der Kulturschale platziert. Das überschüssige PBS wurde vorsichtig abgesaugt. Die Kulturschalen wurden nun „kopfüber“ in einen Inkubator überführt (37 °C und 5% CO₂) und 1,5 Stunden inkubiert um eine feste Verbindung zwischen Kulturschale und Gewebe zu erzielen. Nach 1,5 Stunden wurden die Schalen mit 4 ml EPDC-Medium (Tab. 7) überschichtet. Zur Herstellung des EPDC-Mediums wurde folgendes Protokoll verwendet. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Substanz	Menge
Dulbecco's Modified Eagle Medium (<i>gibco</i> [®] , <i>life technologies</i> [™]), 4,5g/L Glucose	42,5 ml
Fetal Calf Serum (FCS), inaktiviert durch Erhitzen auf 56 °C für 30 min. (<i>Invitrogen</i>)	7,5 ml

PenStrep (5000U Penicillin, 5mg Streptomycin)	0,5 ml
-----------------------------------------------	--------

Tab. 7: Protokoll zur Herstellung des EPDC-Mediums

2.3.2 X-Gal-Färbung von EPDCs

Zur Anfärbung der Zellen wurde ein ähnliches Protokoll wie zur Färbung der Herzen verwendet. Die X-Gal-Färbelösung wurde gemäß Tab. 1 angefertigt. Zunächst wurde das Medium in der Kulturschale komplett abgesaugt. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 0,05% Glutaraldehyd für 10 Min bei 4° C. Danach wurden die Zellen dreimal für 10 Min mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37° C für ca. 12 Stunden X-Gal gefärbt.

2.3.3 Immunfluoreszenz von EPDCs

Es wurde ähnlich verfahren wie bei der Immunfluoreszenz von Gewebeschnitten. Zum Spülen der Zellen zwischen den einzelnen Schritten wurden die Kulturschalen für 90 Sekunden auf einen Schüttler gestellt. Nach dem Eindeckeln der Zellen mit Mowicol wurde der Schalenrand abgeschnitten, um die Kulturschale besser unter dem Mikroskop platzieren zu können. Die Beurteilung erfolgte anschließend mit einem konfokalen Mikroskop (Zeiss®).

2.4 Myokardinfarktmodell der Maus

8-12 Wochen alte Isl1-nLacZ-Mäuse wurden einer experimentellen Infarzierung durch eine Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie unterzogen. Die Operation wurden im Labor von Frau Prof. S. Schrepfer (Klinik für Herzchirurgie) von Dr. Stubbendorf und Dr. Becher vorgenommen. Die Tiere wurden mit 2% Isofluran in einer Induktionskammer anästhesiert und intubiert. Anschließend wurde der Thorax durch eine laterale Inzision eröffnet, der Perikardbeutel freigelegt und der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (RIVA, *left anterior descending* = LAD) mit einem chirurgischen Faden (8.0 Ethilon) permanent ligiert. Nach erfolgtem Wundverschluss erhielten die Tiere Buprenorphin und Carprofen zur Analgesie. Die Tiere wurden 2 Tage, 7 Tage und 14 Tage nach LAD-Ligatur bei freiem Wasser und Futter, *ad libitum* gehalten. Nach 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 Perinfarktregion am Mikroskop untersucht. Zur Verifizierung des Infarktgebietes wurden Sirius-Rot-Färbungen durchgeführt.

2.5 Applikation von Thymosin Beta-4 (TB4)

Thymosin Beta-4 wurde von Bachem® zur Verfügung gestellt (3,0 g, als Pulver bei -20°C). Gemäß dem Protokoll von Smart et al. wurde TB4 für eine Endkonzentration von 12 mg TB4/kg Körpergewicht (KG) mit NaCl verdünnt. Für jeden Injektionstag wurde ein neues Aliquot benutzt, um ein wiederholtes Auftauen des TB4 zu verhindern. Die Tiere wurden vor der Injektion gewogen. Anschließend wurde die entsprechende Menge TB4-Lösung mithilfe einer 0,5 ml-Insulinspritze (Braune®) aufgezogen und intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltieren erhielten NaCl.

2.6 Messung von CD31 in Gewebeschnitten

Um die Kapillardichte zwischen TB4 bzw. NaCl-behandelten Tieren zu untersuchen, wurde eine computergestützte Messung der CD31-positiven Zellen vorgenommen. Dafür wurden Schnitte des infarzierten Ventrikels mit einem Anti-CD31-AK gefärbt. Anschließend wurden diese Schnitte mit einem konfokalen Mikroskop untersucht und 10-20 Aufnahmen von verschiedenen Stellen des infarzierten bzw. nicht-infarzierten Areals gemacht. Die Aufnahmen wurden danach mit ZEN 2011-Software (Zeiss®) bearbeitet: das DRAQ5-Signal wurde ausgeblendet, das CD31-Signal auf den Farbwert „Gamma-High“ gestellt. Dies führte zu einem starken Kontrastunterschied zwischen positiven (hellen) und negativen (dunklen) Arealen. Diese Aufnahmen wurden im Anschluss mittels Axiovision (Zeiss®) ausgewertet. Das Programm war in der Lage, mittels Unterscheidung der sehr hellen CD31-positiven Areale und der nicht-positiven dunklen Areale eine sensitive Unterscheidung zu treffen. Artefakte und unklare Areale konnten manuell demarkiert werden und wurden nicht mitgerechnet. Die Ergebnisse wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und ausgewertet. So erfolgte eine quantitative Erfassung der Kapillardichte (Abb. 7).

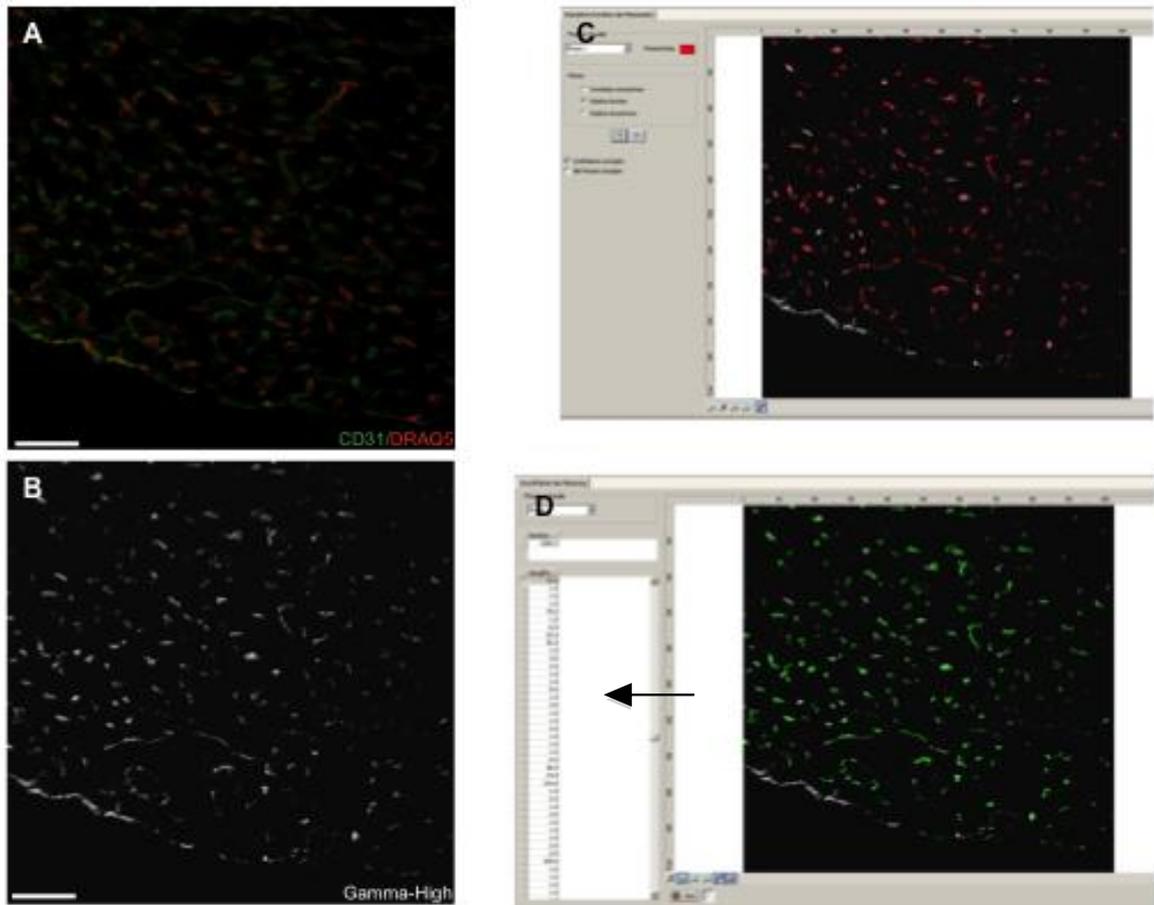


Abb. 7: Computergestützte Kapillardichtemessung. **A:** Immunhistologie gegen CD31 im Myokard. **B:** die CD31-positive-Areale wurden mittels der Option „Gamma-High“ stark kontrastiert und dadurch hervorgehoben, **C und D:** mittels Axiovision können nun die Areale gezählt bzw. Artefakte herausgerechnet werden. In der linken Spalte neben dem Bild (**Pfeil**) werden die gezählten Areale aufgeführt. Maßstabsbalken: (A, B) 50 µm

2.7 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Axioplan 2 Mikroskop	Zeiss
Kamera, AxioCam HR	Zeiss
Kamera, AxioCam MR5	Zeiss
Kryostat Leica Cm-3050S	Leica
Laserscanning Mikroskop LSM 510 META	Zeiss

Rotationsmikrotom, Leica RM2125 RTS	Leica
Stereomikroskop Stemi 2000-C	Zeiss
Stereomikroskop SV6	Zeiss
Axiovert 25	Zeiss

2.8 Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Chirurgisches Besteck: Cooper Schere chirurgische Pinzette Mikrofeder-Schere	FST
Einwegklingen Typ 819	Leica
Omnifix Insulinspritze 1 ml	Braune
Punktionskanüle 27G	Braune
Spritze	Braune
μ-Dish 35mm, high,	Ibidi
Venofix Saefly	Braune
μ-Dish 50mm, low,	Ibidi

2.9 Substanzen und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Acetylthiocholin-Jodid	
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 <i>Universal DAB Detection Kit</i>, enthält 3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Ventana Roche
DAB-H₂O₂ aus Ventana® <i>ultraView Universal</i> DAB Detection Kit, enthält 0,04% Wasserstoffperoxid	Ventana roche
Dimethylsulfoxid, DMSO	Sigma
DMEM	
DRAQ5	Biostatus limited
Essigsäure, 100%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Eukitt®	Sigma-Aldrich
Eukitt®	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Life Technologies
Fluoromount-G™	Southern Biotech
Glucose	Sigma-Aldrich
Glycerol	Roth
Hematoxylin II Counterstain	Ventana Roche

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

Triton X-100	
--------------	--

2.10 Verwendete Antikörper

2.10.1 Erste Antikörper

Zielprotein	Spezies	Antikörperbezeichnung	Hersteller	Verdünnung
α-Actinin	Maus	Mouse monoclonal Anti- α -Actinin (sarcomeric), A7811	Sigma-Aldrich	1:800
Acetylcholin-esterase	Ziege	Anti-Choline Acetyltransferase Antibody, AB144P	Chemicon	1:100
CD31	Ratte	Purified Rat Anti-Mouse, CD31 (PECAM-1), 550274	BD Pharmingen	1:200
DDR2	Ziege	Goat polyclonal DDR2-Antibody, (N-20), sc-7555	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:800
HCN4	Kaninchen	Anti-HCN4, APC-052	Alamone labs	1:100
Islet-1	Kaninchen	Anti-Islet 1 antibody - Neural Stem Cell Marker	Abcam	1:50
Nkx2.5	Kaninchen	Nkx-2.5 antibody (H-114), sc-14033	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:100
Smooth Muscle-Myosin Heavy Chain	Kaninchen	Anti-Myosin IgG, Smooth Muscle, BT-652	bti-Biomedical Technologies, Inc.	1:100
Smooth Muscle Actin	Maus	Human α -Smooth Muscle Actin MAb (Clone 1A4),	R&D Systems	1:800

		MAB1420		
Wilms-Tumor 1	Kaninchen	Anti-Wilms Tumor, Monoclonal Rabbit Anti-Mouse IgG, ab89901	Abcam	1:250

2.10.2 Zweite Antikörper

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
Ziegen-IgG	Alexa Fluor 488® Goat Anti-Rabbit IgG, A 11034	Molecular Probes, Life Technologies	1:800
Ratten-IgG	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rat IgG (H+L), Antibody, A 11006	Molecular Probes, Life Technologies	1:800
Ratten-IgG	Northern Lights 557 Anti-Rat IgG, NL013	R&D Systems	1:200

2.11 Verwendete Computerprogramme

Name	Hersteller
Axiovision	Zeiss
ZEN 2011, 6.1	Zeiss
ProgRes® Capture Pro 2.8.8	JENOPTIK Optical Systems

Microsoft Excel 2010, 14.0	Microsoft
Microsoft Powerpoint 2010, 14.0	Microsoft
Microsoft Word 2010, 14.0	Microsoft

3 Ergebnisse

3.1 Gewichtskontrolle im Laufe der Intervention

Bei einer mehrtägigen Behandlung mit einer eher schlecht beschriebenen Substanz wie TB4 ist es wichtig festzustellen, ob diese möglicherweise auch andere, unerwünschte Wirkungen zeigt. Um festzustellen, ob die Behandlung mit TB4 einen Effekt auf das Gewicht der Versuchstiere hatte, wurde eine Subgruppe während der 14-tägigen Intervention täglich gewogen (Tab. 11 im Anhang). Hier zeigte sich kein Unterschied im Gewichtsverlauf zwischen den TB4- und den NaCl-behandelten Tieren.

3.2 Einfluss von TB4 auf Islet-1 ohne LAD-Ligatur

Wir haben zunächst die Auswirkung von TB4 auf Islet-1 im gesunden Herz untersucht. Hierzu wurde Isl1-nLacZ-Mäusen TB4 intraperitoneal injiziert (7 Tage á 12 mg/kg KG). Nach 7 Tagen wurden die Tiere getötet und die Herzen entnommen. Anschließend wurden die Herzen X-Gal gefärbt. Bei der ersten makroskopischen Kontrolle nach Organentnahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen den TB4 behandelten Tieren und den Kontrolltieren. Alle Isl1-nLacZ-Tiere zeigten nLacZ-positive Areale in den drei bekannten Bereichen (Abbildung 8 und 9):

1. In kardialen Ganglien, als punktförmige Areale auf der Rückseite des Herzens,
2. Im Sinusknoten, als bandförmige Struktur am oberen Bereich des rechten Vorhofs
3. Im Bereich des ventrikulären Ausflusstraktes an Aorta und Pulmonalarterie

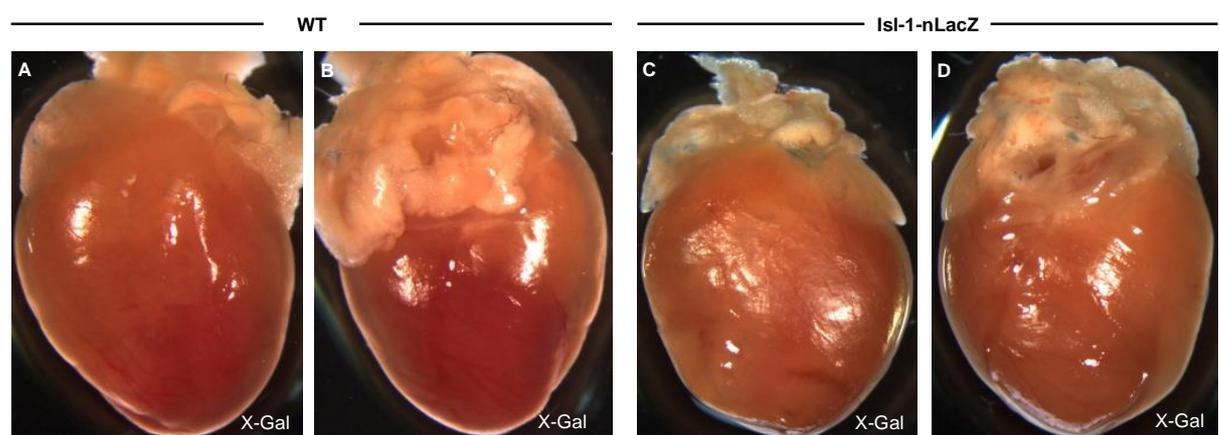


Abb. 8: X-Gal-Färbung von gesunden Herzen nach 7-tägiger TB4-Behandlung. A und B: Ventral- und Dorsalansicht eines WT-Herz und (C und D): eines Isl1-nLacZ-Herz nach X-Gal-Färbung. nLacZ-positive Strukturen sind als blaue Struktur zu erkennen.

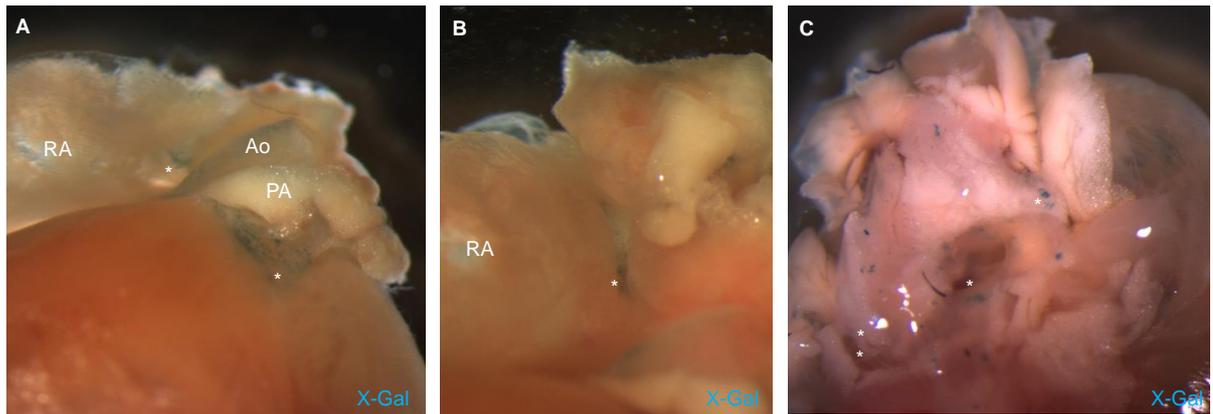


Abb. 9: Darstellung der nLacZ-positiven Strukturen in höherer Vergrößerung.

A: ventrikulärer Ausflusstrakt mit Aorta (Ao) und Pulmonalarterie (PA), B: rechter Vorhof (RA). C: Blick auf die Rückseite des Herzens. nLacZ-positive Strukturen sind mit einem Stern (*) markiert.

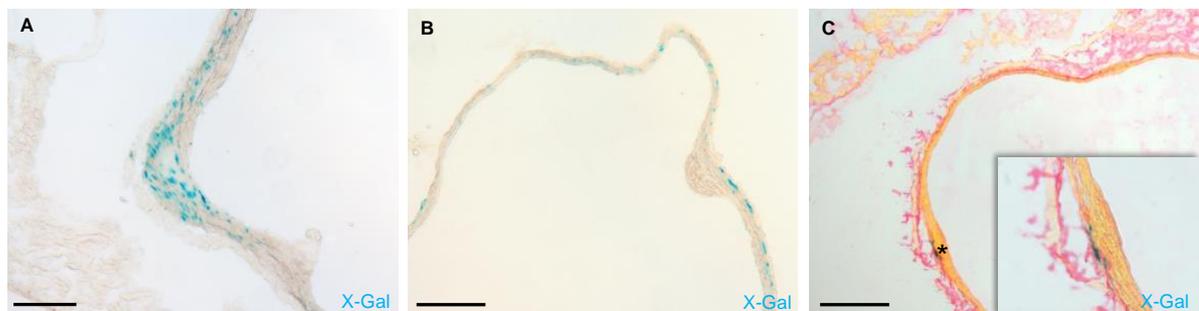


Abb. 10: nLacZ-positive Zellen im Bereich des ventrikulären Ausflusstraktes.

nLacZ-positive Zellen in der proximalen Aorta (A) und der proximalen Pulmonalarterie (B) ohne Gegenfärbung. C: Sirius-Rot-Färbung der proximalen Pulmonalarterie. nLacZ-positive Zellen sind mit einem Stern markiert (*) und in höherer Vergrößerung dargestellt. Maßstabsbalken: (A) 50 μ m, (B, C) 100 μ m

Zur mikroskopischen Kontrolle auf nLacZ-positive Zellen wurde jeder 10. Objektträger mit PFA fixiert und ungefärbt mithilfe eines Durchlichtmikroskops auf nLacZ-positive Zellen analysiert. Auch mikroskopisch ließen sich diese Zellen in den oben beschriebenen Regionen nachweisen. So waren nLacZ-positive Zellen in der Pulmonalarterie und der proximalen Aorta zu erkennen (Abb. 10). Zusätzlich zeigten sich nLacZ-positive Sinusknotenzellen, charakterisiert durch die Koexpression von nLacZ und HCN4. Immunhistologisch zeigten sich außerdem Acetylcholinesterase-positive (neuronal) Zellen des Sinusknotens (Abb. 11).

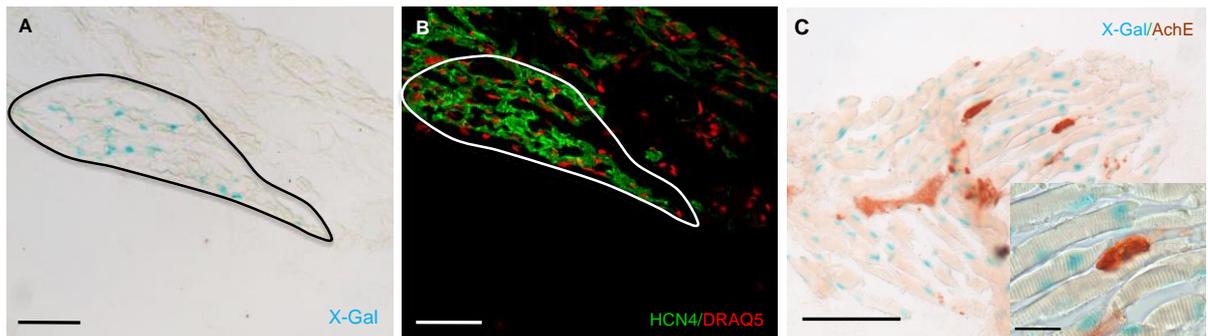


Abb. 11: nLacZ-positive Zellen im Sinusknoten. A: nLacZ-positive Zellen, B: Diese Zellen sind positiv für *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4* (HCN4). Der nLacZ-positive Teil des Sinusknoten ist in A und B umkreist. C: Immunhistologische Charakterisierung von nLacZ-positiven Zellen mittels einer Acetylcholinesterasefärbung (AchE). Maßstabsbalken: (A,B, C) 50 µm

Weiterhin fanden sich nLacZ-positive Ganglien (Abb. 12).

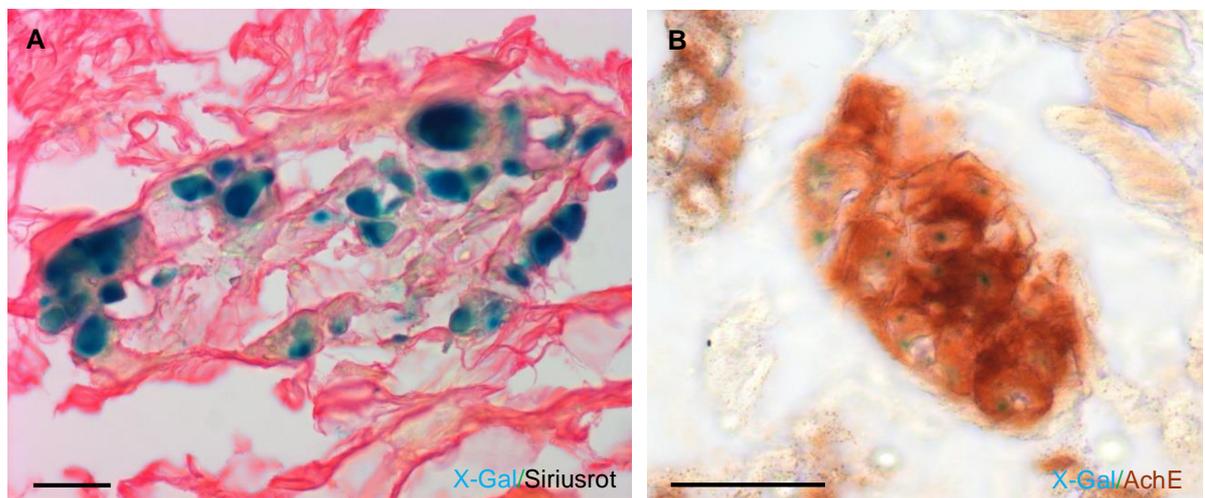


Abb. 12: nLacZ-positive Zellen in kardialen Ganglion. A: nLacZ-positive Zellen im Bereich der Pulmonalvenen. B: Histochemische Charakterisierung mittels einer Acetylcholinesterasefärbung (AchE). Maßstabsbalken: (A, B) 50 µm

Es zeigten sich keine nLacZ-positiven Zellen in anderen Regionen des Herzens. Bei den Wildtyptieren wurden im gesamten Herzen keine nLacZ-positiven Zellen gefunden.

3.3 Einfluss von TB4 auf Islet-1 nach LAD-Ligatur

Als nächstes wurde untersucht, ob TB4 einen Einfluss auf die Expression von Islet-1 im adulten Herzen nach Myokardinfarkt hat. Es wurden 8 transgene ISL1-nLacZ-Mäuse mit TB4 behandelt (Protokoll: Smart et al., 2011). 5 transgenen Kontrolltieren wurde NaCl verabreicht (Abb. 13). Am siebten Tag erfolgte die operative permanente

Ligatur der LAD. Die Herzentnahme erfolgte am zweiten, siebten bzw. 14. postoperativen Tag. Anschließend wurden die Herzen mit X-Gal gefärbt.

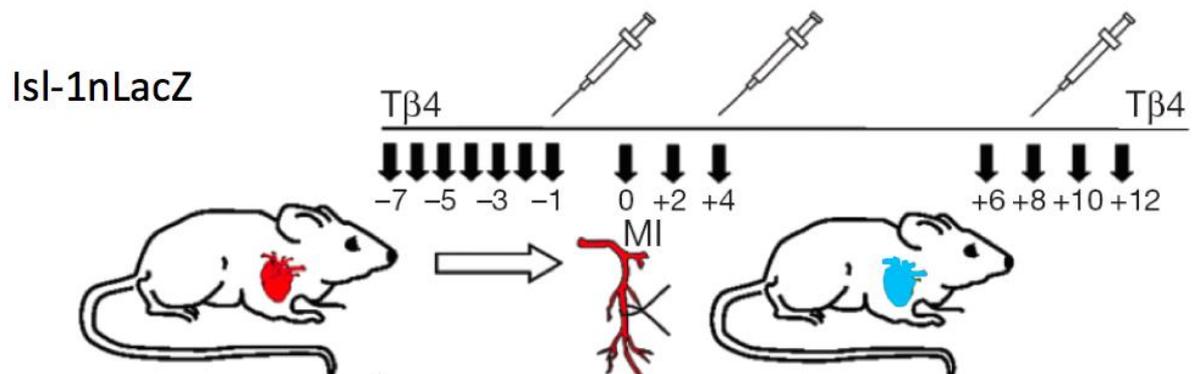


Abb. 13: Studienprotokoll. Isl-1nLacZ-Mäuse erhielten TB4 über sieben Tage als intraperitoneale Injektion. Anschließend erfolgte die permanente Ligatur der LAD zur Infarzierung des Myokards. Postoperativ wurde jeden zweiten Tag TB4 verabreicht. Die histologische Analyse erfolgte 2, 7 und 14 Tage post-OP. Kontrolltiere erhielten NaCl als intraperitoneale Injektion. nLacZ-positive Zellen zeigen sich in diesem transgenem Modell als blaue Zellen (aus: Smart et al. 2011).

3.3.1 Bestimmung der Infarktgröße

Verschiedene Studien haben einen positiven Einfluss von TB4 auf infarziertes Myokard beschrieben. Wir haben deshalb zunächst das Ausmaß der Infarzierung bestimmt: bei der makroskopischen Betrachtung zeigten sich ein abgeblasstes Areal im Bereich der Vorderwand. Makroskopisch unterschieden sich die TB4- und NaCl-behandelten Tiere nicht bezüglich der Infarktgröße (Abb. 14).

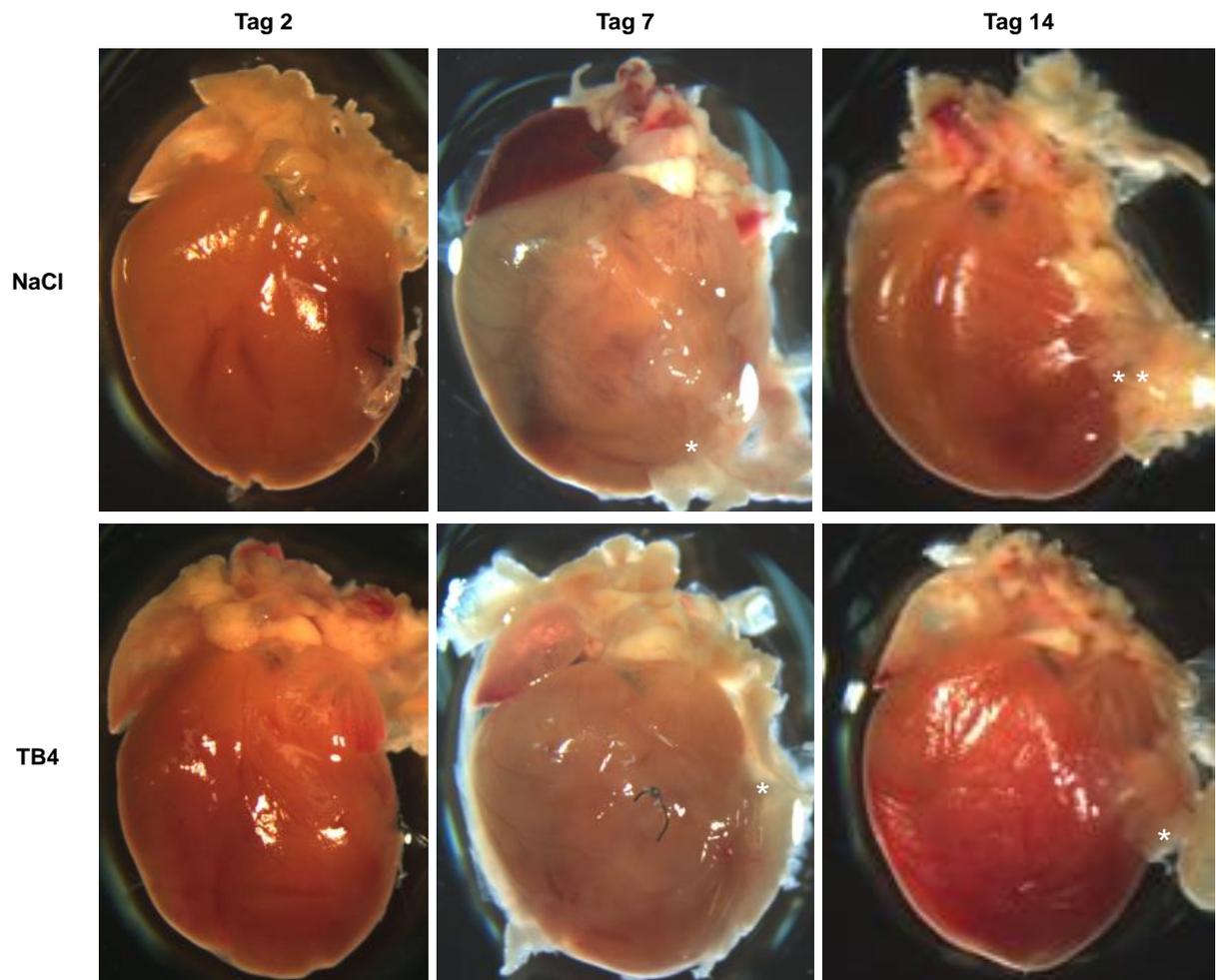


Abb. 14: Übersicht der infarzierten Herzen 2, 7 und 14 Tage nach LAD-Ligatur. Vorderwandansicht der NaCl- und der TB4-behandelten Herzen. Zum Teil sieht man deutlich die Gewebsverwachsungen (*).

Die Infarktgröße wurde anschließend histologisch exakter bestimmt. Es wurden pro Herz ca. 10 Objektträger, von der Basis bis zum Apex, Sirius-Rot gefärbt (Abb. 15). Herzmuskulatur wird in dieser Färbung gelb und Bindegewebe (z.B. die Infarkt Narbe) rot dargestellt. Anhand dieser Färbungen erfolgte die Analyse der Infarktgröße. Die Bestimmung der Infarktgröße geschah auf Ebene der Papillarmuskeln. Insgesamt stellten wir fest, dass es bei fast allen Tieren nur zu kleinen, meist nicht-transmuralem, Infarkten gekommen war. Zudem war die Variabilität innerhalb der beiden Gruppen sehr groß. Ein Unterschied in der Infarktgröße zwischen TB4 behandelten Tieren und Kontrolltieren wurde nicht erkannt.

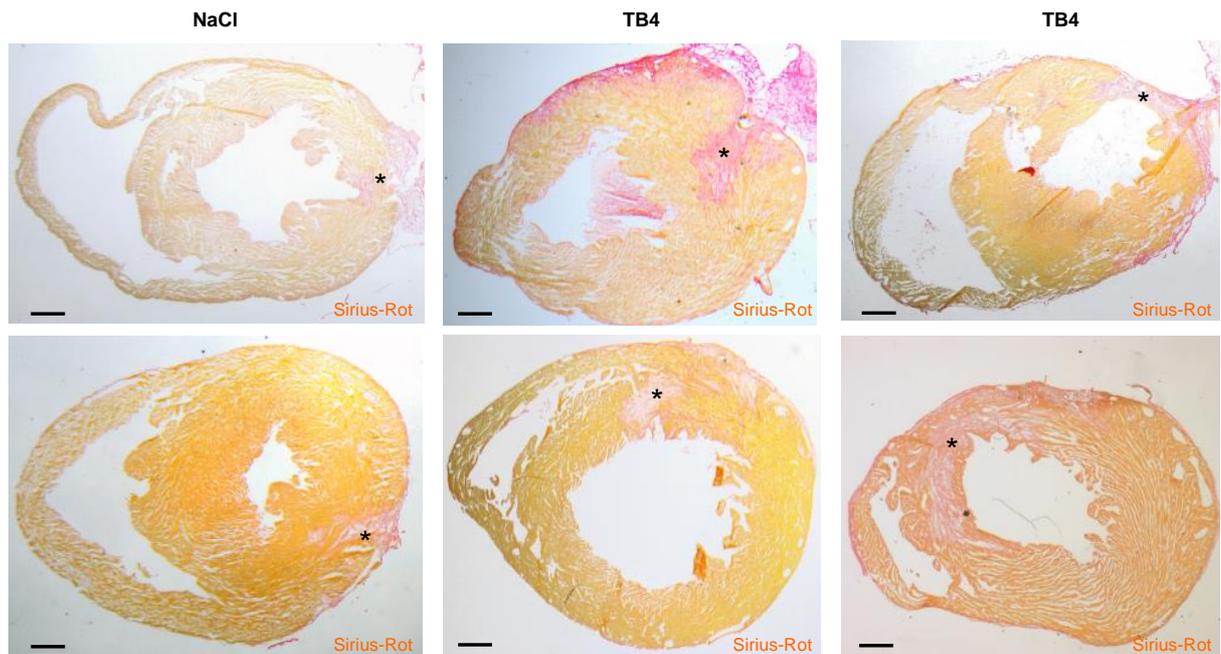


Abb. 15: Mikroskopische Infarktbeurteilung, 7 Tage nach Infarkt. Transversale Gewebeschnitte von infarzierten Herzen nach Behandlung mit NaCl bzw. mit TB4. Mit einem Sternchen (*) sind die durch die Infarzierung entstandenen Narben markiert. Maßstabsbalken: 0,5 mm

3.3.2 Islet-1-positive Zellen

nLacZ-positive Strukturen waren makroskopisch in den bereits oben beschriebenen Regionen (Sinusknoten, ventrikulärer Ausflusstrakt, kardiale Ganglien) zu finden. Bei zwei Herzen zeigten sich unklare LacZ-positive Areale im Bereich des infarzierten Myokards (makroskopisch in Abb. 16, mikroskopisch in Abb. 17). Bei genauerer Betrachtung stellten diese sich aber als Artefakte heraus, da das X-Gal-Signal eindeutig nicht nukleär lokalisiert und eher verwaschen und flächig verteilt war. Bei der mikroskopischen Betrachtung konnte ebenfalls festgestellt werden, dass das LacZ-Signal teilweise nicht in einer Ebene mit dem Gewebeschnitt lag, also eher „auf“ statt „im“ Myokard lokalisiert war (Abb. 17, A-D). Im Gegensatz dazu zeigten sich für Islet-1 spezifische nLacZ-Signale klar nukleär liegend und scharf begrenzt. Des weiteren fanden sich LacZ-positive Zellen im Infarktgebiet, die eine zytosolische LacZ-Färbung zeigten. Diese Zellen waren rund-kugelig, teilweise war granuliertes Zytoplasma erkennbar (Abb. 17, E-H)

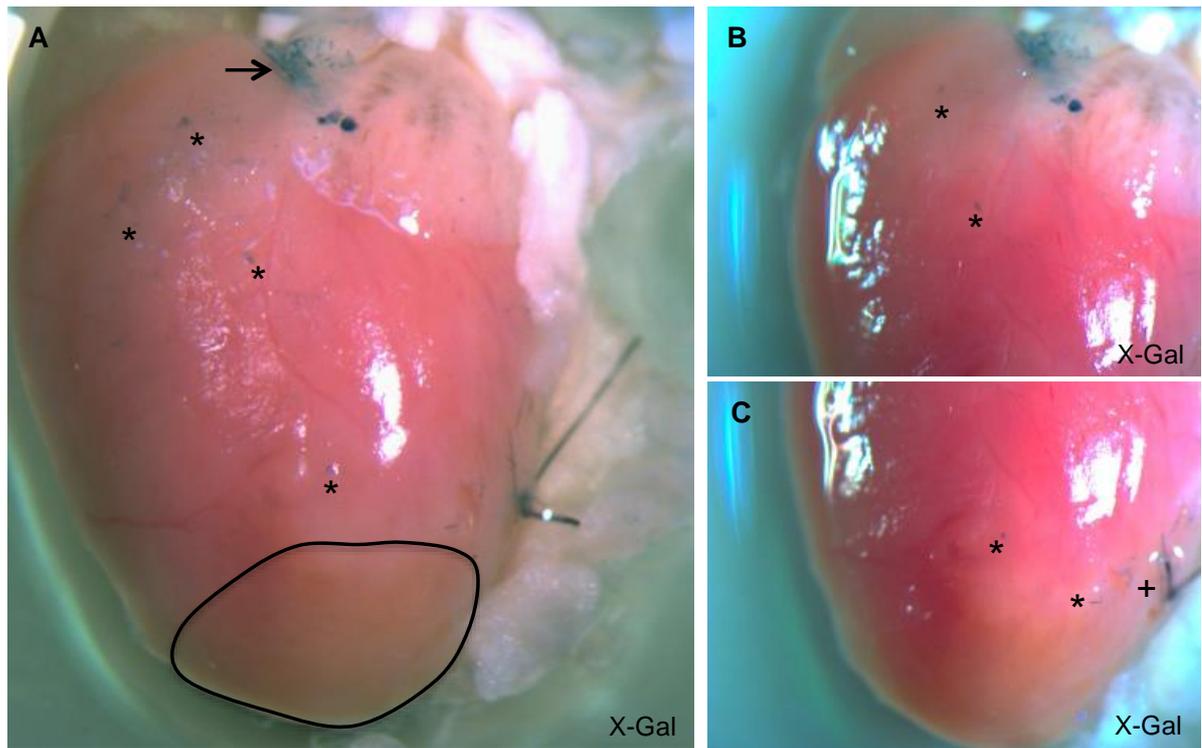


Abb. 16: Makroskopische Beurteilung eines infarzierten Herzens. TB4-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt, A: Vorderwandansicht mit deutlich LacZ-positiven Strukturen, welche mit Sternen gekennzeichnet sind (*). Das infarzierte Areal ist umkreist. Der Pfeil zeigt auf den LacZ-positiven Sinusknoten. B und C: Höhere Vergrößerung der nLacZ-positiven Strukturen (*). Mit (+) ist der Faden der LAD-Ligatur markiert.

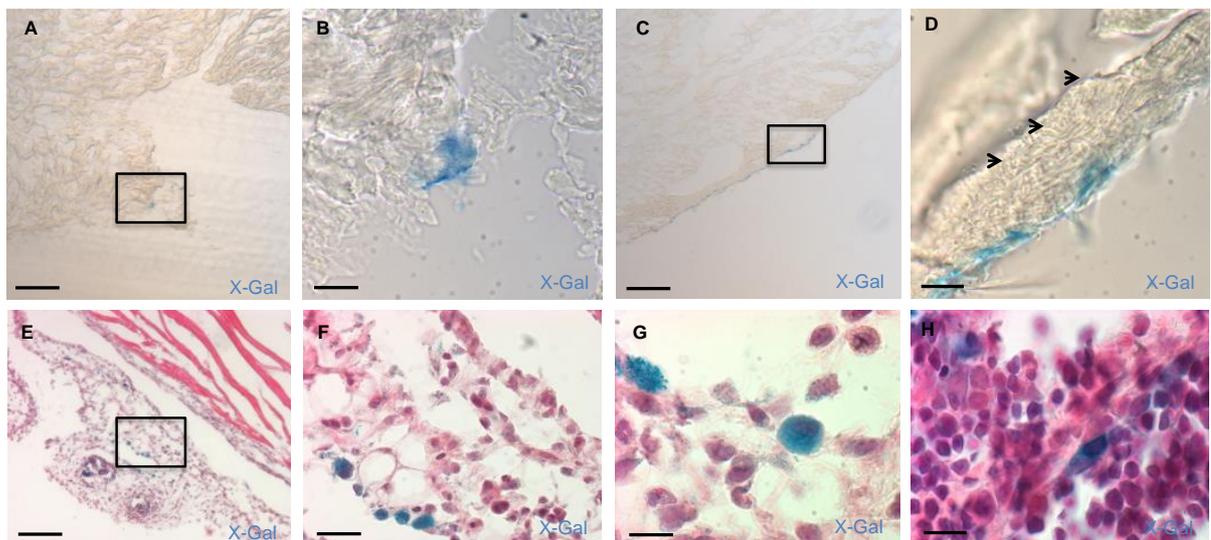


Abb. 17: X-Gal-positive Areale im Myokard. A-D: Exemplarische X-Gal-positive Bereiche im Myokard (Kästen in A und C), jeweils in höherer Vergrößerung (B und D). E: X-Gal-positive Zellen im Bereich des Epikards. F: Höhere Vergrößerung des Ausschnitts (Kasten) aus E. G, H: X-Gal-positive Zellen in epikardialen Verwachsungen (E-H: H.E.-Färbung). Maßstabsbalken: (B, F) 50 µm, (A, C, E) 100 µm (D, G, H) 10 µm

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Herzen fanden wir nLacZ-positive Zellen, welche im Myokard der Vorderwand lagen und epikardial lokalisiert waren. Zunächst wirkte es, als ob diese Zellen tief im Infarktareal liegen würden. Bei genauerer Analyse stellte sich aber heraus, dass es sich um schon in der Literatur beschriebene nLacZ-positive Kardiomyozyten des ventrikulären Ausflusstraktes handelte (Weinberger et al. 2012). Diese Zellen waren nach einer immunhistologischen Färbung positiv für α -Actinin (Abb. 18).

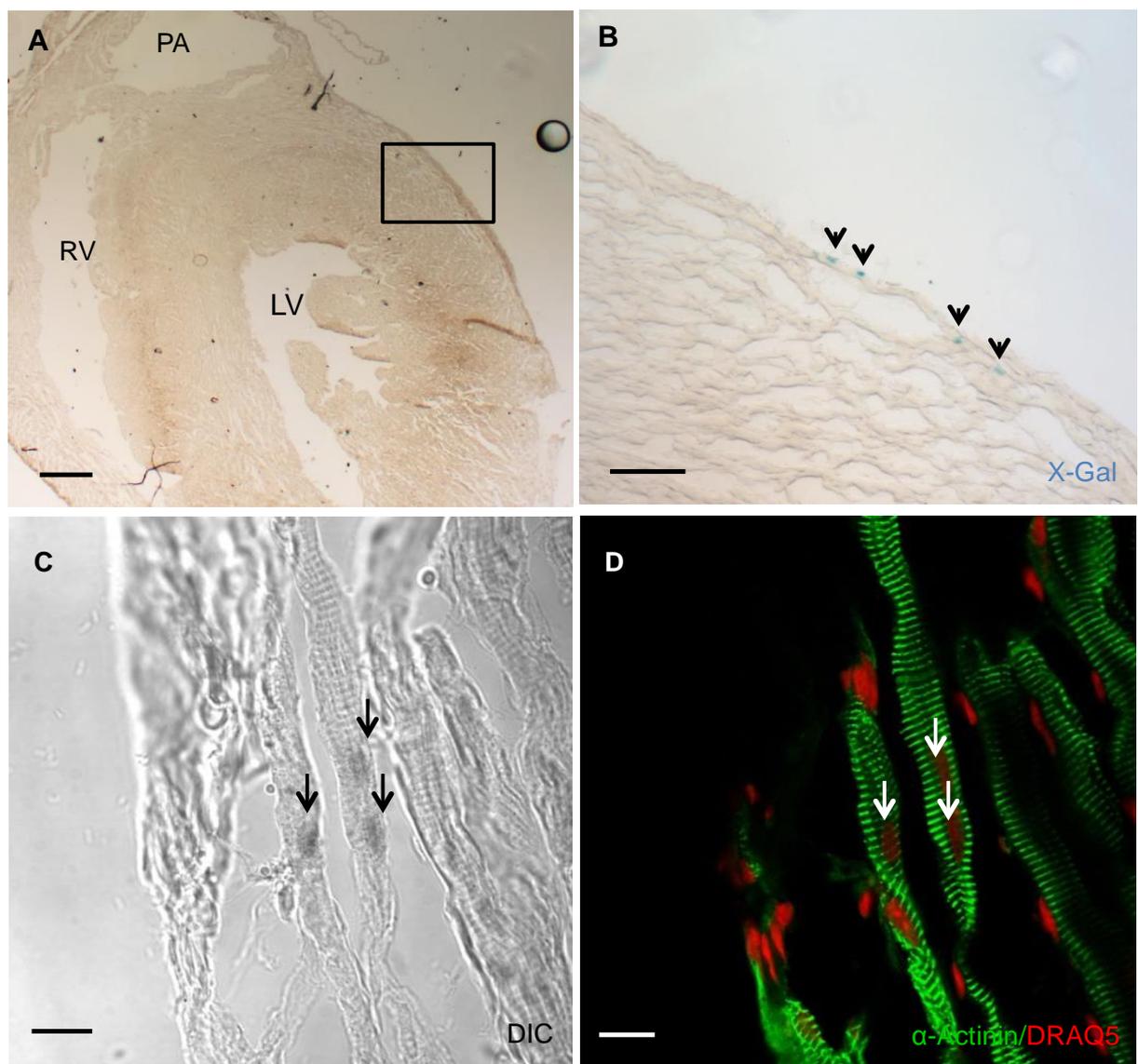


Abb. 18: nLacZ-positive Zellen aus dem Ausflusstrakt. TB4-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt. A: Zweikammerblick auf infarziertes Herz, B: Vergrößerte Darstellung des Ausschnittes (Kasten) aus A. Zu sehen sind vier epikardial liegende LacZ-positive Zellen, (Pfeile). C und D: Immunhistologische Charakterisierung zeigt α -Actinin-positive Zellen. (RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel, PA: Pulmonalarterie) Maßstabsbalken: (A) 500 μ m, (B) 100 μ m, (C, D) 20 μ m

Des Weiteren fanden wir insgesamt 18 Zellen im Bereich des Ventrikelmyokards, die fraglich nLacZ-positiv waren. Hiervon waren 14 Zellen in den TB4 behandelten Tieren lokalisiert. 4 Zellen waren in Kontrolltieren der Kontrollgruppe zu finden.

Von den initial 18 fraglich positiven Zellen konnten letztlich nur drei Zellen identifiziert werden, die sicher ein nukleär lokalisiertes LacZ-Signal zeigten. Als sicher nukleäres LacZ-Signal (nLacZ) wurden nur solche Zellen gewertet, deren LacZ-Signal sich gleichzeitig mit dem Kernfarbstoff DRAQ5 anfärbte (Kokalisation; $\text{DRAQ5} + \text{LacZ} = \text{nLacZ} = \text{Islet-1}$). Als unspezifisch LacZ-positiv wurde solche gewertet, die zwar ein augenscheinliches, nukleäres LacZ-Signal zeigten, jedoch ohne gleichzeitige Kokalisation mit DRAQ5. Zwei Zellen mit einem fraglich nukleärem LacZ-Signal sind in Abbildung 19 und 20 dargestellt. Beide fanden sich in NaCl-behandelten Kontrolltieren. Die Zelle in Abb. 19 war LacZ-unspezifisch und WT1-negativ. Die Zelle in Abb. 20 konnte, technisch bedingt, immunhistologisch nicht weiter charakterisiert werden.

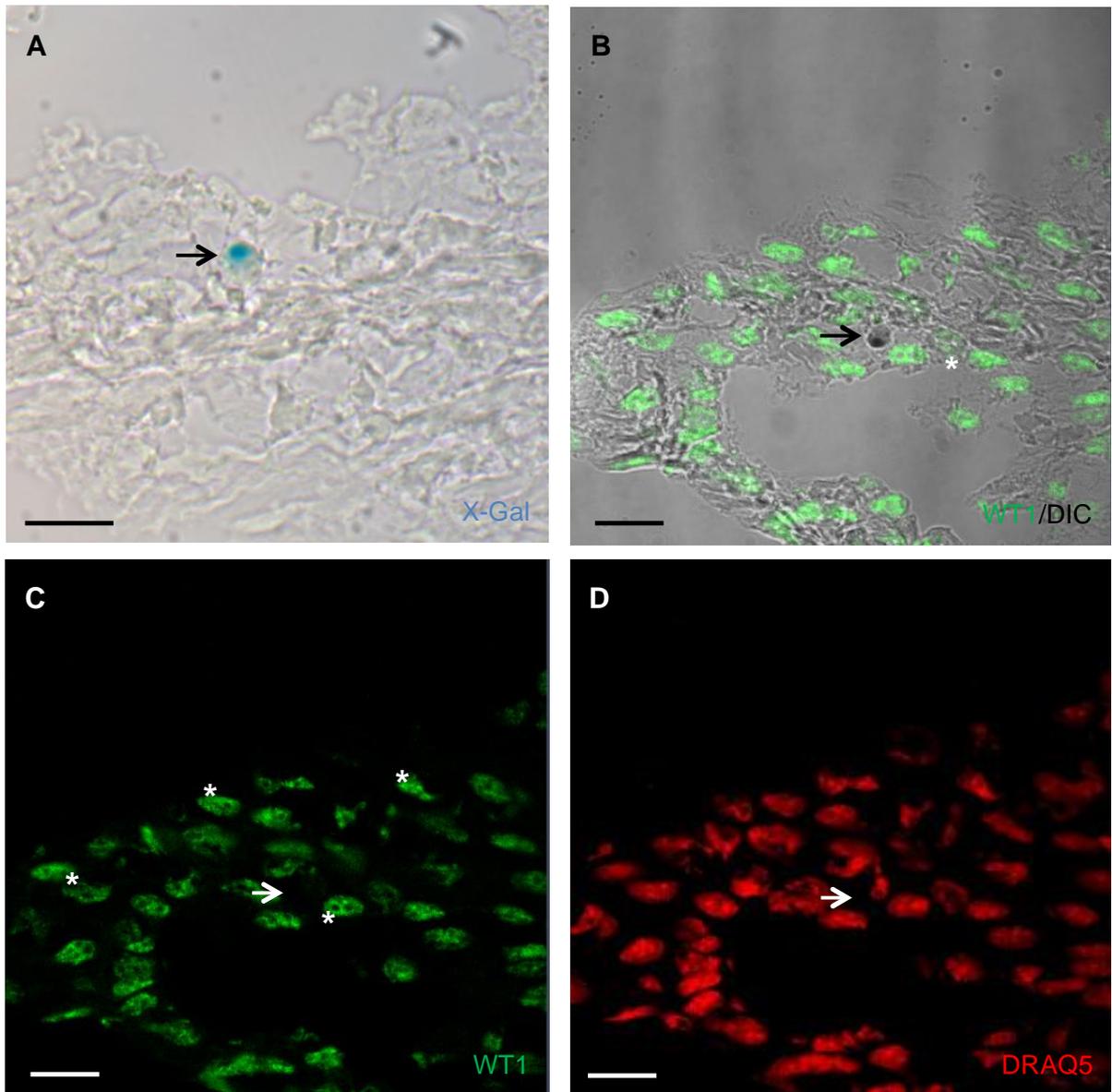


Abb. 19: Immunhistologische Charakterisierung einer LacZ-positiven Zelle. NaCl-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt. A: fraglich-nukleäre LacZ-positive Zelle (Pfeil). B und C: Auch hier erfolgte analog zu Abb. 15 die Charakterisierung mittels WT1. Die Zelle ist negativ für WT1 und umgeben von anderen WT1-positiven Zellen (Sternchen). D: Das LacZ-Signal ist nicht nukleär lokalisiert. Maßstabsbalken: 25 μ m

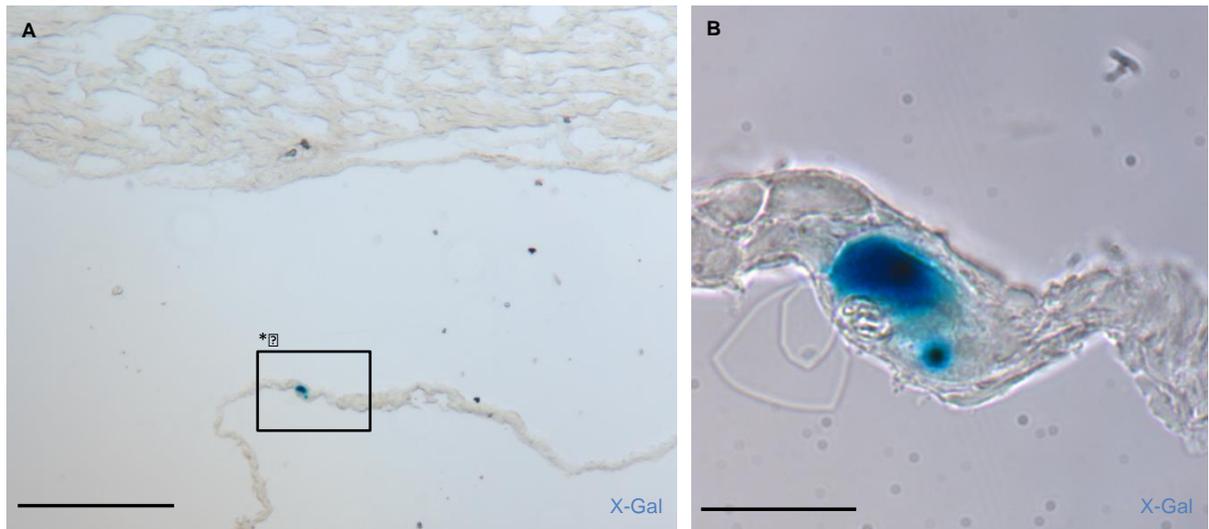


Abb. 20: Fragliche nLacZ-positive Zelle. NaCl-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt. A: Gewebeverwachsungen mit LacZ-Signal (Kasten). B: höhere Vergrößerung des Signals. Maßstabsbalken: (A) 100 μ m, (B) 50 μ m

In Abbildung 21 ist die erste eindeutig nLacZ-positive Zelle dargestellt (Zelle #1). Hier wurde eine immunhistologische Charakterisierung mit Nkx2.5 als Marker früher kardialer Vorläuferzellen versucht. Die Zelle zeigte kein positives Signal für Nkx2.5. Direkt neben dieser nLacZ-positiven Zelle fand sich eine weitere Zelle, welche jedoch kein nukleäres LacZ-Signal zeigte und ebenfalls negativ für Nkx2.5 war. Die zweite Zelle mit eindeutig nukleärem LacZ-Signal (Zelle #2) war dezent positiv für Wilms-Tumor-1 (WT1), einem möglichen Marker epikardialer Vorläuferzellen (Abb. 22). Die dritte nLacZ-positive Zelle fand sich in einem TB4-behandelten Tier (Zelle #3). Hier war der Nachweis von α -Actinin negativ (Abb. 23).

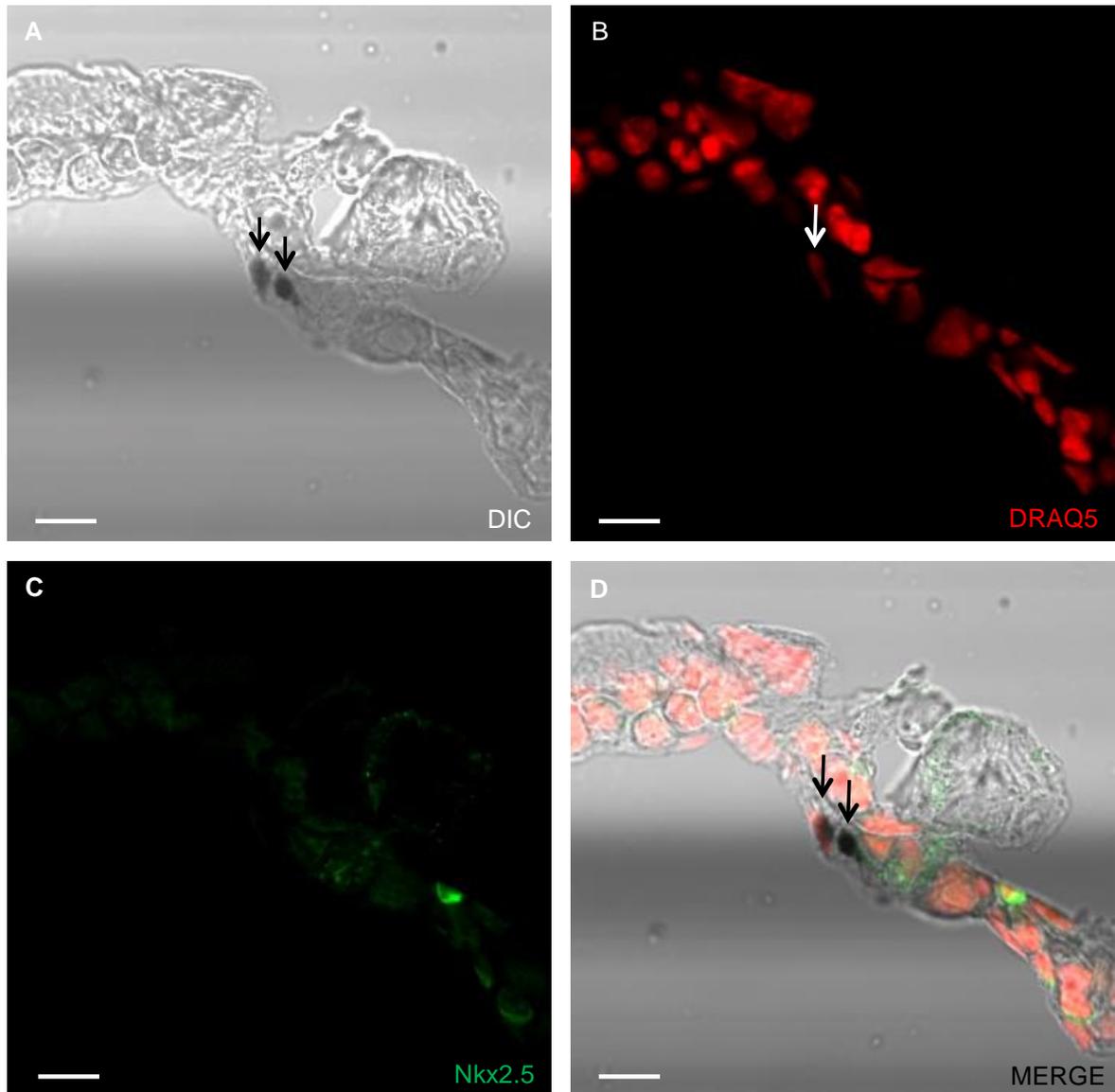


Abb. 21: Immunhistologische Charakterisierung der nLacZ-positiven Zelle #1. NaCl-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt. A: DIC-Aufnahme zweier nLacZ-positiven Zellen (Pfeile), B: DRAQ5 zeigt ein nukleäres Signal für eine positive Zelle (Pfeil), die daneben liegende Zelle ist negativ. C: Immunhistologisch zeigt sich kein positives Signal für NKX2.5 in beiden Zellen, D: *Merge* der Aufnahmen A – C. Maßstabsbalken: 10 μ m

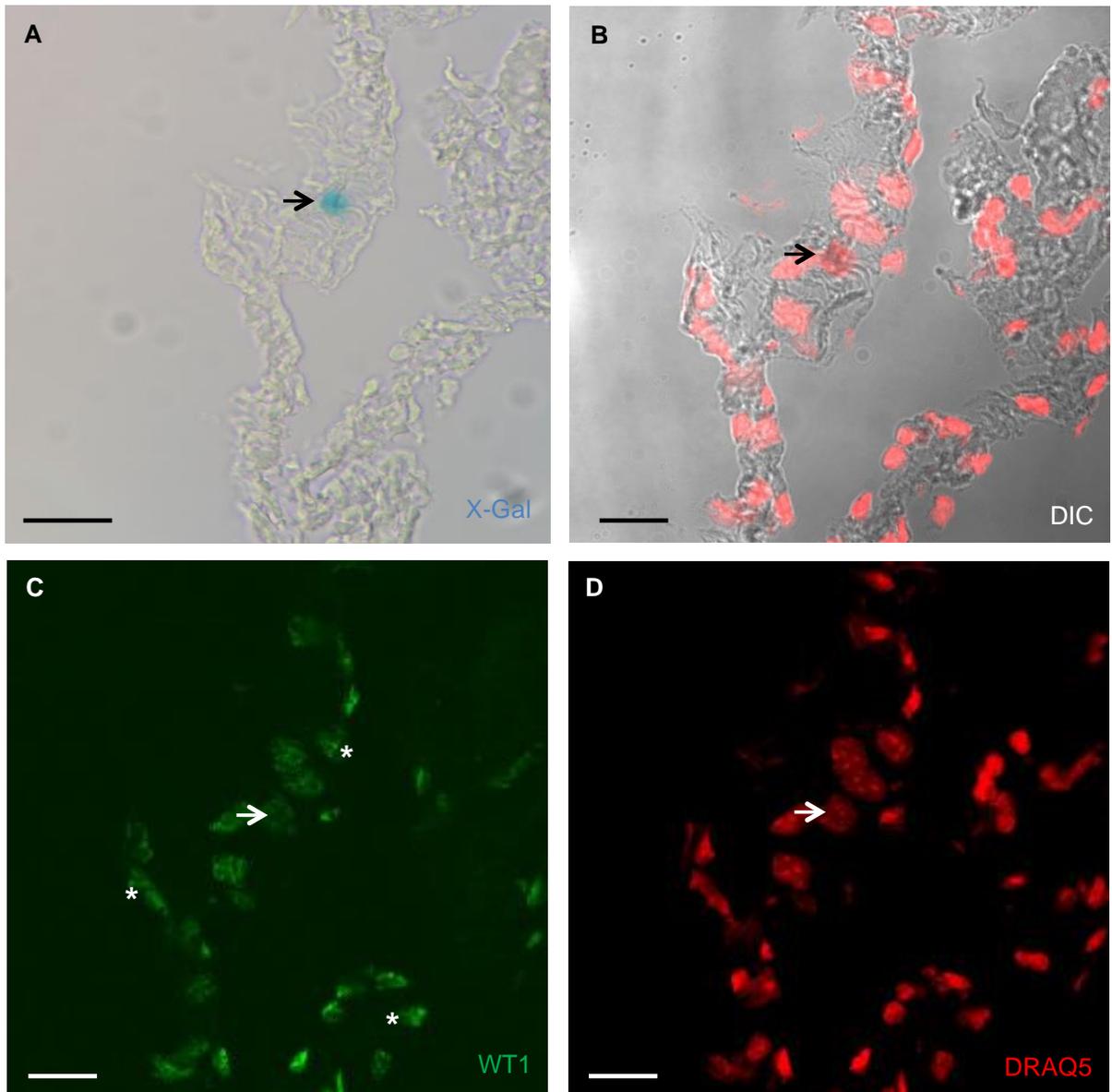


Abb. 22: Immunhistologische Charakterisierung der nLacZ-positiven Zelle #2. NaCl-behandelte Maus, 7 Tage nach Infarkt. A: LacZ-positive Zelle im Bereich des infarzierten Myokards. B und C: Immunhistologie mit Wilms-Tumor 1 (WT1). Die Zelle (Pfeil) ist schwach positiv. Die Sternchen markieren andere WT1-positive Zellen (nicht nLacZ-positiv). D: Die Anfärbung mit DRAQ5 zeigt ein nukleär lokalisiertes LacZ-Signals. Maßstabsbalken: 25 μ m

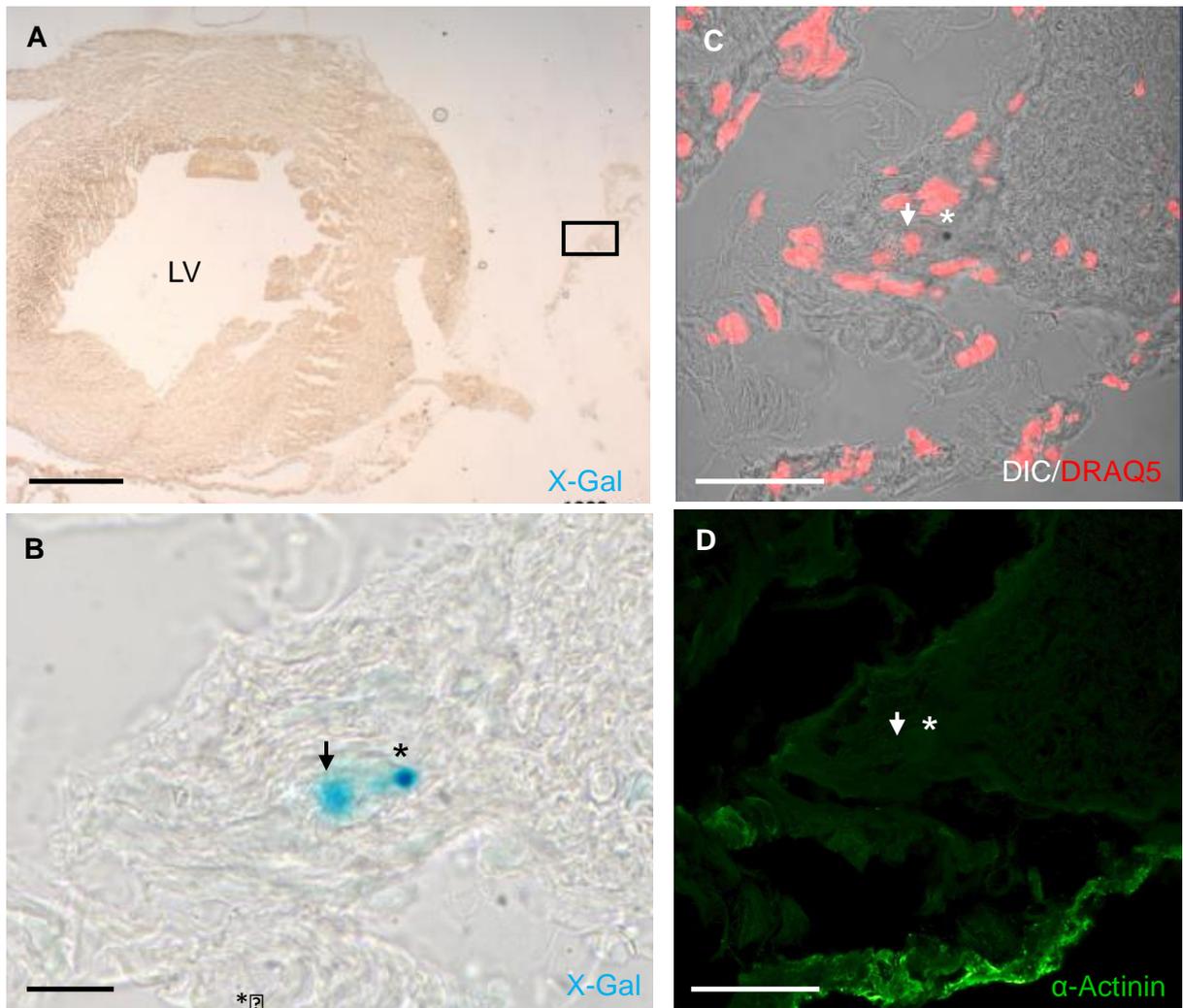


Abb. 23: Immunhistologische Charakterisierung der nLacZ-positive Zelle #3. TB4-behandelte Maus, 14 Tage nach Infarkt A: Infarziertes Herz, mit einem Kasten ist der Bereich markiert, in dem die Zelle gefunden wurde. B: Vergrößerte Darstellung des Kastens aus A mit der fraglichen Zelle (Pfeil) und einem zweiten, fraglich-spezifischen LacZ-Signal (Stern) C: DRAQ5-Anfärbung der Zelle. Es handelt sich um ein nukleäres Signal. Das mit einem Stern markierte LacZ-Signal ist DRAQ5 negativ. D: Immunhistologische Färbung mit α -Actinin, die nLacZ-positive Zelle (Pfeil) zeigt keine α -Actinin-Expression. Maßstabsbalken: (A) 1 mm, (B) 10 μ m, (C, D) 50 μ m

In Tabelle 8 sind die Befunde zu den nLacZ-positiven Zellen im infarzierten Myokard der Isl1-nLacZ-Mäuse zusammengefasst.

	Tag 2		Tag 7		Tag 14	
	NaCl	TB4	NaCl	TB4	NaCl	TB4
Anzahl der analysierten Tiere	n=1	n=2	n=3	n=4	n=1	n=2
Anzahl der analysierten Gewebeschnitte pro Tier	1000		3000		1000	
Anzahl neuer nLacZ-positiver Zellen *	0	0	2 (#1 und #2)	0	1 (#3)	

Tab. 8: Zusammenfassung der gefundenen nLacZ-positiven Zellen (* = als nLacZ-positiv gewertet wurden Zellen mit einer Kolo-kalisation von LacZ und DRAQ5)

3.4 Nachweis von CD31 im infarzierten Herzen nach 7 Tagen

Um die Wirksamkeit von TB4 im allgemeinen zu überprüfen, stellte sich die Frage nach einer Positivkontrolle. Da in der Literatur ein positiver Effekt auf die Neoangiogenese nach einer Myokardverletzung durch TB4 beschrieben ist, haben wir zur Untersuchung dieses Effektes infarkt-nahe- und ferne Schnitte mit einem Antikörper gegen CD31 gefärbt. Insgesamt zeigte sich nach 7 Tagen kein signifikanter Unterschied bezüglich der Kapillardichte zwischen TB4-behandelten und Kontrolltieren (Abb. 24).

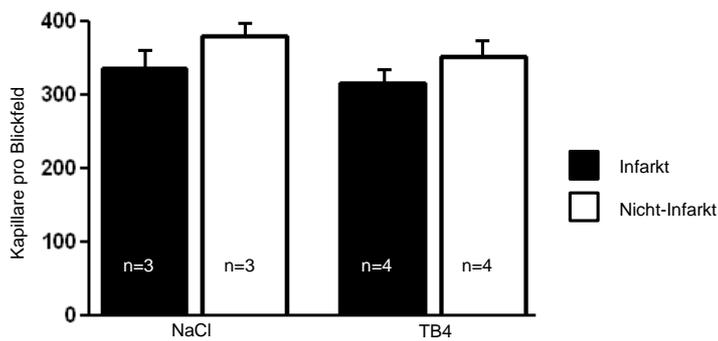
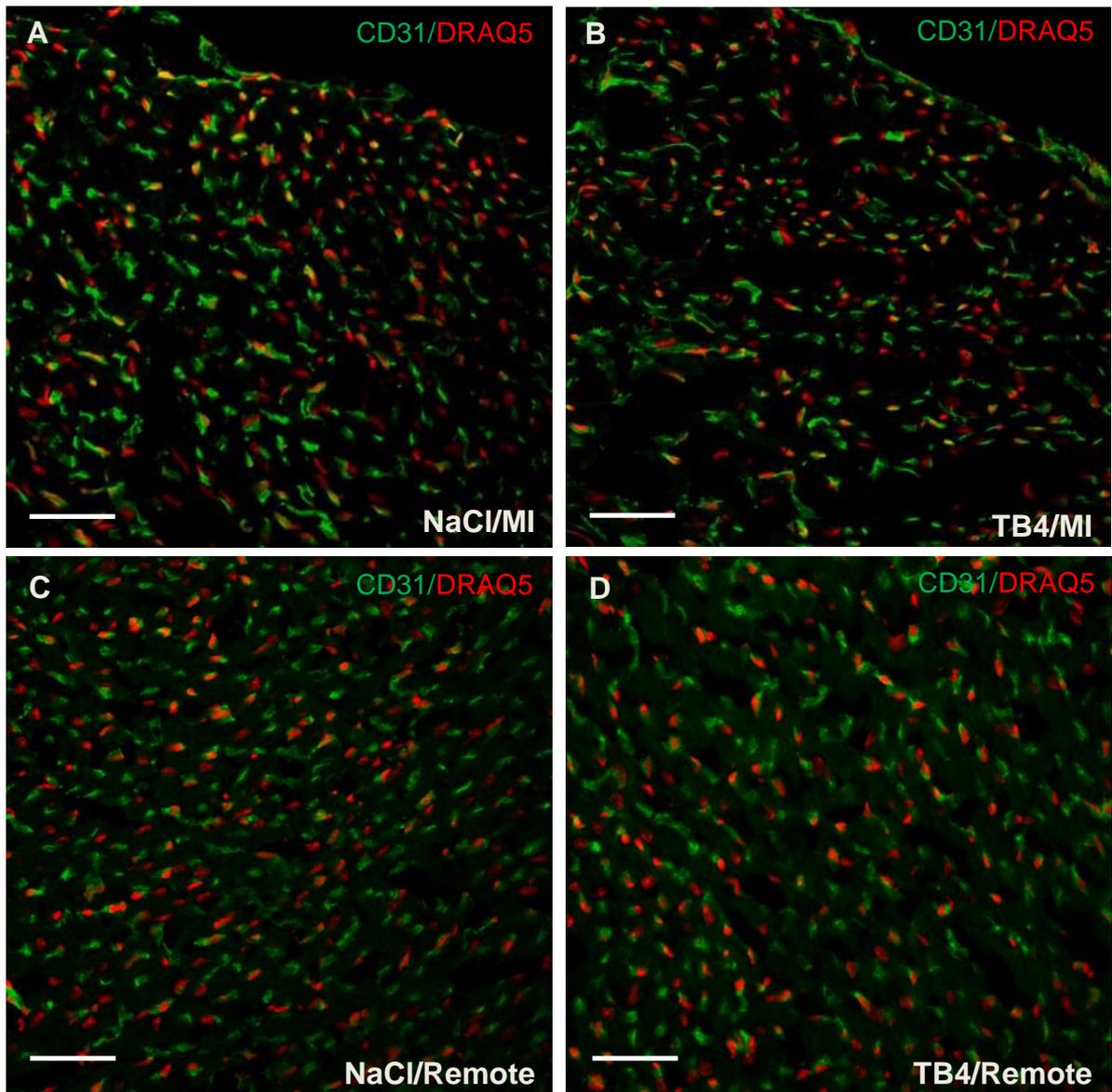


Abb. 24: Kapillardichte im infarzierten und nicht-infarzierten Myokard, 7 Tage nach Infarkt. Oben, A: exemplarische Darstellung der Kapillardichte mittels CD31 im infarzierten Myokard einer Kontroll- bzw. einer TB4-behandelten Maus (B). C: Kapillardichte im nicht-infarzierten Bereich einer Kontroll- bzw. TB4-Maus (D). Unten: statistische Auswertung der Kapillardichte, n = Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Gruppe. Pro Tier wurden 10 Gewebeschnitte analysiert. Maßstabsbalken: (A-D) 50 μ m.

3.5 Kultivierung von Zellen aus Islet1-nLacZ-Mäusen

Verschiedene Arbeiten haben einen Effekt von TB4 auf Zellen *in-vitro* beschrieben (Bock-Marquette et al. 2004; Smart et al. 2007; Smart et al. 2011). Um diese berichteten Effekte von TB4 auf die Expression von Islet-1 in adulten Zellen zu überprüfen, wurden gemäß einem Protokoll (Smart and Riley 2009) Explantationszellkulturen aus Islet1-nLacZ-Mäusen angefertigt. Diese wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen mit TB4-versetztem Medium (100 µl/ml Medium) inkubiert. Kontrollzellkulturen inkubierten mit TB4-freiem Medium. Entgegen dem Originalprotokoll, welches mit Gelatine-beschichtete Kulturschalen zur Kultivierung beschreibt, wurden unbeschichtete Schalen verwendet. Hier zeigten sich eindeutig bessere Ergebnisse hinsichtlich des Anwachsens des Gewebes.

3.5.1 Kultivierung von Zellen aus verschiedenen Bereichen des Herzens und immunzytologische Charakterisierung

Die Herzen wurden in einen apikalen „Islet-1-negativen“ und einen basalen „Islet-1-positiven“ Teil getrennt. Diese beiden Teile wurden separat kultiviert (Abb. 25).

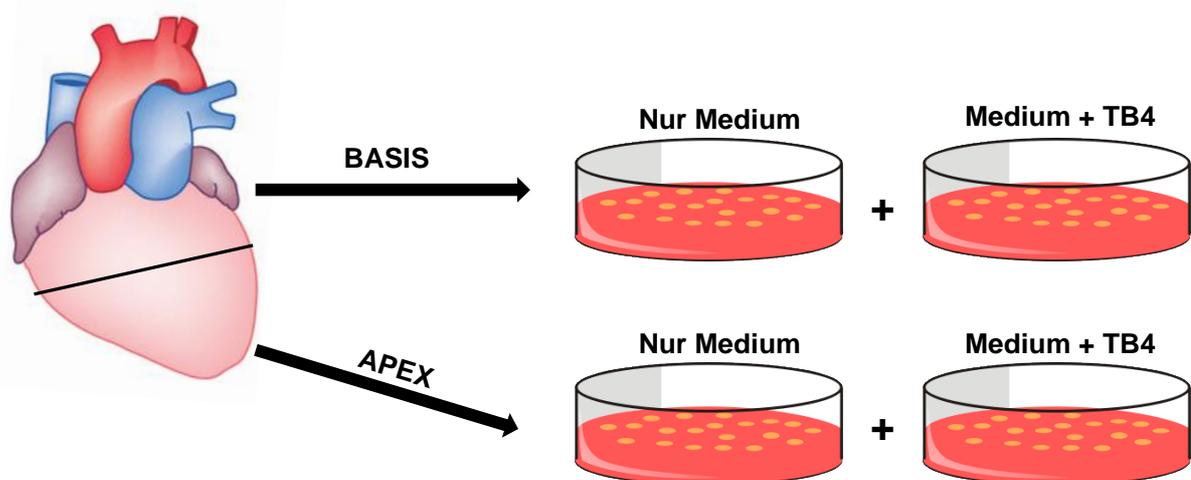


Abb. 25: Präparation der Herzen in Basis und Apex. Das Herz wurde unter mikroskopischer Kontrolle in zwei Bereiche getrennt: die Basis, welche die Islet-1-positiven Zellen des adulten Herzens enthält, und den Apex, welcher keine Islet-1-positiven Zellen enthält. Beide Areale wurden mit Medium alleine oder mit TB4-versetztem Medium inkubiert.

Die ersten ausgewachsenen Zellen fanden sich nach 2-3 Tagen in Gruppen um die Gewebstücke liegend. Beispielhaft sind Zellen aus einer Kultur über 6 Tage in Abbildung 26 gezeigt.

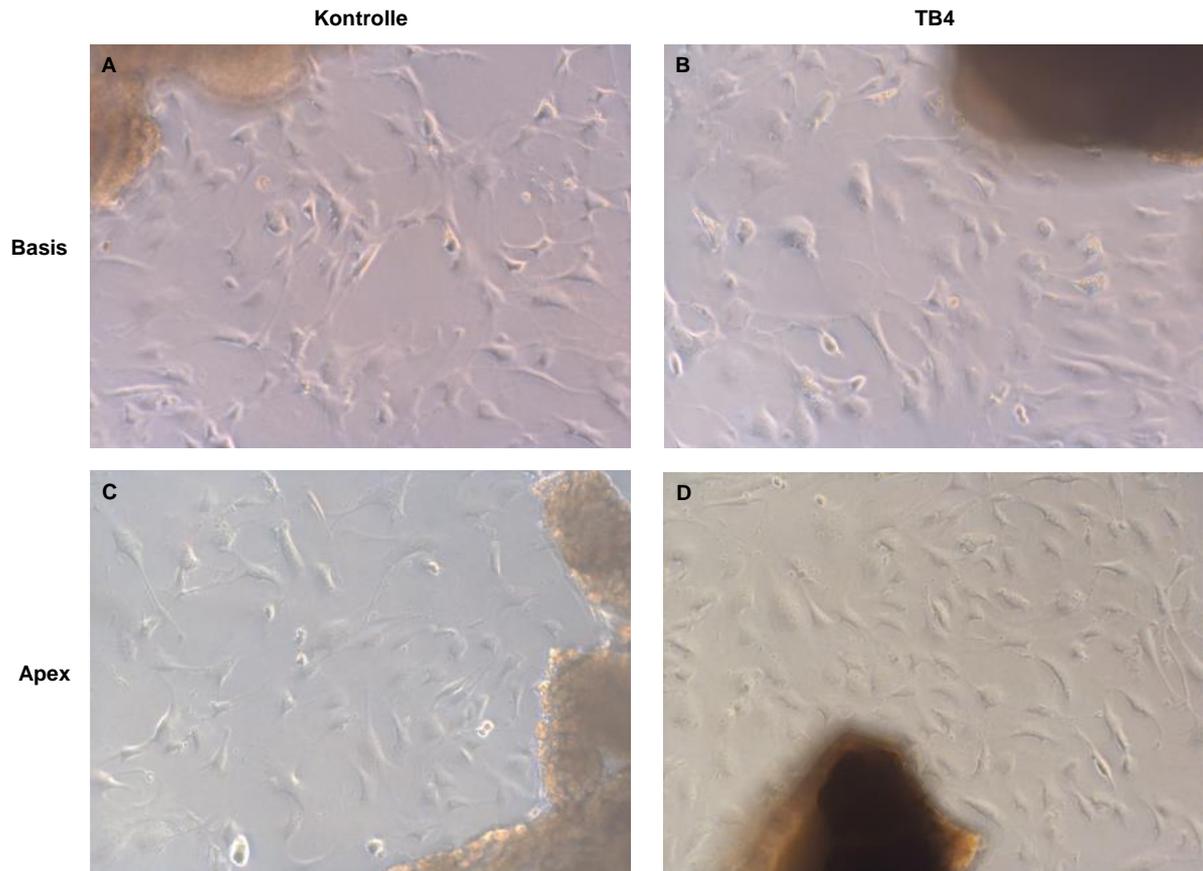


Abb. 26: : Zellproliferation aus Explantationskulturen nach 6 Tagen. Zellkulturen aus basalem und apikalem Herzgewebe von Isl1-nLacZ-Mäusen. A und B: ausgewachsene Zellen aus der Basis nach 6 Tagen ohne TB4 (A) bzw. mit TB4 im Medium (B). C und D: ausgewachsene Zellen aus dem Apex nach 6 Tagen ohne TB4 (C) bzw. mit TB4 im Medium (D).

Anschließend wurden die Zellen fixiert und X-Gal gefärbt. Es zeigten sich nLacZ-positive Zellen in den Zellkulturen aus der Basis. Diese waren über die gesamte Kulturschale verteilt. Die Zellen waren rund bis spindelförmig, mit langen Ausläufern oder langgestreckt und teilweise binukleär (Abb. 27). In den Zellkulturen aus den apikalen Anteilen konnte keine einzige nLacZ-positive Zelle gefunden werden.

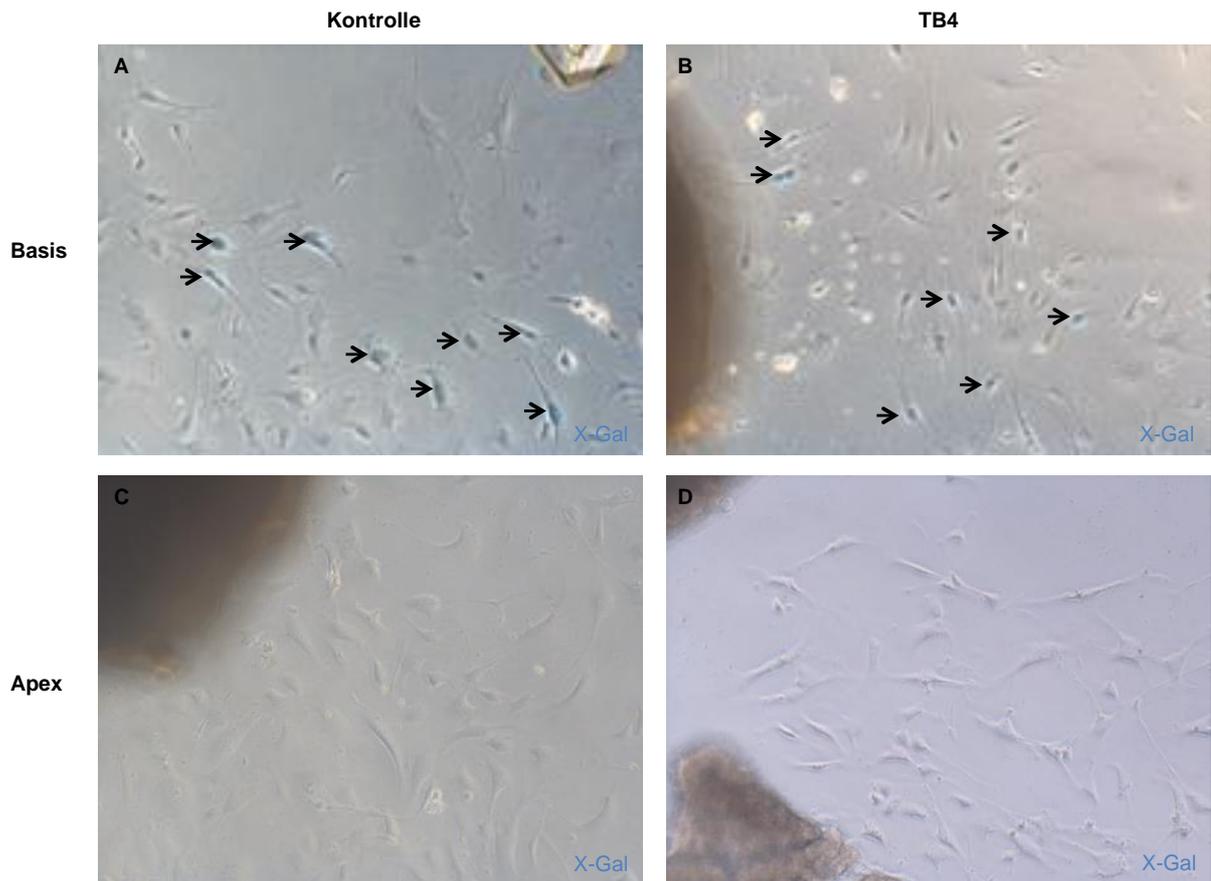


Abb. 27: X-Gal-Färbung von Explantationskulturen nach 6 Tagen. Zellkulturen aus basalem und apikalem Herzgewebe von Isl1-nLacZ-Mäusen. A und B: nLacZ-positive Zellen (Pfeile) aus der Basis nach 6 Tagen ohne (A) bzw. mit TB4 (B). C und D: keine nLacZ-positiven Zellen aus dem Apex nach 6 Tagen ohne (C) bzw. mit TB4 (D).

Nachfolgend wurden die ausgewachsenen, nLacZ-positiven Zellen weiter immunzytologisch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst immunzytologische Färbungen mit *smooth muscle actin* (SMA) vorgenommen. Bei mikroskopischer Analyse der nLacZ-positiven Zellen aus der Basis zeigte sich, dass diese ebenfalls positiv für SMA waren (Abb. 28). Nur eine einzige nLacZ-positive Zelle mit eindeutig nukleärem Signal stellte sich binukleär und negativ für SMA dar (Abb. 29).

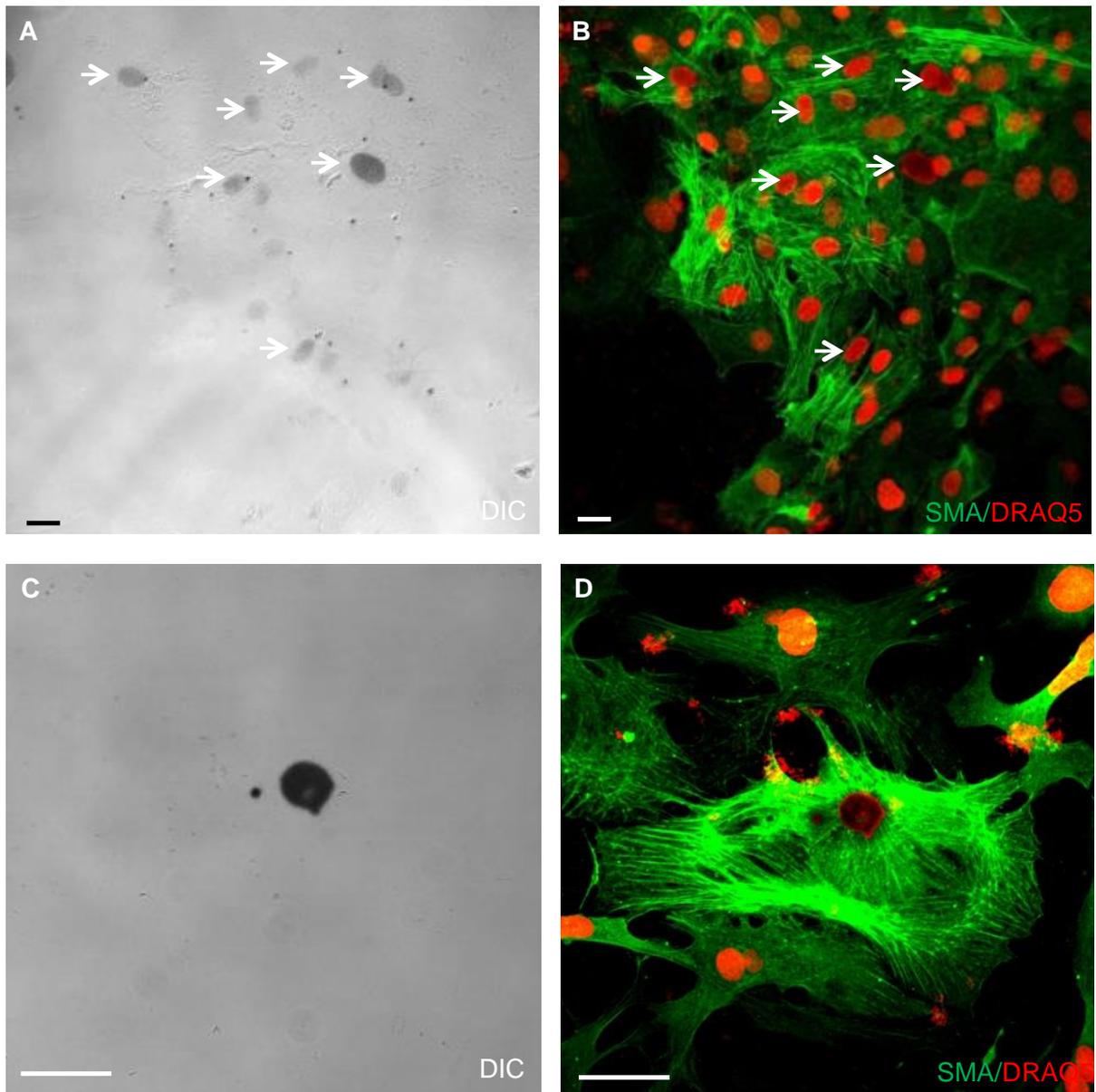


Abb. 28: Immunzytologische Charakterisierung nLacZ-positiver Zellen aus der Herzbasis nach 7 Tagen. Immunzytologiefärbung mit *smooth muscle actin* (SMA) in Zellkulturen aus basalem Herzgewebe von Isl1-nLacZ-Mäusen (ohne TB4). A: DIC-Aufnahme der nLacZ-positiven Zellen (Pfeile), B: Immunfluoreszenz der in A dargestellten Zellen (Pfeile) mit SMA-Färbung und DRAQ5. C, D: höhere Vergrößerung einer positiven Zelle in DIC (C) und mit SMA-Färbung und DRAQ5 (D). Maßstabsbalken: 20 μ m.

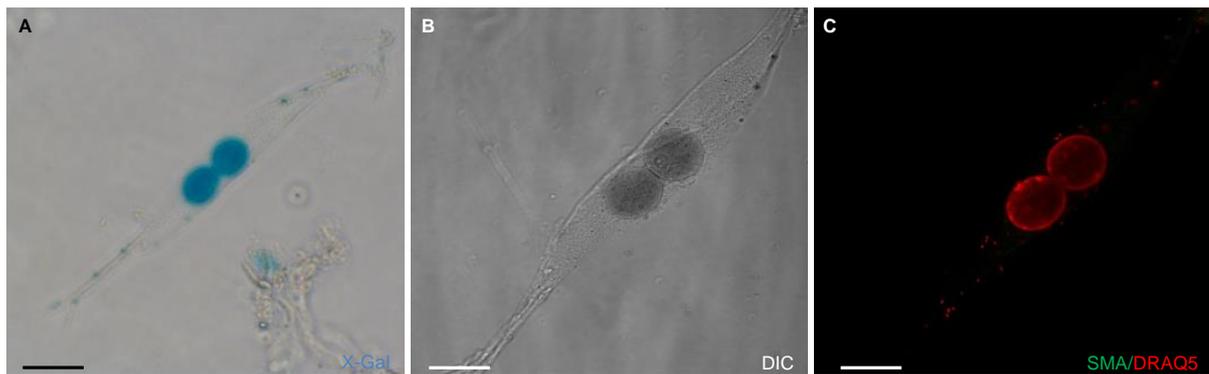


Abb. 29: nLacZ-positive Zelle aus der Basis nach 7 Tagen. Zellkultur aus basalem Herzgewebe von Islet-1-nLacZ-Mäusen (ohne TB4). A: Binukleäre nLacZ-positive Zelle mit nukleärem Signal. B: DIC-Aufnahme der Zelle, das positive Kernsignal stellt sich dunkel dar. C: Immunhistologische Charakterisierung mit *smooth muscle actin* (SMA). Maßstabsbalken: 20 µm

Zur noch genaueren Einschränkung der Herkunft möglicher nLacZ-positiver Zellen, wurden als nächstes unter mikroskopischer Sicht die Vorhöfe und der Ausflusstrakt als ein „Paket“ entfernt (im folgenden „OFT“ für *outflowtract* genannt). Anschließend wurde dann aus diesem Gewebe drei verschiedene Zellkulturen hergestellt (Abb. 30):

- 1 x OFT (nur Gewebe aus Ausflusstrakt und Vorhöfen),
- 1 x Basis (nur mit basalem ventrikulärem Herzgewebe, jedoch ohne Ausflusstrakt und Vorhöfe),
- 1 x Apex (nur mit apikalem Herzgewebe).

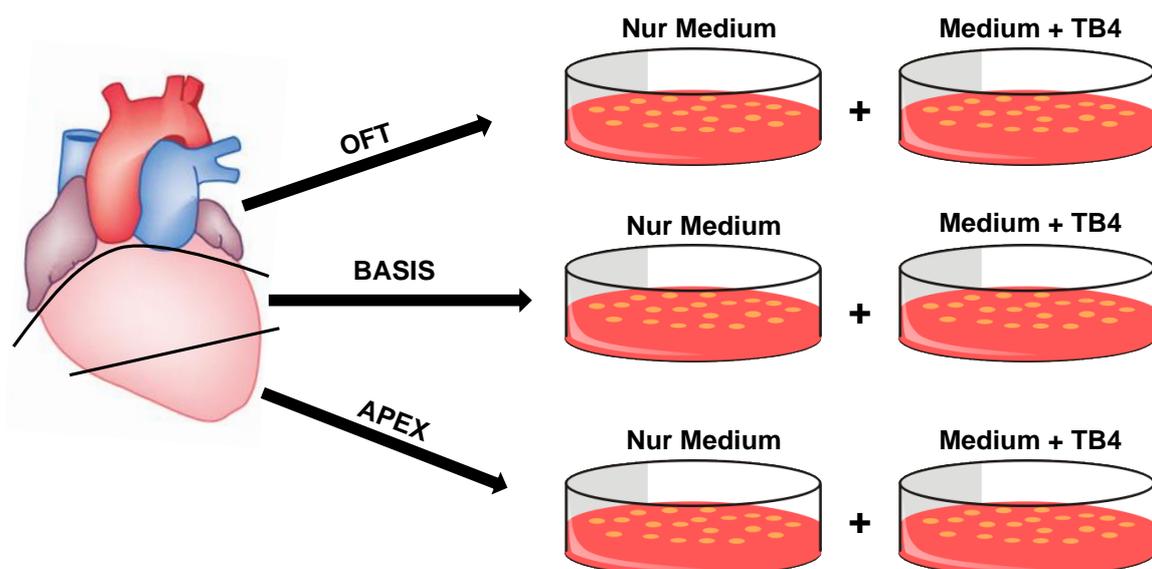


Abb. 30: : Präparation in Basis, Apex und OFT. Analog zu Abb. 25 wurde diesmal das Herz unter mikroskopischer Kontrolle in drei Bereiche getrennt: den OFT, welcher die Islet-1-positiven Zellen des adulten Herzens enthält, sowie Basis und Apex, welche keine Islet-1-

positiven Zellen enthalten. Alle drei Gewebe wurden wiederum mit TB4-freiem Medium oder mit TB4-versetztem Medium inkubiert.

Bei der Untersuchung der Zellkulturen, bei welchen die Vorhöfe und der Ausflusstrakt (OFT) entfernt und separat inkubiert worden war, zeigte sich Folgendes: es wuchsen massiv Zellen aus den OFT-Kulturen aus. Aus den apikalen bzw. basalen Anteilen wuchsen nur sehr wenige bzw. gar keine Zellen aus. X-Gal-Färbung der proliferierten Zellen zeigte viele nLacZ-positive Zellen in den OFT-Kulturen. Die Kulturen aus Apex bzw. Basis waren durchgehend nLacZ-negativ (Abb. 31). TB4 hatte keinen erkennbaren Effekt.

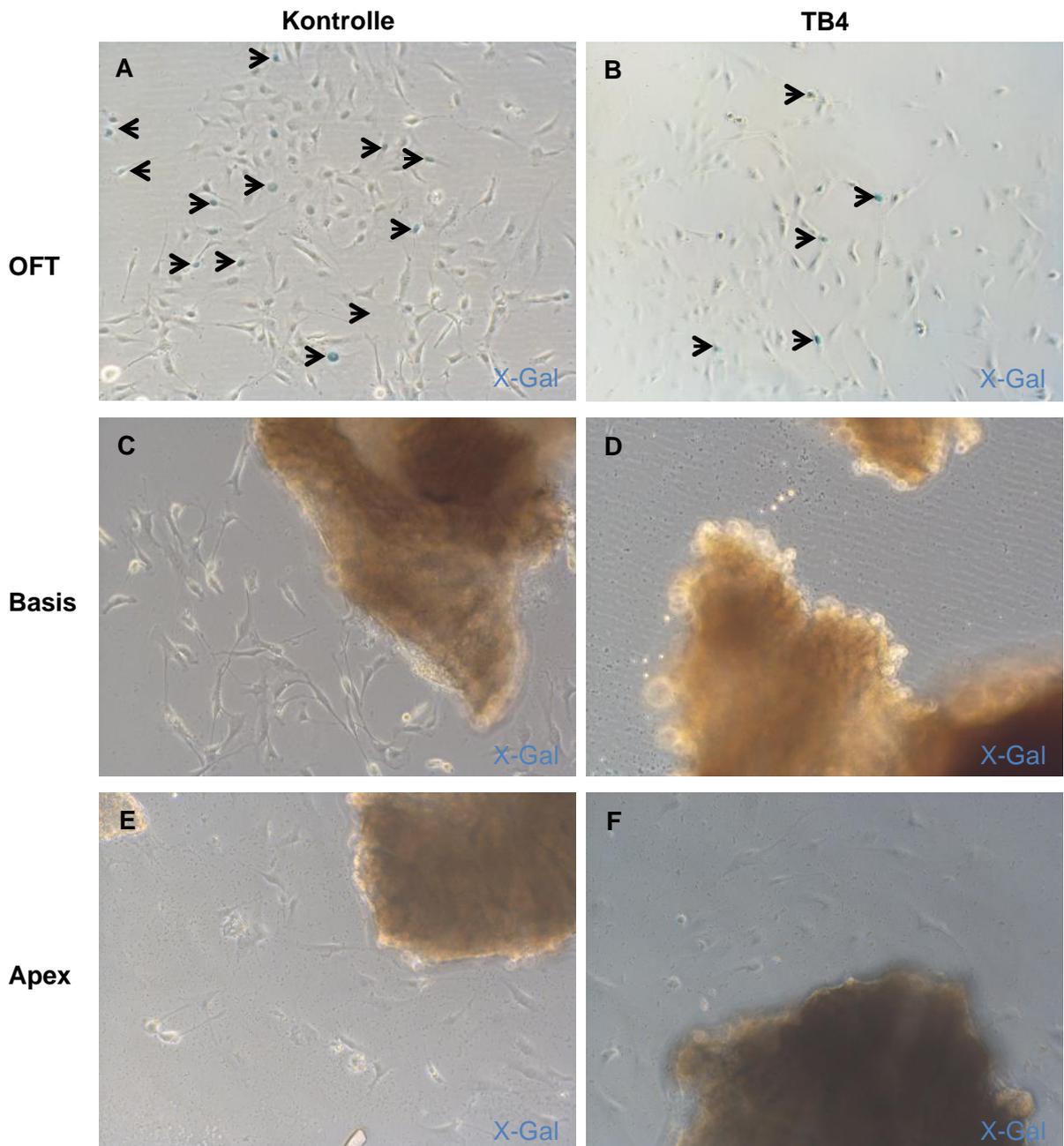


Abb. 31: : nLacZ-positive Zellen aus dem Ausflusstrakt und den Vorhöfen nach 6 Tagen. X-Gal-Färbung einer Zellkultur mit Ausflusstraktgewebe aus Isl1-nLacZ-Mäusen. A, B: nLacZ-positive Zellen aus dem Ausflusstrakt ohne (A) bzw. mit (B) TB4. Die positiven Zellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. C, D, E, F: X-Gal-Färbung von Zellkulturen aus der Basis und der Apex desselben Herzens ohne bzw. mit TB4-Einfluss.

Die nLacZ-positiven Zellen aus dem Ausflusstrakt wurden mittels Färbung gegen *Discoidin domain-containing receptor 2* (DDR2), einem Marker für kardiale Fibroblasten, weiter charakterisiert. Es zeigten sich circa 2/3 der nLacZ-positiven Zellen positiv für DDR2 (Abb. 32).

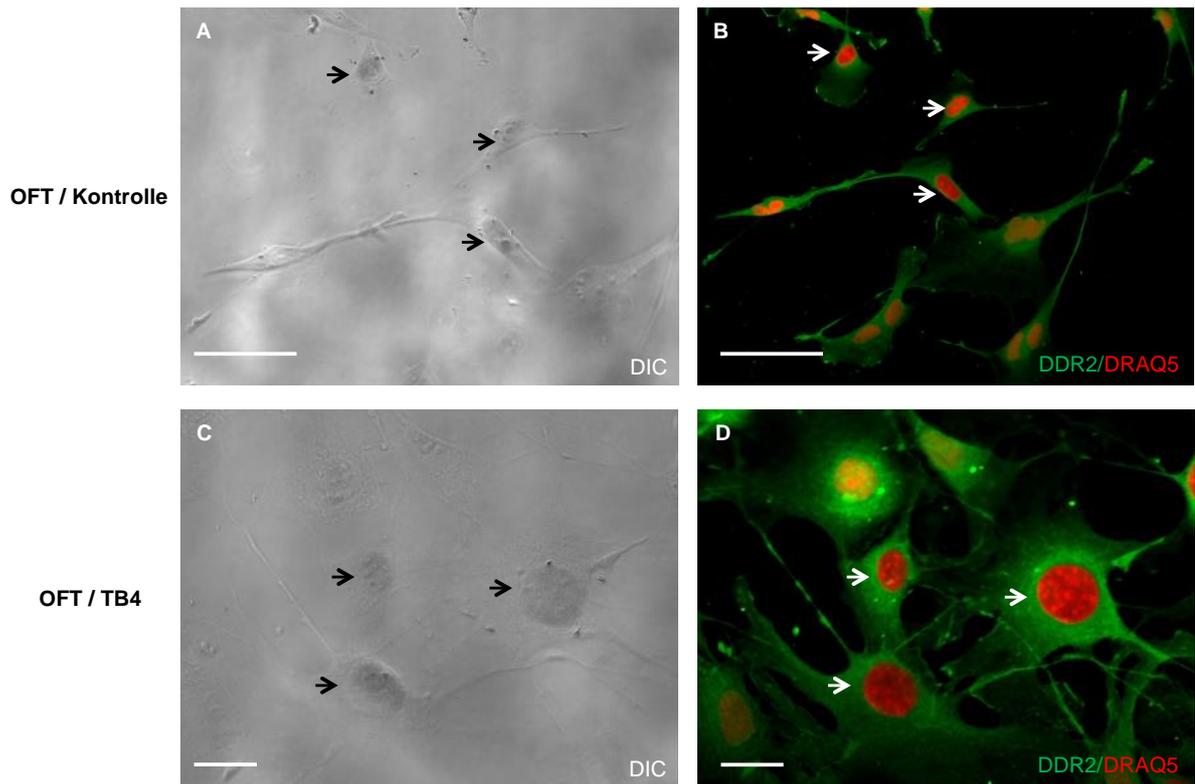


Abb. 32: Immunzytologische Charakterisierung nLacZ-positiver Zellen aus dem Ausflusstrakt und den Vorhöfen nach 7 Tagen. Zellkulturen aus basalem Herzgewebe von Isl1-nLacZ-Mäusen (ohne und mit TB4). A, C: DIC-Aufnahme von nLacZ-positiven Zellen (Pfeile) in Kontroll- bzw. TB4-behandelter Zellkultur. B, D: Färbung der Zellen mit *Discoidin receptor-domain 2* (DDR2). Maßstabsbalken: (A, B) 50 μm (C, D) 20 μm

In Tabelle 9 und 10 sind die Ergebnisse der Auswertung für die nLacZ-positiven Zellen aus den oben beschriebenen Explantationskulturen zusammengefasst.

Medium	nLacZ-positive Zellen?	Medium + TB4	nLacZ-positive Zellen?
Basis	+ (n=2)	Basis	+ (n=3)
Apex	- (n=2)	Apex	- (n=3)

Tab. 9: Tab. 2: Zusammenfassung der Auswertung der Explantationskulturen aus Apex und Basis. (+) = Zellen vorhanden, (-) = keine Zellen vorhanden, (n) = Anzahl der Herzen

TB4-freies Medium	nLacZ-positive Zellen?	TB4- versetztes Medium	nLacZ-positive Zellen?
OFT	+ (n=1)	OFT	+ (n=1)
Basis	- (n=1)	Basis	- (n=1)
Apex	- (n=1)	Apex	- (n=1)

Tab. 10: Zusammenfassung der Auswertung der Explantationskulturen aus OFT, Basis und Apex. (+) = Zellen vorhanden, (-) = keine Zellen vorhanden, (n) = Anzahl der Herzen

3.5.2 Kultivierung von Zellen über 14 Tage

Um den Einfluss von TB4 auf Zellen *in-vitro* über einen längeren Zeitraum und eine damit einhergehende Differenzierung zu Kardiomyozyten zu überprüfen, wurden die Zellkulturen über 14 Tage mit oder ohne TB4 inkubiert. Im Durchlichtmikroskop zeigte sich ein dichter „Zellrasen“ mit trabekulären Strukturen (Abb. 33).

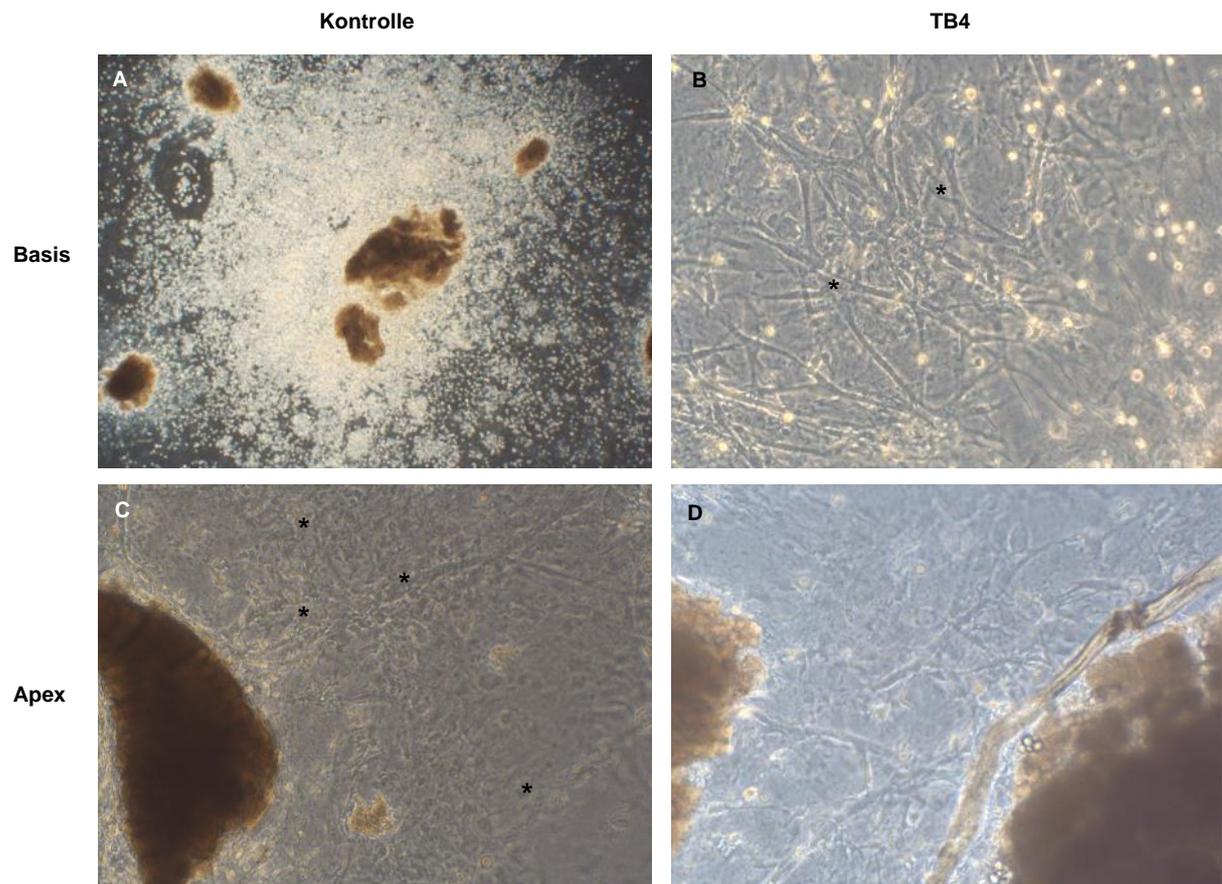


Abb. 33: Zellkultur über 14 Tage. Zellkultur aus Isl1-nLacZ-Mäusen.
A, C: Kontrollzellkultur ohne TB4 aus basalem (A) und apikalen (C) Herzgewebe.
B, D: Zellkulturen unter TB4-Einfluss aus Basis (B) und Apex (C). (*) zeigt exemplarisch trabekuläre Strukturen in B und C.

Nach Färbung mit X-Gal fanden sich sehr viele Ansammlungen von nLacZ-positiven Zellen. In den Zellkulturen aus dem Apex waren keine nLacZ-positiven Zellen zu sehen (Abb. 34). Um eine Differenzierung der Zellen in Richtung Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde eine immunzytologische Charakterisierung mittels α -Actinin versucht. Es zeigte sich, dass keine der nLacZ-positiven Zellen positiv für α -Actinin waren. Als Kontrolle dafür, dass die Färbung technisch funktioniert hatte, konnte ein

Stück Herzgewebe in der Zellkultur verwendet werden. Dieses war auch 14 Tage nach Beginn α -Actinin-positiv und zeigte eine typische Querstreifung (Abb. 35).

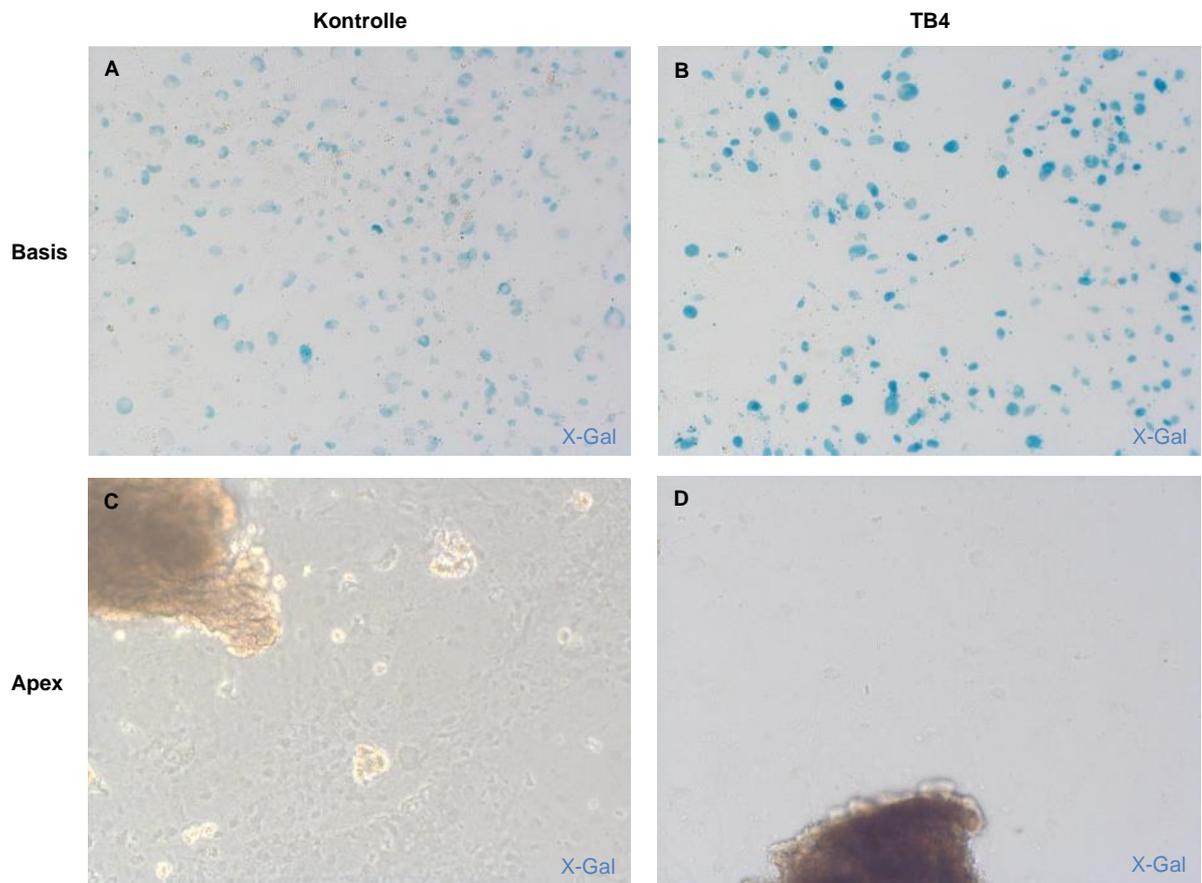


Abb. 34: nLacZ-positive Zellen nach 14 Tagen Zellkultur. X-Gal-Färbung von Zellkulturen aus Isl1nLacZ-Mäusen. A, B: nLacZ-positive Zellen aus basalem Herzgewebe der Basis ohne (A) bzw. mit (B) TB4. C,D: Keine nLacZ-positiven Zellen in Zellkulturen aus apikalem Herzgewebe.

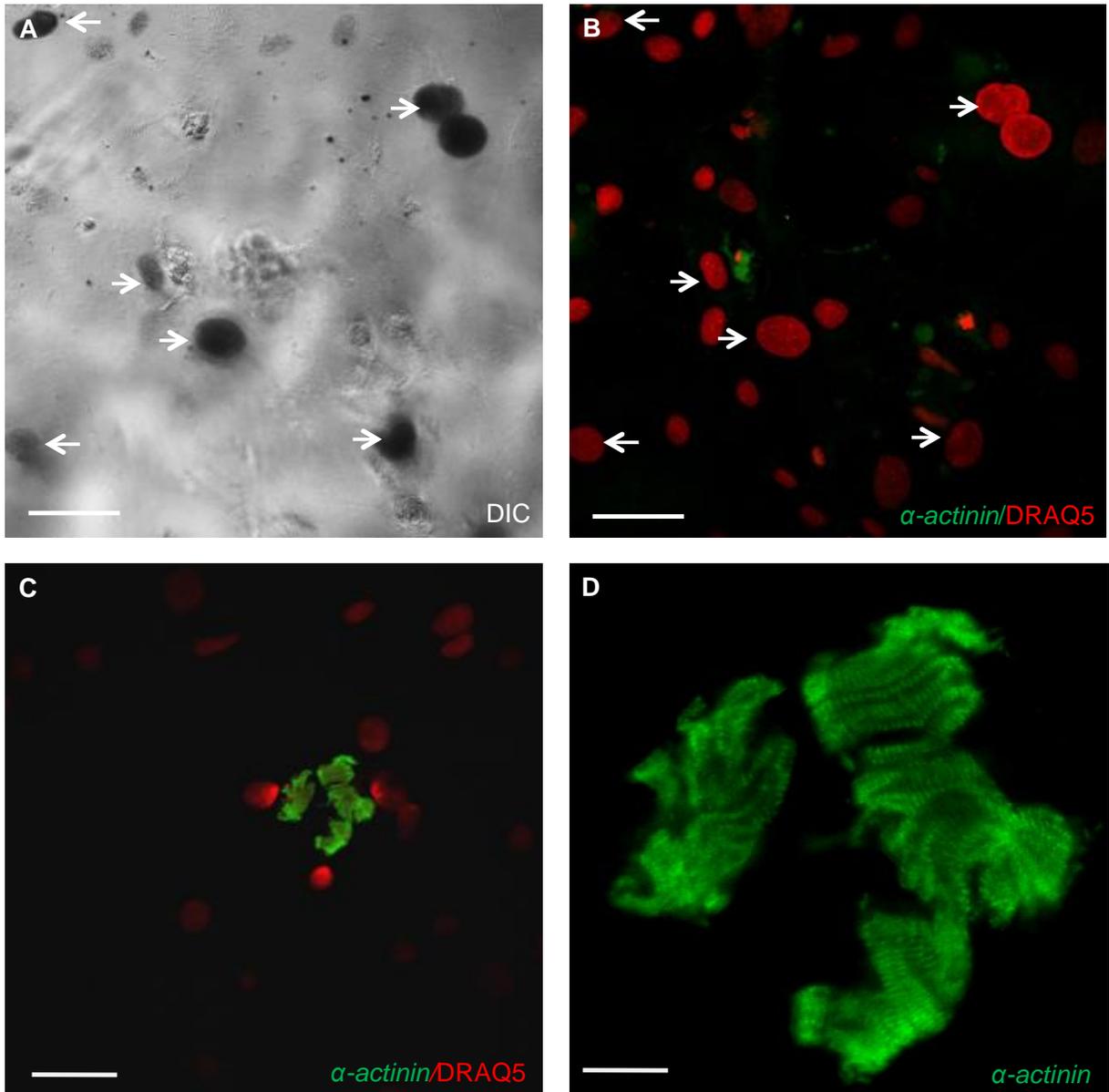


Abb. 35: Immunzytologische Charakterisierung nLacZ-positiver Zellen nach 14 Tagen Zellkultur. Immunzytologiefärbung mit α -Actinin in Zellkulturen aus basalem Herzgewebe von Isl1-nLacZ-Mäusen (ohne TB4). A: DIC-Aufnahme der nLacZ-positiven Zellen (Pfeile), B: Verifizierung des nukleären LacZ-Signals mittels DRAQ5. C, D: Inkubiertes Herzgewebe mit deutlich positivem α -Actinin-Signal und Querstreifung, welches als Positivkontrolle dient. Maßstabsbalken: (A, B, C) 20 μ m, (D) 50 μ m, (E) 150 μ m

4 Diskussion

Ziel der vorgestellten Arbeit war es, den Einfluss von Thymosin Beta-4 (TB4) auf das gesunde und infarzierte erwachsene Herz zu untersuchen. Unter Verwendung der bereits erwähnten ISL1-nLacZ-Maus erzielten wir folgende Ergebnisse:

- Die Gabe von TB4 führte zu keiner Veränderung der Anzahl Islet-1-positiver Zellen im adulten Myokard
- TB4 führte zu keiner Veränderung der Infarktgröße.
- Die Neoangiogenese im Infarktbereich wurde durch TB4 nicht beeinflusst.
- TB4 führte nicht zu einer Änderung der Islet-1 Expression in Explantationskulturen des erwachsenen Herzens

4.1 Der Nachweis von Islet-1 mittels eines transgenen Mausmodells – Vorteile und Limitationen

In unserer Arbeit gelang der Nachweis von Islet-1-positiven Zellen mittels eines transgenen Mausmodells (ISL1-nLacZ). Islet-1 ist als Transkriptionsfaktor ein nukleäres Protein, welches im Zellkern lokalisiert ist. Mithilfe des bereits erwähnten und ausführlich beschriebenen transgenen Mausmodells (ISL1-nLacZ) können Islet-1-positive Zellen sicher lokalisiert werden (Sun et al. 2007; Weinberger et al. 2012). Dabei wurde in ein Allel des Islet-1-Genlokus eine β -Galaktosidase eingefügt. Die Aktivität der β -Galaktosidase führt, nach Färbung mit dem Substrat X-Gal (Galaktose + Indol), zu einer enzymatisch katalysierten, intensiven Blaufärbung der Zellkerne. Sie erlaubt dadurch eine einfache Identifikation von positiven Zellen. Die Nutzung eines transgenen Mausmodells hat dabei verschiedene Vorteile:

- Die Färbung mittels X-Gal ist technisch einfach durchführbar und erlaubt neben der Anfärbung einzelner Gewebeschnitten auch *whole-mount*-Färbungen von ganzen Herzen. Die anatomische Zuordnung von LacZ-positiven Strukturen gelingt dadurch vergleichsweise einfach, die Gewebeschnitte können mit einem Durchlichtmikroskop untersucht werden.
- Der enzymatische Farbnachweis ist äußerst sensitiv. Die β -Galaktosidase ist hochspezifisch für die X-Gal-spezifische Galaktose, die enzymatische Aktivität ist außerdem mit bis zu 38.000 Reaktionen pro Minute sehr hoch (Juers et al. 2012).

- Nach aktuellem Stand gibt es im Herzen keine endogene *nukleäre* β -Galaktosidase, welche zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte (LacZ-positive Zellen ohne Islet-1-Expression; Shaperf et al. 1994). Verschiedene Zellen (z.B. Makrophagen) können aber ein *zytosolisches* LacZ-Signal zeigen und dadurch die Interpretation der Befunde erschweren (Kiernan, 2007; siehe auch S. 76).

Vor allem die häufig genutzte Immunhistologie hat entscheidende Nachteile gegenüber einem transgenen Mausmodell:

- Für die Immunhistologie müssen einzelne Schnitte aufwendig gefärbt werden. Das entsprechende Fluoreszenzsignal ist nur bei hoher Vergrößerung zu erkennen, worunter wiederum die Übersicht leidet.
- Die antikörper-gekoppelten Fluoreszenzstoffe verursachen phototoxischen Schaden in der Zelle (*phototoxicity*), Exposition der gefärbten Schnitte gegenüber Sonnenlicht führt außerdem zum einen Verlust an Signalstärke (*photobleaching*; Robinson et al. 2013)
- Der primäre und der sekundäre Antikörper müssen die Zellmembran und den Zellkern überwinden, um an das nukleär-lokalisierte Protein zu binden. Dafür genutzte Detergenzien wie beispielsweise Triton-X können wiederum zu Konformationsänderungen an Proteinen führen und dadurch die Genauigkeit der Immunhistologie abschwächen (Oliver and Jamur 2010). Insbesondere die Detektion von nukleär-lokaliserten Proteinen wie Islet-1 ist mit einem transgenen Mausmodell deswegen sensitiver möglich als mit der Immunhistologie.

Mit der Nutzung eines transgenen Mausmodells sind jedoch auch Limitationen verbunden:

- Das Einbringen der β -Galaktosidase führt zum Verlust eines Islet-1-Allels (heterozygoter Knock-out) Dies kann theoretisch zu Störungen der Islet-1-Expression führen (Davis et al. 2012). Sun et al. (2007) konnten allerdings keinen Phänotyp im heterozygoten Knock-out erkennen, auch wir haben bei den erwachsenen Tieren keinen offensichtlichen Phänotyp feststellen können.
- Der histologische Nachweis von einzelnen Zellen ist technisch grundsätzlich aufwendig, da die Gewebeschnitte des gesamten Herzens auf einzelne positive

Strukturen untersucht werden müssen. Aufgrund der geringen Zellzahl ist die weitere immunhistologische Charakterisierung schwierig; häufig sind die positiven Zellen nur auf einem einzelnen, bereits fixierten, eingedeckelten und möglicherweise gefärbten Schnitt lokalisiert. Das Entdeckeln der Schnitte führt häufig zum Abreißen von Gewebe und damit zum Verlust der Zellen. Außerdem kann die Formalin-Fixierung zu Konformationsänderungen der Zellproteine führen, was wiederum die Bindungsfähigkeit der Antikörper verändert (Ara 2005).

- Das von uns genutzte Mausmodell erlaubt keine dauerhafte Verfolgung von Islet-1-positiven Zellen (*fate-mapping*). Ursprünglich Islet-1-positive Zellen, die im Laufe ihrer Entwicklung kein Islet-1 (und damit auch keine β -Galaktosidase) mehr exprimieren, werden durch unser Modell nicht erfasst.

4.2 Wirkung von TB4 auf gesundes Myokard

Die intraperitoneale Gabe von TB4 über 7 Tage hatte bei transgenen ISL1-nLacZ-Mäusen und bei Wildtyp-Tieren keinen erkennbaren Effekt. Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Bei den transgenen Tieren beobachteten wir keine Veränderung der Anzahl bzw. der Lokalisation der Islet-1-positiven Zellen. In einer früheren Arbeit fanden wir ebenfalls keinen Hinweis auf eine Proliferation von Islet-1-positiven Zellen in gesunden Herzen (Weinberger et al. 2015). Wir beobachteten keine offensichtliche Toxizität. Alle Tiere überlebten den 7-tägigen Behandlungszeitraum. Soweit es uns bekannt ist, gibt es auch in der Literatur derzeit keine Hinweise auf eine akute Toxizität von TB4. Unsere Ergebnisse sind damit im Einklang mit veröffentlichten Arbeiten, in denen keine Toxizität bei der intraperitonealen Gabe von TB4 berichtet wurde (Bock-Marquette et al. 2004; Bock-Marquette et al. 2009; Smart et al. 2011; Zhou et al. 2012a; Hinkel et al. 2015). Umgekehrt können wir bei dem vergleichsweise kurzen Zeitraum von nur 7 Tagen keine Aussage über eventuelle Langzeitkomplikationen z.B. neoplastischer Art. treffen. TB4 hat möglicherweise Effekte auf Zellproliferation und –differenzierung – es wäre also vorstellbar, dass TB4 durch diese Wirkung bei längerer Applikation auch onkogenes Potential hat. Dazu passend scheint TB4 bei der Genese von Tumoren eine Rolle zu spielen (Goldstein 2003; Can et al. 2012).

4.3 Wirkung von TB4 auf infarziertes Myokard

TB4 wurde den transgenen Mäusen vor und nach der Myokardinfarzierung verabreicht. Wir injizierten TB4 intraperitoneal 7 Tage vor LAD-Ligatur und 2, 7 und 14 Tage nach Infarzierung. Transgene Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge NaCl. Zielparameter war die Anzahl und Verteilung Islet-1-positiver Zellen. Zudem wurden die Infarktgröße und die Vaskularisierung im Infarktgebiet untersucht.

4.3.1 Infarktgröße

Wir beobachteten keinen Unterschied in der Infarktgröße zwischen Tieren, welche TB4 bzw. NaCl als Kontrolle nach Infarzierung erhalten hatten. Die Bestimmung der Infarktgröße geschah bei uns ausschließlich histologisch. Die von uns verwendete Methode der histologischen Infarktquantifizierung ist in der Literatur gut beschrieben und wird als Goldstandard in der Beurteilung der Infarktgröße angesehen (Fishbein et al. 1978; Michael et al. 1995). Takagawa et al. (2011) konnten zeigen, dass die Auswertung von Gewebsschnitten eine Bestimmung der Infarktgröße zulässt und diese auch mit echokardiographisch-gemessenen funktionellen Parametern korreliert. Einschränkend muss gesagt werden, dass eine gewisse Varianz hinsichtlich der Infarktgröße bestand. Die unterschiedlichen Resultate hinsichtlich der Infarktgröße sind nicht einfach zu erklären. Grundsätzlich muss man feststellen, dass eine LAD-Ligatur bei Mäusen auch bei erfahrenen Chirurgen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Die Operationen für diese Studie wurden von Frau Dr. Mandy Stubbendorf und Herrn Dr. Moritz Becher durchgeführt. Beide Operateure sind sehr erfahren mit dieser Technik. Trotzdem schwankte die Infarktgröße innerhalb der einzelnen Gruppen deutlich. Hierfür gibt es möglicherweise zwei Gründe, die auch die Limitationen der LAD-Ligatur als Infarktmodell zeigen: zunächst ist der Ort der LAD-Ligatur absolut entscheidend für das Ausmaß der Infarzierung. So konnte Degabriele et al. (2004) zeigen, dass nur eine Ligatur circa 0,3 mm distal des atrioventrikulären Übergangs (*atrioventricular junction*) zu einer signifikanten Reduktion der kardialen Funktion und zu deutlichen histologischen Veränderungen in der Histologie führt. Angesichts der Organgröße der Maus ist es nachvollziehbar, dass eine Ligatur exakt an dieser Stelle technisch sehr anspruchsvoll ist und zu einer großen Variabilität der Infarkte führen kann. Zusätzlich ist die Anatomie der Koronararterien bei Mäusen variabel und unterscheidet sich von der des Menschen. So führt eine eigenständige Septalarterie (beim Menschen ein Ast des Ramus

interventricularis anterior) zu einer Aussparung des Septums bei Infarzierung durch LAD-Ligatur (Kumar et al. 2005).

Smart et al. (2011) beschreiben in ihrer Arbeit eine signifikante Reduktion der Infarktgröße unter der TB4-Behandlung. 14 Tage nach Infarkt war die Infarktgröße in den TB4-behandelten Tieren 18% und bei den Kontrolltieren 27% (gemessen als prozentualer Anteil der linksventrikulären Masse in der MRT). Diese dramatischen Unterschiede in der Infarktgröße zeigten sich in unserer Arbeit nicht und wären auch bei der reinen histologischen Auswertung aufgefallen. Auch in anderen Arbeiten (Bock-Marquette et al. 2004; Hinkel et al. 2008; Peng et al. 2014) konnte TB4 die Infarktgröße deutlich reduzieren. In allen Arbeiten wurde außerdem ein Verbesserung der kardialen Funktion beschrieben, beispielsweise des *fractional shortening* als Parameter für die linksventrikuläre Funktion. Allerdings muss hier festgestellt werden, dass die Bestimmung der Infarktgröße vor allem echokardiographisch erfolgte. Eine anerkannte Limitation der Sonographie im allgemeinen ist die starke Abhängigkeit von den Fähigkeiten des Untersuchers und des verwendeten Gerätes. Häufig müssen die Tiere für die Untersuchung anästhesiert werden, was einen Einfluss auf die hämodynamischen Parameter haben kann. Hinzu kommen die schnelle Herzfrequenz von Mäusen (bis 600 Schläge/min) und die relativ kleine Herzgröße, die eine sensitive echokardiographische Messung weiter erschweren (Ram et al. 2011). Letztlich bleibt es unklar, weshalb TB4 in anderen Arbeiten solche dramatischen Effekte auf die Infarktgröße hatte.

4.3.2 Islet-1-positive Zellen

Wir untersuchten ungefähr 16.000 Gewebsschnitte von TB4-behandelten, infarzierten Herzen auf nLacZ-positive Zellen. Diese Zellen fanden sich in allen transgenen Tieren in den 3 bekannten Regionen des Herzens: dem Sinusknoten, den parasympathischen Ganglien und dem ventrikuläre Ausflusstrakt (Weinberger et al. 2012).

In den 16.000 untersuchten Schnitten fanden wir 18 Zellen außerhalb dieser drei bekannten Regionen, die ein fragliches nukleäres LacZ-Signal aufwiesen. Da wir ausschließlich vereinzelte Zellen fanden, war eine Einschätzung, ob es sich wirklich um ein nukleäres Signal handelte, schwierig. Deshalb färbten wir diese Schnitte zusätzlich mit dem Kernfarbstoff DRAQ5. Eine klare Ko-Lokalisation von DRAQ5 und LacZ spricht für ein eindeutig nukleäres LacZ-Signal und somit für eine Islet-1-positive-Zelle (DRAQ5

+ LacZ = nLacZ = Islet-1). Grundsätzlich besteht natürlich die Möglichkeit, dass ein LacZ-positiver Zellkern zu einer verminderten Bindung von DRAQ5 führt. Dies wiederum könnte die Bestimmung eines eindeutig nukleären LacZ-Signals erschweren und dadurch zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Dagegen spricht, dass im Sinusknoten und in den kardialen Ganglien stets eine Ko-Lokalisation von DRAQ5 und LacZ vorlag.

Es bestand kein offensichtlicher Zusammenhang zwischen der Zeit nach LAD-Ligatur (2, 7, 14 Tage) und der Anzahl der fraglich positiven Zellen. Von den 18 fraglichen Zellen fanden sich 14 in TB4- und 4 in NaCl-behandelten Tieren. Zum Teil waren die Zellen nur auf einzelnen Objektträgern lokalisiert. Hier gestaltete sich die weitere Charakterisierung schwierig. Immunhistologische Färbungen auf bereits fixierten, gefärbten und eingedeckelten Objektträgern sind, wie bereits anfangs erwähnt, technisch anspruchsvoll und führen daher häufig nicht zu einem eindeutigen Nachweis. Von den ursprünglich 18 fraglich-positiven Zellen waren 6 epikardial im Myokard der Vorderwand lokalisiert. Zunächst wirkte es, als ob diese Zellen tief im Infarktareal liegen würden. Bei genauerer Analyse stellte sich aber heraus, dass es sich um schon von Weinberger et. al. beschriebene nLacZ-positive Kardiomyozyten des ventrikulären Ausflusstraktes handelte, die Zellen waren nach einer immunhistologischen Färbung positiv für α -Actinin. Durch ein unbeabsichtigtes Abkippen einiger Herzen während des Einbettens wurden diese nicht exakt in der kurzen Achse geschnitten. Die gefundenen Zellen waren dementsprechend tief zu finden und wurden so irrtümlich als apex- und infarktnah bewertet (Abb. 36).

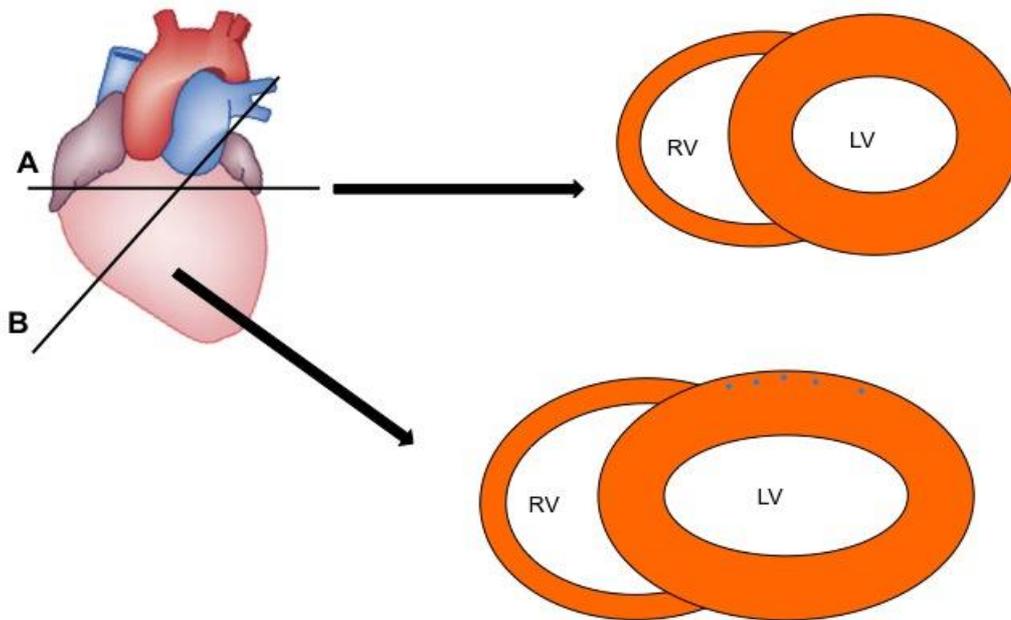


Abb. 36: Schnittachsen und deren entsprechende Darstellung im histologischen Schnitt. Abhängig von der Achse, in die das Herz eingebettet ist, kommt es zu unterschiedlichen histologischen Schnittbildern. A: Reguläre Einbettungsachse, das entsprechende Schnittbild ist rechts dargestellt. B: Irreguläre, gekippte Schnittachse. Rechts das resultierende Schnittbild mit nLacZ-positiven Kardiomyozyten (Blau) aus dem proximalen Ausflusstrakt. (RV: rechter Ventrikel, LV: linker Ventrikel).

Eine sichere Ko-Lokalisation von LacZ und DRAQ5, und damit ein sicher nukleäres LacZ-Signal konnten wir nur in 3 Zellen feststellen (Zelle #1, Zelle # 2 und Zelle # 3). Durch die sorgfältige Unterscheidung zwischen nukleärem und nicht-nukleärem (zytosolisch lokalisierten) LacZ-Signal stellte sich also ein Großteil der ursprünglich gefundenen Zellen als falsch-positiv heraus. Keine der 3 Zellen fand sich in unmittelbarer Nähe der Infarktregion, sondern in Gewebsadhäsionen, die sich durch die LAD-Ligatur perikardial gebildet hatten. Nur eine Zelle (Zelle # 3) fand sich in einem TB4-behandelten Tier, Zelle # 1 und Zelle # 2 wurden in Kontrolltieren gefunden.

Als nächstes versuchten wir, die drei gefundenen Zellen immunhistologisch zu charakterisieren. Dies gestaltete sich aufgrund der bereits erwähnten Schwierigkeiten (technisch aufwendig, fehleranfällig, nur sehr geringe Anzahl an positiven Zellen) als kompliziert.

Moretti et al. (2006) konnten zeigen, dass Islet-1-positive Zellen im Laufe der embryonalen Differenzierung über Hochregulation von Nkx2.5 und flk1 zu einer Population von Islet-1⁺/Nkx2.5⁺-Zellen führen. Diese können sich letztlich zu Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen entwickeln. Eine Islet-1⁺/Nkx2.5⁺-Zelle in einem adulten infarzierten Herzen könnte also Hinweis für eine Reexpression von Islet-1 mit kardiomyozytärem Differenzierungspotential sein. Immunhistologisch zeigte die Zelle # 1 (NaCl-behandelt, 7 Tage nach Infarkt) keine Expression von Nkx2.5. Zu diesem Zeitpunkt (7 Tage nach Infarkt) fanden sich bei Smart et al. (2011) eine signifikant erhöhte Expression von Islet-1 und Nkx2.5 verglichen mit Kontrolltieren (*sham-operated*) und bereits zwei Tage nach Infarzierung zeigten sich WT1/Nkx2.5-positive Zellen im Epikardium. Erwähnenswert ist, dass der in der Arbeit gezeigte signifikante Unterschied in der Expression von Nkx2.5 nur zwischen infarzierten und nicht-infarzierten Kontrolltieren (*sham-operated*) vorhanden war. Einen Unterschied zwischen TB4-Behandlung und einer entsprechenden Kontrollgruppe wird nicht erwähnt. Möglicherweise beruhte dieser Unterschied bezüglich der Nkx2.5-Expression also nicht auf der TB4-Gabe, sondern auf einem unspezifischen Stimulus durch die Infarzierung.

Zelle # 2 (NaCl-behandelt, 7 Tage nach Infarkt) überprüften wir auf eine Expression von Wilms-Tumor 1 (WT1). Cai et al. (2008) und Zhou et al. (2008) konnten beide einen Beitrag epikardialer Vorläuferzellen zur Entwicklung des Myokardiums in der Embryonalphase zeigen. Zhou et al. nutzen dabei Wilms-Tumor 1 (WT1) als Marker für epikardiale Vorläuferzellen. Smart et al. wiederum fanden 7 Tage nach Infarkt WT1/Islet-1-positive Zellen im Epikardium TB4-behandelter Tiere. Die Zelle # 2 zeigte ein dezentes immunhistologisches Signal für WT1, die Ko-Lokalisation mit DRAQ5 spricht dabei für eine nukleäre Lokalisierung von WT1.

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der Zellen # 1 und #2 verglichen mit den Zellen von Smart et al. ist die genaue Bestimmung der Lokalisation. Da mittels konfokaler Lasermikroskopie immer nur ein kleiner Ausschnitt dargestellt werden kann, ist eine genaue Lokalisation der Zellen nicht möglich. Zudem besteht bei der Immunhistologie die Möglichkeit einer unspezifischen, falsch-positiven Anfärbung der Zellen.

Zelle # 3 (TB4, 14 Tage nach Infarkt) überprüften wir auf eine Expression von α -Actinin als Marker für reife Kardiomyozyten. Zu diesem Zeitpunkt (14 Tage nach Infarkt) fanden

sich sich bei Smart et al. nach TB4-Behandlung quergestreifte Kardiomyozyten, welche positiv für kardiales Troponin T waren (cTnT). Die Zelle # 3 zeigte keine Expression von α -Actinin und zeigte auch keine morphologische Ähnlichkeit mit einer Kardiomyozyte (längliche Form, sarkomerische Querstreifung).

Unabhängig von den 18 fraglich-positiven Zellen fanden wir weitere Zellen mit einem unspezifischen LacZ-Signal in infarktbedingten, epikardialen Verwachsungen (Abb. 17, E-H). Die Zellen waren morphologisch vergleichsweise groß und kugelig-rund. Das LacZ-Signal füllte die gesamte Zelle aus, war teilweise granuliert und eindeutig nicht-nukleär lokalisiert. In der Literatur gibt es Hinweise, dass Makrophagen eine β -Galaktosidase besitzen (Kiernan, 2007). Diese Galaktosidase könnte also nach einer X-Gal-Färbung zu einem zytosolischen LacZ-Signal in den Zellen führen. Auch morphologisch ähnelten die von uns gefundenen Zellen Makrophagen (groß, rundkugelig, granuliertes Zytoplasma). Da Makrophagen ubiquitär vorkommen und als inflammatorische Antwort in beispielsweise infarziertes Gewebe einwandern, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den von uns gefundenen Zellen in Abbildung 17 um Makrophagen mit einem unspezifischen LacZ-Signal handelt.

Zusätzlich fanden wir in einigen Herzen LacZ-positive Areale. Diese Areale waren eindeutig nicht zellulär begrenzt. Es ließ sich nicht sicher klären, was die Ursache für diese unspezifischen Färbungsreaktionen waren. Allerdings zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Farbtintensität und Inkubationszeit der X-Gal-Färbung: je länger die Färbung bei 37°C inkubierte, desto ausgeprägter waren die extrazelluläre Farbreaktionen. Da die β -Galaktosidase bei höheren Temperaturen eine stärkere Aktivität aufweist (Bolton 2008), könnte dies auf unspezifische Galaktosidaseaktivität, z.B. aus Makrophagen, zurückzuführen sein.

Ein weiterer Mechanismus für eine unspezifische X-Gal-Färbung könnte in der operativen Infarzierung liegen: die LAD-Ligatur und die darauf folgende Hypoxie führen zu einer Beeinträchtigung der Zellfunktion und kann letztlich im programmierten Zelltod (Apoptose) enden (Reeve et al. 2007). Eine gestörte Zell-Homöostase könnte also möglicherweise auch zu einer unspezifischen Expression von Islet-1 führen. So konnten Wright et al. (1998) zeigen, dass der Infarzierungsreiz alleine bereits zu einer LacZ-Expression im Myokard führte.

Zuletzt ist zu erwähnen, dass Bakterien wie *Escherichia coli* (*E. coli*) natürlicherweise eine β -Galaktosidase besitzen (Huber et al. 1980). Bei bakterieller Kontamination des Herzgewebes könnte auch das ein Grund für unspezifische LacZ-Signale sein. Allerdings gelang uns durch die Anfärbung mit DRAQ5 stets eine sichere Diskrimination zwischen nukleärem LacZ-Signal (nLacZ, Islet-1-spezifisch) und unspezifischem zytosolischem LacZ-Signal. Die von uns gefundenen positiven Zellen könnten ein Hinweis darauf sein, dass es nach einer Myokardinfarzierung zu einer Reexpression von Islet-1 kommt. Angesichts der geringen Zahl (3 Zellen in 27.000 Gewebeschnitten) ist dieser Effekt aber sicherlich nicht funktionell bzw. biologisch relevant. Diese Expression beobachteten wir auch in unseren Kontrolltieren (Zelle # 1 und 2), einen Einfluss von TB4 zeigte sich also nicht (1 Zelle in 16.000 Gebeschnitten).

4.3.3 Neoangiogenese

Hinsichtlich eines fraglichen Effekts von TB4 auf die Neubildung von Blutgefäßen (Neoangiogenese) untersuchten wir den Infarktbereich von transgenen Mäusen 7 Tage nach Myokardinfarkt. Dazu benutzen wir den immunhistologischen Marker CD31 (PECAM-1). CD31 ist auf Endothelzellen zu finden, welche die innere Auskleidung von Blutgefäßen bilden. In der Literatur wird CD31 weit verbreitet genutzt, um Kapillaren nachzuweisen und damit Neoangiogenese zu untersuchen (Sangüeza and Requena 2003). In der Literatur ist ein Effekt von TB4 auf die Vaskularisierung mehrfach beschrieben (Bock-Marquette et al. 2009; Zhou et al. 2012; Chen et al. 2013). Da es derzeit kein standardisiertes Messverfahren gibt, um die Bioverfügbarkeit von TB4 zu überprüfen, diente uns die CD31-Expression damit zusätzlich als biologisches Assay (unabhängig von einer fraglichen Wirkung auf Islet-1), um die Wirksamkeit von TB4 zu kontrollieren. Wir fanden nach 7 Tagen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Dichte an CD31-positiven Zellen in der Infarktregion zwischen TB4-behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Zusätzlich untersuchten wir den nicht-infarzierten Bereich (*remote area*). In beiden Gruppen zeigte sich eine geringere Dichte an CD31-positiven Zellen im Infarktbereich, verglichen mit der *remote area*. Diese Resultate sind nachvollziehbar, denn eine andauernde Ischämie verursacht hypoxischen Zellschaden und damit auch das Absterben von Blutgefäßen. Somit ist im Infarktbereich eine geringere Dichte an Blutgefäßen zu erwarten, verglichen mit nicht-ischämischem Muskelgewebe.

Überraschenderweise hatte TB4 bei uns keinen Einfluss auf die Vaskularisierung nach Infarzierung. Allerdings fanden auch Bao et al. (2013) keinen Effekt von TB4 auf die Vaskularisierung von infarziertem Rattenmyokard. In einer weiteren Arbeit (Peng et al. 2014) wurde ein offensichtlicher Unterschied in der Kapillardichte von infarzierten Herzen zwischen TB4- und Kontrollmäusen berichtet. Bei genauer Betrachtung der präsentierten immunhistochemischen Bilder ist für uns der berichtete signifikante Unterschied aber nicht nachvollziehbar. Der proangiogene Mechanismus von TB4 scheint also, obwohl er mehrfach in der Literatur beschrieben ist, fraglich zu sein. Wir konnten diesen Effekt in unserer Arbeit nicht nachvollziehen.

4.4 Einfluss von TB4 auf Zellen in-vitro

Abschließend untersuchten wir den Einfluss von TB4 auf Islet-1-positive Zellen in-vitro. Die genaue Anfertigung dieser Zellkulturen wurde bereits ausführlich beschrieben. Durch ein konsequentes Aufteilen des Herzgewebes, welches wir in unterschiedlichen Petrischalen kultivierten, gelang es uns, die Herkunft der nLacZ-positiven Zellen aufzuklären. nLacZ-positive Zellen waren ausschließlich in Zellkulturen aus dem ventrikulären Ausflusstrakt zu finden. Zellkulturen aus apikalen Teilen des ventrikulären Myokards, aber auch Zellkulturen aus den basalen Anteilen (ohne den ventrikulären Ausflusstrakt) enthielten keine nLacZ positiven Zellen. Morphologisch ähnelten die gefundenen nLacZ-positiven Zellen am ehesten Fibroblasten bzw. glatten Muskelzellen. Fast alle nLacZ-positiven Zellen waren auch positiv für SMA.

SMA ist Bestandteil des Zytoskeletts und wird vor allem zur Identifizierung von Myofibroblasten benutzt. Diese liegen hinsichtlich ihrer Entwicklung zwischen Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Nagamoto et al. 2000). Allerdings wird SMA auch von glatten Muskelzellen exprimiert, sodass eine sichere Charakterisierung damit nicht möglich ist. Zur Identifizierung kardialer Fibroblasten existiert kein eindeutiger Marker (Souders et al. 2009). Möglicherweise eignet sich jedoch der *Discoidin domain-containing receptor 2* (DDR2) als spezifischer Marker für kardiale Fibroblasten (Camelliti et al. 2005). DDR2 ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche Kollagen als Ligand bindet. Damit ist DDR2 spezifischer als SMA für die Charakterisierung kardialer Fibroblasten. Immunzytologisch zeigten sich nLacZ-positive Zellen aus dem Ausflusstrakt positiv für DDR2. Nach 14 Tagen in Kultur zeigten nLacZ-positive Zellen keine Expression von α -Actinin, was gegen eine Differenzierung zu Kardiomyozyten spricht.

Bezüglich unserer Befunde in-vitro bewerten wir die nLacZ-positiven Zellen in den Zellkulturen als Islet-1-positive Zellen des Ausflusstraktes, möglicherweise kardiale Fibroblasten. Diese migrieren nach einer gewissen Zeit in Kultur (2 Tage) aus dem Gewebe heraus. Dieser Prozess findet TB4-unabhängig statt. Die Expression eines Kardiomyozyten-spezifischen Markers (α -Actinin) konnten wir nach 14 Tagen nicht erkennen. Wir fanden eine Islet-1-positive, aber SMA-negative Zelle. Hier fiel vor allem die spezielle Morphologie (spindelförmig) auf, die sich von den anderen Islet-1-positiven Zellen in der Zellkultur unterschied (flächig, z.T. mit Ausläufern). Eine weitere immunhistologische Charakterisierung dieser einzelnen Zelle gelang nicht. Möglicherweise handelt es sich um eine Islet-1-positive Zelle des Sinusknotens.

Verschiedene Arbeiten haben sich mit einem Effekt von TB4 auf Zellen in-vitro befasst. Aufgrund der Nutzung von adultem Herzgewebe und dem von uns genutzten Protokoll zur Herstellung der Zellkulturen sind nur zwei Arbeiten mit unseren Ergebnissen direkt vergleichbar (Smart et al. 2007; Smart et al. 2011). In beiden Arbeiten fanden sich jeweils unter TB4-Einfluss (Zellkulturmedium versetzt mit TB4) zunächst ein massiver Auswuchs von Zellen und eine verstärkte Expression von Islet-1. Im Verlauf zeigten sich dann immunhistologische Merkmale von differenzierten Zellen (z.B. Expression von cTNT als Zeichen für reife Kardiomyozyten nach 14 Tagen in Kultur). Auch hier diskutierten die Autoren nicht, ob die erhöhte Islet-Expression abhängig von TB4 war oder auch in Kontrollzellen (ohne TB4) beobachtet wurde. Eine neuere Arbeit (Brønnum et al. 2013) fand eine starke, TB4-unabhängige Expression von Islet-1 in Kulturen adulter epikardialer Zellen. Auch wenn diese Arbeit methodisch anders konzipiert war (komplexeres Protokoll für die Zellkultur, Nutzung von Rattenzellen), so legt sie doch nahe, dass Islet-1 möglicherweise unabhängig von TB4 in bestimmten adulten kardialen Zellen exprimiert wird. Nach unseren Befunden gibt es zwar keinen Hinweis auf eine epikardiale Expression von Islet-1 in-vivo. Allerdings können wir nicht ausschließen, dass epikardiale Zellen in Kultur möglicherweise eine Islet-1-Expression zeigen. Diesen Aspekt haben wir mit unseren Zellkultur-Experimenten nicht untersucht. In der Arbeit von Brønnum et al. wird nicht erwähnt, ob bei der Präparation für die Zellkulturen auch der Ausflusstrakt isoliert wurde (wahrscheinlich nicht). Möglicherweise handelt es sich also auch bei diesen Zellen um die von uns beobachteten Islet-1-positiven Fibroblasten, die höchstwahrscheinlich aus dem ventrikulären Ausflusstrakt stammen. Die veröffentlichten

Effekte von TB4 auf Herzkulturen aus adultem Gewebe können wir damit insgesamt nicht nachvollziehen.

4.5 Diskrepanzen zu veröffentlichten Arbeiten

Die von uns in dieser Arbeit vorgestellten Befunde stehen im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten, insbesondere aus der Arbeitsgruppe von Smart und Riley. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich nicht leicht erklären. Aufgrund der negativen Ergebnisse stellt sich natürlich die Frage, ob technische Fehler unsererseits für eventuelle falsch-negative Resultate verantwortlich sind. Im Speziellen bedeutet das: war das verabreichte TB4 z.B. strukturell intakt, funktionsfähig und konnte es ins Herzgewebe gelangen? Letztlich können wir diese Frage nicht mit absoluter Sicherheit bejahen. Allerdings wurde das TB4 vom gleichen Hersteller wie in den Arbeiten von Riley und Smart bezogen. TB4 wurde in Pulverform ordnungsgemäß gelagert, aliquotiert und verwendet, so dass ein möglicher Funktionsverlust minimiert wurde. Die intraperitoneale Injektion wurde sorgfältig an einer großen Zahl von Tieren durchgeführt. Von entscheidender Bedeutung wäre es natürlich, die biologische Aktivität von TB4 im Zielgewebe messen zu können. Aktuell gibt es nach unserem Wissen dafür derzeit keinen standardisierten Assay. Es besteht natürlich die Möglichkeit, TB4 z.B. immunhistologisch im Gewebe zu detektieren (Voelter and Mihelic 1993). Das alleine lässt aber noch keinen Rückschluss auf die tatsächliche Wirkung zu. Bemerkenswert ist, dass wohl auch der Zeitpunkt der TB4-Gabe einen großen Einfluss auf die kardiale Wirkung hat. So konnten die von Smart et al. berichteten Effekte bezüglich der Aktivierung epikardialer Zellen bei Gabe von TB4 *nach* Infarzierung in einer anderen Arbeit nicht bestätigt werden (Zhou et al. 2012). Als mögliche Gründe wurden von den Autoren die infarktbedingte Hypoxie genannt. Diese könnte die epikardialen Zellen verändern und dadurch den Wirkverlust von TB4 bei der Gabe nach Infarzierung bedingen.

Im Moment ist es auch noch unklar, wie und warum die intraperitoneale Gabe eines Stoffes eine solche spezifische Wirkung auf das Myokard ausüben kann. Bei Smart et al. wird dieser Aspekt nicht diskutiert. Grundsätzlich ist TB4 bereits endogen in vielen Geweben enthalten: in der Ratte ist TB4 in unterschiedlich hohen Konzentrationen in verschiedenen Geweben (am meisten in Milz, Gehirn und Leber) enthalten. Auch beim

Menschen gibt es Angaben für die Konzentration von TB4 in verschiedenen Zellarten (Lymphozyten und Thrombozyten; Hannappel 2007). Ein wichtiger Punkt wäre dabei die Unterscheidung zwischen Arbeiten, in welchen TB4 extrazellulär appliziert wurde (z.B. intraperitoneal wie bei Smart et al.) von solchen, bei denen TB4 intrazellulär erhöht gebildet wurde (durch verstärkte genomische Expression; Chen et al. 2013). Freeman et al. (2011) zeigen in ihrer Arbeit einen potentiellen Mechanismus für die Wirkung von exogen zugeführtem TB4 auf intrazelluläre Prozesse. Sie konnten eine membrangebundene ATP-Synthase als Zielstruktur von TB4 identifizieren. Bindung an diesen Rezeptor führte zu erhöhten ATP-Konzentrationen. Das erhöhte ATP wiederum aktivierte einen purinergen Rezeptor (P2X4), über den eine verstärkte Zellmigration vermittelt wurde. Allerdings wurde dieser Effekt auf *HUVECs* (*human vein endothelial*) beobachtet. Ob sich dieser Mechanismus auf andere Zellarten (z.B. Kardiomyozyten) übertragen lässt, und ob sich mit diesem Modell wirklich die vielfältigen (fraglichen) Effekte von TB4 erklären lassen, ist völlig unklar. Die Wirkung einer endogen erhöhten TB4-Konzentration wäre dadurch jedenfalls nicht erklärbar.

Bock-Marquette et al. (2004) fanden Hinweise, dass TB4 intrazellulär einen Komplex mit den Faktoren PINCH und ILK bildet und darüber die Protein-Kinase B (PKB, auch als *survival kinase* bezeichnet) aktiviert. In einer anderen Arbeit (Bock-Marquette et al. 2009) wurde die Protein-Kinase C (PKC) als mögliche Zielstruktur identifiziert. Beide Erklärungsversuche lassen sich jedoch höchstens auf ein mögliches proangiogenes Potential von TB4 übertragen. Die TB4-PKC-vermittelte Aktivierung epikardialer Zellen wurde auch in dieser Arbeit mittels der fraglich-spezifischen Marker WT1 und Tbx18 (siehe unten) festgestellt und ist daher als kritisch zu sehen. Die Stimulation epikardialer Vorläuferzellen und deren Differenzierung in Kardiomyozyten (wie bei Smart et al. 2011) ist höchstwahrscheinlich ein zellulär äußerst komplexer Vorgang und wird durch die vorhandenen Modelle daher nicht zufriedenstellend erklärt. Eine Verbindung dieser Ergebnisse mit denen von Freeman et al. ist ebenfalls momentan noch nicht möglich. Diese Punkte zeigen, dass wir momentan noch wenig über die molekularen Signalwege von TB4 wissen und auch derzeit vorhandene Modelle oft keine ausreichende Erklärung für die berichteten Effekte liefern.

Ein weiterer Punkt sollte erwähnt werden: in keiner Arbeit wurden irgendeine Art von Nebenwirkung der TB4-Behandlung beobachtet, es wurden ausschließlich positive

Effekte verzeichnet. Natürlich sind die meisten Studien dieser Art (unsere eigene Arbeit eingeschlossen) zu klein und auf einen zu kurzen Zeitraum angelegt, um signifikante Nebenwirkungen zu dokumentieren. Trotz allem sollte bei zukünftigen Studien auch dieser Aspekt weiter beleuchtet werden, ganz nach dem Pharmakologen Gustav Kuschinsky: „Ein Arzneimittel, von dem behauptet wird, dass es keine Nebenwirkungen habe, steht im dringenden Verdacht, auch keine Hauptwirkung zu besitzen.“

Verschiedene Arbeiten zeigen darüber hinaus, dass es eine Reihe von kritischen Punkten gibt, die eine eindeutige Interpretation der berichteten, protektiven Effekte von TB4 erschweren. Diese Punkte haben wir in unserer Studie nicht untersucht, sie zeigen aber die insgesamt umstrittenen bzw. fragliche Rolle von TB4. Wichtig ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die Frage, ob die in der Literatur verwendeten Marker (WT1 und Tbx18) überhaupt eine spezifische und damit zuverlässige Auskunft über den epikardialen Ursprung von Zellen geben können. Entscheidend für die Spezifität wäre eine strikte Restriktivität des Markers auf die Vorläuferzellen; in sonstigen Zellen bzw. in differenzierten Gewebe dürfen sie nicht detektierbar sein. Zwei Studien haben sich mit dieser Fragestellung befasst. Rudat and Kispert (2012) fanden in einer umfassenden Studie Anhaltspunkte, dass die Expression von WT1 nicht auf das Epikard beschränkt ist. Sie fanden WT1-mRNA und WT1-Protein nicht nur in Zellen des embryonalen Proepikardiums, dem Gewebe, welches sich in das adulte Epikard entwickelt, sondern auch in differenzierten Endothellzellen. Zusätzlich untersuchten sie die in vorigen Studien verwendeten Mausmodelle (WT1^{creEGFP} und WT1^{creERT2}). Es zeigte sich eine von der WT1-Expression unabhängige Expression des Markerproteins GFP (WT1^{creEGFP}) und eine durch Tamoxifen nicht ausreichend induzierbare Markierung der Zellen (WT1^{creERT2}). Zusammengefasst bewerten Rudat und Kispert WT1 als inadäquaten Marker für die Herkunft epikardialer Zellen. Ähnlich zweifeln Christoffels et al. (2009) die Nutzung von Tbx18 als Marker für epikardiale Zellen an: sie fanden die Expression von Tbx18 ebenfalls nicht beschränkt auf das Proepikardium, sondern während der Embryonalentwicklung auch in Kardiomyozyten des interventrikulären Septums und des linken Ventrikels. Letztlich ist somit auf jeden Fall anzuzweifeln, ob die Modelle, die WT1 oder Tbx18 als Herkunftsmarker nutzen, überhaupt eine adäquate Aussage über den epikardialen Ursprung von Zellen treffen können.

Auch hinsichtlich der TB4-induzierten Gefäßneubildung müssen publizierte Daten kritisch bewertet werden. Smart et al. (2007) und Shrivastava et al. (2010) berichten einen Effekt von TB4 auf das koronare Gefäßsystem. Beide Gruppen fanden Anhaltspunkte für eine epikardiale Aktivierung von Blutgefäßzellen, Shrivastava et al. nutzten dabei unter anderem die Marker WT1 und Tbx18. Auf die fragliche Nutzbarkeit dieser Marker und eine dementsprechende Verwertung erzielter Ergebnisse wurde oben bereits eingegangen. Smart et al. fanden eine Zunahme des angiogenen Wachstumsfaktors Tie-2 bei Zellen in-vitro nach Stimulation mit TB4 und VEGF. Ob diese in der Zellkultur beobachteten Ergebnisse wirklich für einen signifikanten Effekt von TB4 auf die Koronargefäße in-vivo sprechen, ist fraglich.

Ein weiterer Gegenstand intensiver Diskussion ist die Rolle von TB4 in der Herzentwicklung. Banerjee et al. (2012, 2013) führten dazu eine Reihe von Untersuchungen an TB4-knockout-Mäusen durch und kam zu dem Ergebnis, dass TB4 „entbehrlich“ sei für die Lebensfähigkeit, die Herzentwicklung, die Koronargefäßentwicklung und die Herzfunktion. Rossdeutsch et al. (2012) wiederum sehen TB4 als „essentiell“ für die Gefäßentwicklung und –stabilität.

Der unterschiedliche methodische Ansatz zur Ablation der TB4-Wirkung mag ursächlich sein für diese differierenden Ergebnisse. Banerjee et al. nutzten für ihre Arbeiten einen globalen und einen Herz-spezifischen TB4-Knockout (Nkx2.5- und α -MHC-getriggert). Beide Knockout-Modelle zeigten keinen letalen Phänotyp und keine Pathologien hinsichtlich der Herz- oder Koronargefäßentwicklung. Die Gruppe um Rossdeutsch verwendete dagegen zum Endothel- und Herz-spezifischen Knockout von TB4 eine *short hairpin RNA* (shRNA). Diese beiden Ansätze führten zu gegensätzlichen Befunden und sind Gegenstand intensiver Diskussion (Banerjee et al. 2012; Rossdeutsch et al. 2012; Banerjee et al. 2013; Smart and Riley 2013). Momentan lässt sich nicht klären, ob die Herangehensweise der einen oder der anderen Gruppe richtig ist. Es zeigt aber, dass unterschiedliches methodisches Vorgehen zu unterschiedlichen Resultaten führen kann. An dieser Stelle wollen wir auf eine Kontroverse hinweisen, die gewisse Parallelen zu den diskrepanten Befunden bezüglich TB4 aufweist. Loffredo et al. (2013) konnten den *growth differentiation factor 11* (GDF11) als wichtigen Faktor für pathologische kardiale Veränderungen identifizieren. GDF zeigte dabei einen altersabhängigen Serumkonzentrationsabfall, die intraperitoneale Gabe von GDF11 über 30 Tage führte zu einem Rückgang der kardialen Hypertrophie. Dieser Effekt konnte in einer anderen

Arbeit nicht nachvollzogen werden, hier zeigten sich keinerlei Veränderungen hinsichtlich der kardialen Struktur nach Gabe von GDF11 (Smith et al. 2015). In einer weiteren Studie zeigte sich kein altersabhängiger Abfall, sondern vielmehr einen Anstieg von GDF11 (Egerman et al. 2015). Die Autoren führten die vorherige Annahme (GDF11 sinkt im Alter) auf GDF11-unspezifische Detektionsmethoden zurück. Auch hier konnten also die initialen Ergebnisse von Loffredo et al. durch andere Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden.

Bezüglich der Wirkung von Islet-1 auf TB4 konnten wir mit einem ausführlich charakterisierten und häufig genutzten Mausmodell keinerlei Effekt von TB4 auf die Islet-1-Expression feststellen. Den in bisherigen Arbeiten genutzten Nachweis von Islet-1 mittels Immunhistologie bewerten wir als kritisch, da er fehleranfällig ist und damit keine spezifische Detektion bzw. keine genaue Darstellung der Lokalisation von Islet-1 erbringt. Dies ist insofern besonders relevant, da auch wir zunächst Islet-1-positive Zellen im epikardialen Infarktgebiet detektieren konnten. Diese lagen jedoch bei genauerer Betrachtung im ventrikulären Ausflusstrakt. Erstaunlicherweise konnten wir auch keinen Effekt von TB4 auf die Vaskularisierung feststellen, obwohl auch dieser Effekt in der Literatur mehrfach beschrieben ist. TB4 führt bei uns auch nicht zu einer Reduzierung der Infarktgröße.

Zusammengefasst legen die von uns vorgestellten Ergebnisse den Schluss nahe, dass TB4 keinen signifikanten Einfluss auf die Reexpression von Islet-1 hat. Für unsere Ergebnisse spricht:

- Die von uns benutzte Nachweismethode von Islet-1-positiven Zellen ist immunhistologischen Methode überlegen, da sie bereits ausgiebig charakterisiert wurde, eine hohe Zuverlässigkeit besitzt und technisch einfach durchführbar ist.
- Wir untersuchten eine hohe Anzahl von Gewebsschnitten (ca. 16.000 Stück) und fanden bis auf 1 Zelle keinen Hinweis für eine Expression von Islet-1 durch TB4.
- Effekte auf die Infarktgröße oder die Vaskularisation wurden nicht beobachtet.

5 Ausblick

Angesichts einer alternden Bevölkerung und der damit verbundenen, nach wie vor hohen Mortalität an Herz-Kreislaufkrankungen sind neue, innovative Therapieoptionen dringend nötig. Die vorgestellte Arbeit hat sich mit der Frage nach einer Reaktivierung der Islet-1-Expression und einem möglichen kardioprotektiven Effekt von TB4 beschäftigt. Dieser Effekt ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Unsere Ergebnisse sprechen dabei gegen einen signifikanten Beitrag von TB4 bei der Reexpression von Islet-1. Sie sind damit in Übereinstimmung mit verschiedenen, vorgestellten Arbeiten, die einen signifikanten kardioprotektiven Effekt von TB4 anzweifeln.

Der Bereich der regenerativen Medizin rückt immer wieder in den Fokus der breiten Öffentlichkeit: revolutionäre und scheinbar simple Therapieansätze nähren die Hoffnung, auch schwere, tödlich verlaufende Krankheiten mit einer einfachen Spritze oder Tablette behandeln zu können. Leider haben manche dieser Behandlungsoptionen ihre hochgesteckten Erwartungen nicht erfüllt, da sich oft grundlagenwissenschaftlich gewonnene Erkenntnisse nicht so einfach in die Praxis umsetzen ließen. Diese Erkenntnisse sind nur dann valide und zuverlässig, wenn sie, aus verschiedenen Blickwinkeln betrachtet und mit verschiedenen Methoden bearbeitet, zu dem gleichen Ergebnis kommen. Nur dann kann über eine Weiterentwicklung hin zur therapeutischen Anwendung am Menschen nachgedacht werden. Ob TB4 diese Anforderungen langfristig erfüllen kann, ist fraglich.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorgestellten Arbeit war es, die Wirkung von Thymosin Beta-4 (TB4) auf die Reexpression des Transkriptionsfaktors Islet-1 zu untersuchen. Dazu wurden transgene Islet-1-Mäuse (ISL1-nLacZ) 7 Tage mit einer intraperitonealen Injektion von 12 mg TB4 pro kg Körpergewicht behandelt. Zur Kontrolle erhielten Islet-1-Mäuse die gleiche Menge NaCl. Anschließend wurde eine LAD-Ligatur durchgeführt, was eine Myokardinfarzung zur Folge hatte. Die Herzen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 7 und 14 Tage nach LAD-Ligatur) entnommen und mit verschiedenen Techniken untersucht. Wir fertigten Gewebsschnitte an und führten eine Reihe von Untersuchungen durch, um die Wirkung von TB4 auf Islet-1-positiven Zellen, die Infarktnarbenreduzierung und die Neoangiogenese zu überprüfen. Parallel führten wir Experimente *in-vitro* durch, um die Wirkung von TB4 auf Islet-1-positiven Zellen zu bestimmen. Wir kamen zu folgenden Ergebnissen:

- TB4 hatte keinen Effekt auf Islet-1-positive Zellen nach Myokardinfarkt. Insgesamt wurde in ca. 16.000 Gewebsschnitten eine möglicherweise neu entstandene Islet-1-positive Zelle gefunden. Diese Zelle zeigte keine Merkmale einer kardialen Vorläuferzelle oder einer reifen kardialen Myozyte.
- TB4 führte nicht zu einer Reduktion der Infarktnarbe.
- TB4 führte nicht zu einer verstärkten Neoangiogenese im Infarktbereich.
- TB4 hatte keinen Effekt auf Islet-1-positive Zellen in Kultur.

Somit fanden wir in unserer Arbeit keinen Hinweis für einen signifikanten Effekt von TB4 auf die Islet-1-Expression nach Myokardinfarkt. Wir gehen davon aus, dass Diskrepanzen zu bisher veröffentlichten Arbeiten vor allem methodisch bedingt sind. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von TB4 im Herzen genauer zu klären.

7 Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of thymosin beta-4 (TB4) on the reexpression of the transcription factor Islet-1. Transgenic Islet-1-mice (ISL1-nLacZ) received intraperitoneal injection of 12 mg TB4 per kilogram body-weight. Control-animals were treated with the same dose of NaCl. Subsequently, myocardial infarction was induced by permanent ligation of the LAD. Hearts were harvested 2, 7 and 14 days after LAD-ligation and assessed with different approaches. We produced cryo tissue-sections and carried out various experiments to evaluate the effect of TB4 on Islet-1-positive cells, infarct size and neoangiogenesis. In-vitro experiments were carried out to examine the impact of TB4 on Islet-1-positive cells. We reached the following results:

- TB4 did not have an effect on Islet-1-positive cells after myocardial infarction. Altogether, one probably newly evolved Islet-1-positive cell was found in approximately 16,000 tissue-sections. This cell did not show signs of a cardiomyocyte progenitor-cell or a differentiated cardiomyocyte.
- TB4 did not lead to a reduction of the infarct scar.
- TB4 did not lead to an enhanced neoangiogenesis in the infarct area.
- TB4 did not have an effect on cultured Islet-1-positive cells.

Therefore, we did not find evidence for a significant effect of TB4 on the expression of Islet-1 after myocardial infarction. We conclude that the discrepancies in recent published data mainly depend upon different methodical approaches. More studies are needed to further clarify the role of TB4 in the heart.

8 Literaturverzeichnis

- Ahlgren U, Pfaff SL, Jessell TM, et al. (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature* 385:257–260. doi: 10.1038/385257a0
- Ali SR, Hippenmeyer S, Saadat L V, et al. (2014) Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Pnas* 111:8850–5. doi: 10.1073/pnas.1408233111
- Ara JARA (2005) Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol* 426:405–426.
- Banerjee I, Morris TM, Evans SM, Chen J (2013) Thymosin β 4 is not required for embryonic viability or vascular development. *Circ Res* 112:e25–8. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300197
- Banerjee I, Zhang J, Moore-Morris T, et al. (2012) Thymosin beta 4 is dispensable for murine cardiac development and function. *Circ Res* 110:456–64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.258616
- Bao W, Ballard VL, Needle S, et al. (2013) Cardioprotection by systemic dosing of thymosin beta four following ischemic myocardial injury. *Front Pharmacol* 4:149. doi: 10.3389/fphar.2013.00149
- Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324:98–102. doi: 10.1126/science.1164680
- Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. (2015) Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161:1566–1575. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.026
- Bock-Marquette I, Saxena A, White MD, et al. (2004) Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair. *Nature* 432:466–72. doi: 10.1038/nature03000
- Bock-Marquette I, Shrivastava S, Pipes GCT, et al. (2009) Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 46:728–738. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.01.017
- Bolon B (2008) Whole Mount Enzyme Histochemistry as a Rapid Screen at Necropsy for Expression of β -Galactosidase (LacZ)-Bearing Transgenes: Considerations for Separating Specific LacZ Activity from Nonspecific (Endogenous) Galactosidase Activity. *Toxicol Pathol* 36:265–276. doi: 10.1177/0192623307312693
- Breckwoldt K, Weinberger F, Eschenhagen T (2015) Heart regeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.11.010

- Brønnum H, Andersen DC, Schneider M, et al. (2013) Islet-1 is a dual regulator of fibrogenic epithelial-to-mesenchymal transition in epicardial mesothelial cells. *Exp Cell Res* 319:424–435. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.12.019
- Cai C-L, 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* 5:877–89.
- Cai C-L, Martin JC, Sun Y, et al. (2008) A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 454:104–8. doi: 10.1038/nature06969
- Camelliti P, Borg TK, Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65:40–51. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.020
- Can B, Karagoz F, Yildiz L, et al. (2012) Thymosin beta4 is a novel potential prognostic marker in gastrointestinal stromal tumors. *Apmis* 120:689–698. doi: 10.1111/j.1600-0463.2012.02887.x
- Chen S, Shimoda M, Chen J, Grayburn P a (2013) Stimulation of adult resident cardiac progenitor cells by durable myocardial expression of thymosin beta 4 with ultrasound-targeted microbubble delivery. *Gene Ther* 20:225–33. doi: 10.1038/gt.2012.89
- Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, et al. (2009) Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature* 458:E8–9; discussion E9–10. doi: 10.1038/nature07916
- 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. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.262717
- Degabriele NM, Griesenbach U, Sato K, et al. (2004) Critical appraisal of the mouse model of myocardial infarction. *Exp Physiol* 89:497–505. doi: 10.1113/expphysiol.2004.027276
- Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, et al. (2015) GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab* 164–174. doi: 10.1016/j.cmet.2015.05.010
- El-Armouche A, Eschenhagen T (2009) B-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart. *Heart Fail Rev* 14:225–241. doi: 10.1007/s10741-008-9132-8
- Ericson J, Thor S, Edlund T, et al. (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *Science* 256:1555–60.
- Eulalio A, Mano M, Dal Ferro M, et al. (2012) Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. *Nature* 492:376–81. doi: 10.1038/nature11739
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR (1978) Experimental myocardial infarction in the

- rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 90:57–70.
- Freeman KW, Bowman BR, Zetter BR (2011) Regenerative protein thymosin beta-4 is a novel regulator of purinergic signaling. *FASEB J* 25:907–15. doi: 10.1096/fj.10-169417
- Goldstein AL (2003) Thymosin beta 4 : A New Molecular Target for Antitumor Strategies. *J Natl Cancer Inst* 95:2003. doi: 10.1096/fj.03
- Hannappel E (2007) Beta-Thymosins. *Ann N Y Acad Sci* 1112:21–37. doi: 10.1196/annals.1415.018
- Hinkel R, Ball HL, DiMaio JM, et al. (2015) C-terminal variable AGES domain of Thymosin β 4: the molecule's primary contribution in support of post-ischemic cardiac function and repair. *J Mol Cell Cardiol* 87:113–125. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.07.004
- Hinkel R, El-Aouni C, Olson T, et al. (2008) Thymosin beta4 is an essential paracrine factor of embryonic endothelial progenitor cell-mediated cardioprotection. *Circulation* 117:2232–40. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.758904
- Ho KK, Anderson KM, Kannel WB, et al. (1993) Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88:107–15.
- 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. doi: 10.1038/nm1618
- Huber RE, Lytton J, Fung EB (1980) Efflux of beta-galactosidase products from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 141:528–33.
- Jeffery CJ (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24:8–11.
- Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464:606–9. doi: 10.1038/nature08899
- Juers DH, Matthews BW, Huber RE (2012) *LacZ* β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci* 21:1792–1807. doi: 10.1002/pro.2165
- Kajstura J, Urbanek K, Perl S, et al. (2010) Cardiomyogenesis in the adult human heart. *Circ Res* 107:305–15. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223024
- Kelly RG, Brown N a, Buckingham ME (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 1:435–40.
- Kiernan J a (2007) Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotech Histochem* 82:73–103. doi: 10.1080/10520290701375278

- Kikuchi K, Holdway JE, Werdich A a, et al. (2010) Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes. *Nature* 464:601–5. doi: 10.1038/nature08804
- Kumar D, Hacker T a, Buck J, et al. (2005) Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis* 16:41–44. doi: 10.1097/00019501-200502000-00008
- Laflamme M a, Murry CE (2011) Heart regeneration. *Nature* 473:326–35. doi: 10.1038/nature10147
- Laugwitz K-L, Moretti A, Caron L, et al. (2008) Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? *Development* 135:193–205. doi: 10.1242/dev.001883
- Lefkowitz MP, Rizkala AR, Pharm D, et al. (2014) Angiotensin–Neprilysin Inhibition versus Enalapril in Heart Failure. *N Engl J Med* 993–1004. doi: 10.1056/NEJMoa1409077
- Liu SS, Monti J, Kargbo HM, et al. (2013) Frontiers of therapy for patients with heart failure. *Am J Med* 126:6–12.e6. doi: 10.1016/j.amjmed.2012.04.033
- Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, et al. (2013) Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell* 153:828–39. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.015
- Mehrkens D (2015) Lokalisierung Islet-1-positiver Zellen im erwachsenen murinen Herz. Universität Hamburg
- Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. (1995) Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 269:H2147–54.
- Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, et al. (2001) The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol* 238:97–109. doi: 10.1006/dbio.2001.0409
- Mollova M, Bersell K, Walsh S, et al. (2013) Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Pnas* 110:1–6. doi: 10.1073/pnas.1214608110/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214608110
- Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. (2006) Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127:1151–65. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.029
- Nagamoto T, Eguchi G, Beebe DC (2000) Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Cultured Lens Epithelial Cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 41:11–13.
- Oliver C, Jamur MC (2010) Immunocytochemical Methods and Protocols. *Methods Mol Biol*. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004

- Peng H, Xu J, Yang X-P, et al. (2014) Thymosin- 4 prevents cardiac rupture and improves cardiac function in mice with myocardial infarction. *AJP Hear Circ Physiol* 307:H741–H751. doi: 10.1152/ajpheart.00129.2014
- Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. (2011) Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331:1078–80. doi: 10.1126/science.1200708
- Ram R, Mickelsen DM, Theodoropoulos C, Blaxall BC (2011) New approaches in small animal echocardiography : imaging the sounds of silence. doi: 10.1152/ajpheart.00559.2011.
- Reeve JL V, Szegezdi E, Logue SE, et al. (2007) Distinct mechanisms of cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin and hypoxia converge on mitochondria and are inhibited by Bcl-xL. *J Cell Mol Med* 11:509–20. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00042.x
- Robinson JP, Bs JS, Kumar GL (2013) Immunofluorescence. *Immunohistochem Stain Methods Educ Guid* 160.
- Rosdeutsch A, Smart N, Dubé KN, et al. (2012) Essential role for thymosin β 4 in regulating vascular smooth muscle cell development and vessel wall stability. *Circ Res* 111:e89–102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259846
- Rudat C, Kispert A (2012a) Wt1 and epicardial fate mapping. *Circ Res* 111:165–9. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.273946
- Sangüeza O., Requena L (2003) Special Techniques for the Study of Vessels and Vascular Proliferations. *Pathol. Vasc. Ski. lesions*. pp 7–13
- Scrutinio D, Mastropasqua F, Guida P, et al. (2014) Renal Dysfunction and Accuracy of N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Predicting Mortality for Hospitalized Patients With Heart Failure. *Circ J* 78:2439–2446. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0405
- Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al. (2013) Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493:433–6. doi: 10.1038/nature11682
- Shaperf NL, Harduin-lepers A, I JHS (1994) Male Germ Cell Expression of Murine P4-Galactosyltransferase. *J Biol Chem* 269:25165–25171.
- Shrivastava S, Srivastava D, Olson EN, et al. (2010) Thymosin beta4 and cardiac repair. *Ann N Y Acad Sci* 1194:87–96. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05468.x
- Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al. (2011) De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury. *Nature* 474:640–4. doi: 10.1038/nature10188
- Smart N, Riley PR (2009) Derivation of Epicardium-Derived Progenitor Cells (EPDCs) from Adult Epicardium. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. doi: 10.1002/9780470151808.sc02c02s8

- Smart N, Riley PR (2013) Thymosin β 4 in vascular development response to research commentary. *Circ Res* 112:e29–30. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.300555
- Smart N, Risebro C a, Melville A a D, et al. (2007) Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 445:177–82. doi: 10.1038/nature05383
- Smith SC, Zhang X, Zhang X, et al. (2015) GDF11 Does Not Rescue Aging-Related Pathological Hypertrophy. *Circ Res* CIRCRESAHA.115.307527. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307527
- Snippert HJ, Clevers H (2011) Tracking adult stem cells. *EMBO Rep* 12:113–22. doi: 10.1038/embor.2010.216
- Soonpaa MH, Field LJ (1998) Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 83:15–26. doi: 10.1161/01.RES.83.1.15
- Souders C a, Bowers SLK, Baudino T a (2009) Cardiac fibroblast: the renaissance cell. *Circ Res* 105:1164–76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.209809
- Statistisches Bundesamt Gesundheitswesen Zweigstelle Bonn (2014) Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12, R 4 572:572.
- 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* 304:286–96. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.12.048
- Takagawa J, Zhang Y (2007) Myocardial infarct size measurement in the mouse chronic infarction model: comparison of area-and length-based approaches. *J Appl Physiol* 102:2104–2111. doi: 10.1152/jappphysiol.00033.2007.Myocardial
- Thor S, Andersson SG, Tomlinson A, Thomas JB (1999) A LIM-homeodomain combinatorial code for motor-neuron pathway selection. *Nature* 397:76–80. doi: 10.1038/16275
- Varela-Echavarría a, Pfaff SL, Guthrie S (1996) Differential expression of LIM homeobox genes among motor neuron subpopulations in the developing chick brain stem. *Mol Cell Neurosci* 8:242–57. doi: 10.1006/mcne.1996.0061
- Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al. (2008) Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 118:2057–62. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.784215
- 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. doi: 10.1016/S0070-2153(10)90001-X
- Voelter W, Mihelic M (1993) Distribution and biological activity of beta-thymosins. *Amino Acids* 19:1–13.

- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, et al. (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 128:3179–88.
- Weinberger F, Mehrkens D, Friedrich FW, et al. (2012) Localization of Islet-1-positive cells in the healthy and infarcted adult murine heart. *Circ Res* 110:1303–10. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.259630
- 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. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.11.074
- Wright MJ, Rosenthal E, Stewart L, et al. (1998) beta-Galactosidase staining following intracoronary infusion of cationic liposomes in the in vivo rabbit heart is produced by microinfarction rather than effective gene transfer: a cautionary tale. *Gene Ther* 5:301–308. doi: 10.1038/sj.gt.3300590
- Zhou B, Honor LB, He H, et al. (2011) Adult mouse epicardium modulates myocardial injury by secreting paracrine factors. *Heart*. doi: 10.1172/JCI45529DS1
- Zhou B, Honor LB, Ma Q, et al. (2012) Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52:43–7. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.08.020
- Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. (2008) Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 454:109–13. doi: 10.1038/nature07060

9 Veröffentlichungen/Kongressbeiträge

The effect of thymosin beta-4 on the Islet-1 expression in the adult murine heart

Vortrag auf der 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie —
Herz- und Kreislaufforschung e.V., Mannheim, 23. bis 26. April 2014

10 Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn Professor Thomas Eschenhagen für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können. Seine Art, wissenschaftliches Denken zu leben, zu fordern und zu fördern, hat mich tief beeindruckt.

Ein spezieller Dank gilt meinem Betreuer, Dr. Florian Weinberger, der mit seinem Enthusiasmus, seiner locker-freundlichen Art und seiner Geduld sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein Dank gilt auch Jutta Starbatty für die stets freundlichen und geduldigen Erklärungen zu den technischen Abläufen und der großen Hilfe bei den Experimenten.

Ich bedanke mich bei Moritz Becher und Mandy Stubbendorf für die Durchführung der Tier-OPs.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die angenehme und schöne Zeit, die ich dort verbracht habe.

Der Deutschen Herzstiftung danke ich außerdem für die großzügige finanzielle Unterstützung durch das Kaltenbach-Doktorandenstipendium.

Abschließend will ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Sophia danken. Ohne sie wäre diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Philipp Manuel Nicol

Geburtsdatum: 4. November 1988 in Stuttgart

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Adresse: Gärtnerstraße 10
20253 Hamburg

Schulbildung

2008 Allgemeine Hochschulreife
Freie Waldorfschule am Kräherwald, Stuttgart

Studium

Seit 2009 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

09/2011 1. Ärztliche Prüfung

Famulaturen in Hamburg, München und New York

2012 Stipendiat der Deutschen Herzstiftung (Kaltenbach-Doktorandenstipendium)

3/2015: 1. Teil des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung

Seit 5/2015 Praktisches Jahr in München, Hamburg und Sri Lanka

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.....

13 Anhang

Verlauf:	Tiernummer 12	Tiernummer 13	Tiernummer 10	Tiernummer 11
	NaCl	NaCl	TB4	TB4
Ankunft	16,5	17,5	18,5	16,1
Injektion, 1. Tag	16,4	18,2	18,6	16,8
Injektion, 2. Tag	16,4	18,8	18,6	17,2
Injektion, 3. Tag	16,2	18,7	18,3	16,6
Injektion, 4. Tag	16,2	18,5	18,3	16,6
Injektion, 5. Tag	16,1	18,3	18,5	16,4
Injektion, 6. Tag	16,1	18,2	18,4	16,5
Injektion, 7. Tag	15,8	18,7	18,1	16,8
post Ligatur + Injektion	15,7	18,2	17,8	16,0
Keine Injektion	14,9	18,1	17,6	14,9
Injektion post-MI Tag 2	15,3	17,9	17,6	15,5
Keine Injektion	15,4	-	17,8	-
Injektion post-MI Tag 4	15,6	18,3	17,8	15,8
Keine Injektion	-	17,6	15,3	15,3
Injektion post-MI Tag 6	15,7	17,7	17,8	15,8
Keine Injektion Organentnahme				

Tab. 11: Gewichtsentwicklung im Verlauf einer 14-tägigen TB4-Behandlung. Angabe in Gramm