

Aus der Klinik und Poliklinik mit  
Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur kardialen Plastizität von  
multipotenten Zellen des humanen subkutanen Fettgewebes**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christoph Nabzdyk  
aus Weißenfels

Gutachter: 1.: Priv.-Doz. Dr. P. Fotuhi  
2.: Prof. Dr. med. K. Stangl  
3.: Prof. Dr. med. A. Staudt

Datum der Promotion: 16. 05. 2010

Meinen Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1 <i>Epidemiologie und Therapie des akuten Koronarsyndroms</i>	7
1.2 <i>Stammzellen als Ansatz zur Therapie nach Myokardinfarkt</i>	8
1.2.1 <i>Embryonale Stammzellen</i>	8
1.2.2 <i>Adulte Stammzellen</i>	9
1.2.2.1 <i>Adipose Tissue Derived Stem Cells (ADSCs)</i>	10
1.3 <i>Gentherapie</i>	12
1.3.1 <i>Lentiviren</i>	12
1.3.2 <i>Reportergentechnologie auf Basis eines lentiviralen Vektors</i>	13
1.4 <i>Kombination von Stammzell- und Reportergentechnologie</i>	14
1.4.1 <i>Homeoboxgen und Transkriptionsfaktor Nkx2.5</i>	14
1.4.2 <i>MLC-2v (Myosin-Leichtkette - ventrikulärer Isotyp 2)</i>	15
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1 <i>Viruskonstruktion</i>	18
3.1.1 <i>DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung</i>	19
3.1.2 <i>Plasmidspaltung</i>	19
3.1.3 <i>T4 DNA-Polymerase Reaktion</i>	20
3.1.4 <i>Agarosegelelektrophorese</i>	20
3.1.5 <i>Probenaufbereitung und Gellauf</i>	21
3.1.6 <i>DNA-Extraktion aus Agarosegelen</i>	21
3.1.7 <i>DNA-Aufreinigung</i>	22
3.1.8 <i>Herstellung von Agarplatten</i>	22
3.1.9 <i>Plasmidligation und Transformation von E.coli Bakterienstämmen</i>	23
3.1.10 <i>Expansion und Glycerolstocks der Bakterienkolonien</i>	24
3.1.11 <i>Plasmidextraktion (Miniprep)</i>	24
3.1.12 <i>Plasmidextraktion (Maxiprep)</i>	25
3.1.13 <i>Restriktionsstrategie</i>	26
3.1.13 <i>Plasmidsequenzierung</i>	29
3.1.14 <i>Transfektion von 293T Zellen und Viruskonzentrationsbestimmung</i>	31
3.2 <i>Etablierung und Validierung der lentiviralen Konstrukte</i>	33

3.2.1	<i>Quantifizierung der lentiviralen Integrationseinheiten</i>	33
3.2.2	<i>Gewinnung von humanen ADSCs</i>	35
3.2.3	<i>Extraktion neonataler Rattenkardiomyozyten</i>	36
3.2.4	<i>Kontrollinfektionen zur Validierung der HIV-1 basierten Lentiviren</i>	37
3.2.5	<i>Zellkultur</i>	39
3.3	<i>Differenzierungsexperiment mit 5-Azacytidine</i>	40
3.4	<i>Molekularbiologische Analyse der ADSCs</i>	40
3.4.1.	<i>Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion</i>	40
3.4.2	<i>Immunocytochemie</i>	43
3.5	<i>Zellzyklusanalyse</i>	43
3.6	<i>Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Zellfraktionen</i>	44
3.6.1	<i>Calcium-Imaging</i>	44
3.6.2	<i>Patch Clamp</i>	45
3.7	<i>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</i>	45
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
4.1	<i>Plasmidklonierung und Validierung</i>	46
4.2.	<i>ADSC Kultivierung und Infektion mit lentiviralen Konstrukten</i>	47
4.2.1	<i>Infektion von ADSCs mit anschließender FACS-Analyse</i>	49
4.3	<i>5-Aza-Effekt auf die Nkx2.5-gekoppelte eGFP-Expression in ADSCs</i>	50
4.4	<i>RT-PCR- und Immunzytochemieanalyse der isolierten ADSCs</i>	51
4.4.1	<i>RT-PCR</i>	51
4.4.2	<i>Immunfluoreszenzfärbungen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	52
4.5	<i>Zellzyklusanalyse von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	54
4.6	<i>Elektrophysiologische Analyse von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	55
4.6.1	<i>Calcium Imaging</i>	55
4.6.2	<i>Patch Clamp</i>	57
4.7	<i>TEM - Untersuchung von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	57
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
5.1	<i>Virusvalidierung</i>	59
5.2	<i>FACS-Analysen von infizierten Zellpopulationen</i>	59
5.3	<i>5-Aza-Effekt auf die Nkx2.5-gekoppelte eGFP-Expression in ADSCs</i>	61
5.4	<i>RT-PCR-/Immunzytochemieanalyse von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	62

<i>5.5 Zellzyklusanalyse von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen</i>	64
<i>5.6 Calcium Imaging und Patch Clamp Analyse</i>	64
<i>5.7 TEM-Untersuchungen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-ADSCs</i>	65
<i>5.8 Erkenntnisse aus der experimentellen Stammzelltherapie</i>	65
<i>5.8.1 Stand der klinischen Erkenntnisse</i>	68
<i>5.9 Ausblick</i>	68
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>7. SUMMARY</b>	<b>73</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>74</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>75</b>
<b>10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>87</b>
<b>12. ERKLÄRUNG ÜBER DIE SELBSTSTÄNDIGKEIT</b>	<b>88</b>

# 1. Einleitung

## *1.1 Epidemiologie und Therapie des akuten Koronarsyndroms*

Die koronare Herzerkrankung ist eine der häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt.<sup>1</sup> Das akute Koronarsyndrom umfasst die Krankheitsbilder der instabilen Angina pectoris, des nicht-ST-Elevationsmyokardinfarkts und des ST-Elevationsmyokardinfarkts. In Deutschland werden jährlich mehr als 400.000 Fälle des akuten Koronarsyndroms registriert.<sup>2</sup> Es überleben nur etwa 65% der Patienten mit akutem Myokardinfarkt den ersten Tag nach Beginn der akuten Symptomatik.<sup>3</sup> Trotz eines gut ausgebildeten medizinischen Netzwerks mit kurzen Prähospitalzeiten beginnt die Behandlung des Myokardinfarktpatienten im Durchschnitt erst drei Stunden nach Einsatz der Symptomatik.<sup>4</sup> Bei einem Myokardinfarkt geht kontraktiles Parenchym zu Grunde und wird durch fibröses Narbengewebe ersetzt.<sup>5</sup> Aufgrund dessen kann es bei Myokardinfarktpatienten akut sowie mittel- und langfristig zu Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz kommen. Bei der sich akut entwickelnden Herzinsuffizienz besteht 30 Tage nach Infarkt ein vierfach höheres Mortalitätsrisiko als bei Patienten ohne Herzinsuffizienz. Obwohl die Mortalitätsraten innerhalb des Krankenhauses durch stetig verbesserte Behandlungskonzepte des akuten Myokardinfarkts gesenkt werden konnten, bleiben langfristige Mortalitätsraten in solchen Patienten hoch.<sup>6,7</sup>

Klinische Studien haben positive, adjuvante Effekte von pharmakologischen Substanzen auf die Regeneration des Myokards, die Myokardperfusion und die Progredienz der koronaren Herzerkrankung belegt.<sup>8-16</sup> Diese Therapieformen bilden jedoch keinen Ersatz von untergegangenen Myokard.

Neue Therapienverfahren wie die Stammzelltherapie werden daher erforscht, mit dem Ziel das Areal des infarzierten Myokards und die Narbenformation zu verringern. Es konnten bereits erfolgreich autologe Knochenmarkstammzellen in Patienten mit Myokardinfarkt transplantiert werden.<sup>17-19</sup> Es werden verschiedene Mechanismen angeführt, durch welche die applizierten Stammzellen zu einer Verbesserung der Ventrikelfunktion geführt haben könnten. Unter anderem wird eine Transdifferenzierung von Stammzellen in kardiomyozytäre Zellen diskutiert.<sup>20-22</sup> Dieser Frage soll auch in der vorliegenden Dissertation nachgegangen werden.

## ***1.2 Stammzellen als Ansatz zur Therapie nach Myokardinfarkt***

Nach einer häufigen und auch in dieser Arbeit verwendeten Definition bezeichnet man Stammzellen als nicht ausdifferenzierte Zellen des Körpers.<sup>23, 24</sup> Sie sind befähigt, ständig neue, organspezifische Tochterzellen zu erzeugen und sich dabei selbst zu erhalten.<sup>25</sup> Der zugrunde liegende Mechanismus wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet. Dieser erlaubt es ihnen, Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu generieren und andererseits Tochterzellen mit größerer Ausdifferenzierung hervorzubringen.<sup>25</sup> Das biologische Milieu der Nische in der sich die Stammzellen befinden ist mitentscheidend, in welchem Maße Differenzierung und Proliferation stattfindet.<sup>26, 27</sup>

Ein relativ neuer Ansatz zur Therapie von Myokardinfarkten ist die Transplantation von Stammzellen.<sup>28</sup> Dabei werden Stammzellen auf verschiedenen Wegen an den Ort des Infarkts gebracht. Dies kann durch lokale oder systemische Applikation erfolgen. Die Eigenschaften der Stammzellen sollen vor Ort die Regeneration des Myokards beeinflussen. Als Mechanismen werden eine vermehrte Angiogenese oder struktureller Myokardersatz diskutiert.<sup>17, 29, 30</sup>

Eine Möglichkeit der groben Einteilung von Stammzellen ist die Unterscheidung zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Im Folgenden sollen die Charakteristika der embryonalen Stammzellen kurz umrissen und primär auf Ergebnisse von Studien von adulten Stammzellen eingegangen werden.

### ***1.2.1 Embryonale Stammzellen***

Embryonale Stammzellen nehmen eine Sonderstellung unter den Stammzellen ein und sollen an dieser Stelle nur kurz dargestellt werden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent, aus ihnen kann sich jede Zelle des Körpers bilden.<sup>31-33</sup> Murine embryonale Stammzellen sind die meistuntersuchten embryonalen Stammzellen. Es konnte demonstriert werden, dass pluripotente murine embryonale Stammzellen in der Lage sind, sich in Kardiomyozyten zu entwickeln.<sup>34-36</sup>

Embryonale Stammzellen verfügen über eine hohe Telomeraseaktivität und sind daher in der Lage sich unbegrenzt zu teilen.<sup>23, 37</sup> Es besteht somit potentiell die Gefahr der Neoplasmenformation durch embryonale Stammzellen nach Transplantation.<sup>38, 39</sup>

Ein weiteres mögliches klinisches Problem stellt die Abstoßungsreaktion des



Empfängerorganismus gegenüber den allogenen embryonale Stammzellen dar. Humane embryonale Stammzellen exprimieren in bedeutendem Maße MHC-I-Komplexe, wohingegen MHC-II-Komplexe kaum exprimiert werden. Eine immunsuppressive Therapie wäre damit wahrscheinlich erforderlich.<sup>40</sup>

Die Isolierung von humanen embryonalen Stammzellen zu Forschungszwecken wirft ethische Bedenken auf.<sup>41, 42</sup> Es existieren derzeit sehr unterschiedliche Ansichten bezüglich Gewinnung und Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen.

### ***1.2.2 Adulte Stammzellen***

Es konnte gezeigt werden, dass adulte Stammzellen in verschiedenen Geweben und Organen des Körpers persistieren und man in der Lage ist, diese Zellen zu isolieren.<sup>43</sup>

Das multilineare Potential von adulten Stammzellen wird seit Jahren untersucht. Das größte Interesse lag bisher auf den humanen Knochenmarksstammzellen.<sup>44, 45</sup> Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks stellen eine heterogene adulte Stammzellpopulation mit breitem Spektrum an Differenzierungspotential dar.<sup>46</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmarkstroma und Fettgewebe in der Lage sind, in Gewebe wie Knochen, Knorpel, Bindegewebe, Fett und Muskel zu transdifferenzieren.<sup>47-49</sup> Dafür waren teilweise Zusätze zum Kulturmedium notwendig.<sup>48, 50</sup> Neben dem Potential Struktur- und Stützgewebe zu ersetzen, gibt es Hinweise, dass adulte Stammzellen sich auch in Herzmuskelzellen entwickeln können.<sup>51, 52</sup> Letzteres stellt möglicherweise eine neue Option für die Therapie von Myokardinfarkten dar.

Orlic et al. beschrieben die Bedeutung von Knochenmarkstammzellen in der Therapie von Myokardinfarkten am Mausmodell.<sup>53</sup> In mehreren Myokardinfarktstudien wurden adulte Stammzellen entweder via Ballonkatheter intrakoronar, retrograd über das venöse System, durch intramuskuläre Injektion oder durch Anbringung von einem mit Stammzellen beladenen Pflasters auf das Epikard im Bereich des Myokardinfarkts appliziert.<sup>19, 54-56</sup> Es konnte gezeigt werden, dass eine Migration der Stammzellen in das umgebende Gewebe stattfindet, eine Voraussetzung für den therapeutischen Effekt. Resultat der Experimente war eine signifikant bessere Ventrikelfunktion in der Verumgruppe.<sup>18, 57</sup>

Die positiven Ergebnisse der Studien basieren zum Teil auf einer vermehrten Revaskularisierung mit direkter, struktureller Beteiligung der Stammzellen in der

Grenzzone zwischen Infarkt und vitalem Myokard. Des Weiteren werden parakrine antiapoptotische, proangiogene und mitotische Effekte, welche die Regeneration fördern, diskutiert.<sup>21, 22, 29, 58-60</sup>

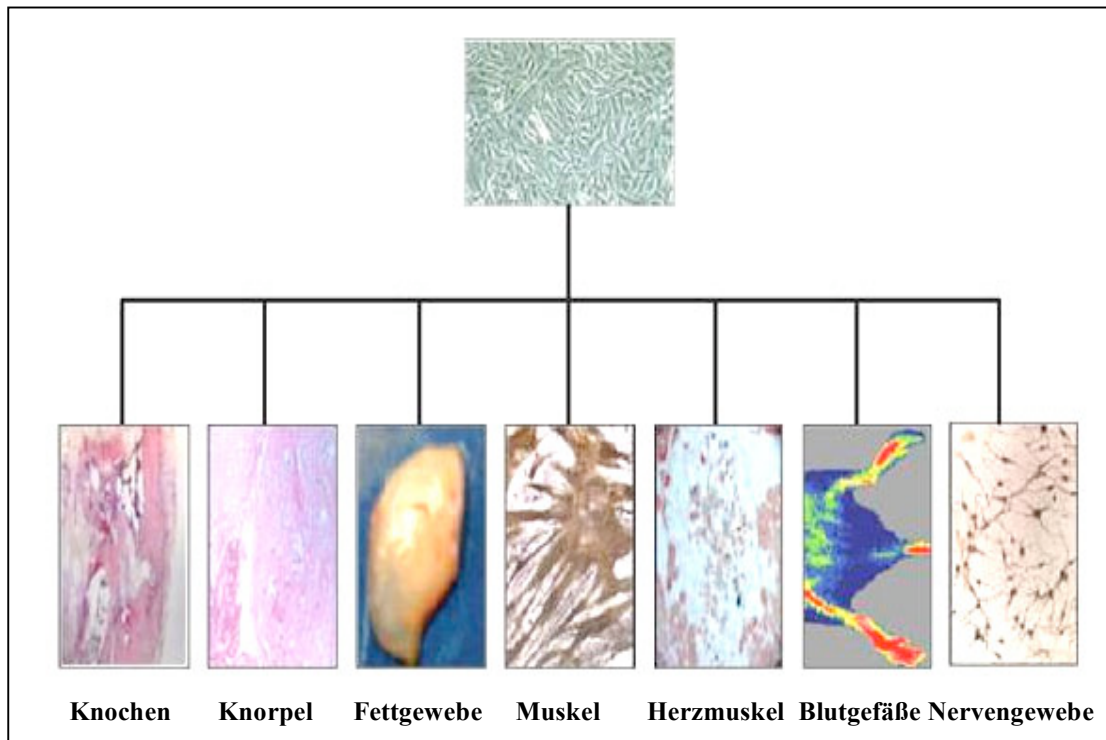
Neben hämatopoetischen und mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (HSCs und MSCs), endothelialen Progenitorzellen (EPCs), skelettalen Myoblasten (SMBs) sowie organständigen Stammzellen, werden Stammzellen aus humanem Fettgewebe (Adipose Tissue Derived Stem Cells - ADSCs) mittlerweile auf eine klinische Anwendung hin untersucht.

### ***1.2.2.1 Adipose Tissue Derived Stem Cells (ADSCs)***

Das subkutane Fettgewebe stellt eine Quelle für adulte Stammzellen dar. Diese können entweder durch Exzision oder durch chirurgische Aspiration gewonnen werden. Nach enzymatischer Verdauung des Gewebes erhält man eine Fraktion adhärerender, fibroblastenartiger Zellen. Diese Zellen weisen ein multilineares Potential auf.<sup>50, 61-63</sup>

Das Oberflächenprofil der ADSCs ähnelt dem der MSCs.<sup>64-66</sup> Die CD-Moleküle CD105 und CD166 (ALCAM), Marker zur Identifizierung von multipotenten Zellen sind wie in den MSCs regelmäßig exprimiert.<sup>67-72</sup> Der Stammzellfaktor-Rezeptor (c-kit/CD117) wird hingegen weder in MSCs noch in ADSCs gefunden.<sup>73</sup> ADSCs exprimieren keine der bekannten hämatopoetischen und endothelialen Marker wie CD3, CD4, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31, CD33, CD38, CD56, CD62, CD104 und CD144.<sup>64-66, 68, 73-75</sup> ADSCs erfüllen die Minimalvoraussetzungen für humane mesenchymale Stammzellen, die vom Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy vorgegeben wurden. Zu den vier Kriterien zählen Plastikadhärenz *in vitro*, Multilinearität, Expression von CD73, CD90 und CD105 sowie die fehlende Expression der hämatopoetischen Marker c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 $\alpha$  sowie HLA-DR.<sup>75</sup> ADSCs exprimieren kaum HLA-DR Moleküle.<sup>73, 76</sup> Diese Eigenschaft macht sie zu möglichen Kandidaten auch für eine allogene Transplantation.

Tierische ADSCs und MSCs besitzen die Fähigkeit *in vitro* in kardiomyozytäre Zellen zu transdifferenzieren.<sup>52, 74, 77, 78</sup> *In vitro* Experimente zeigten, dass isolierte Stammzellen aus dem Fettgewebe von Mäusen, in semi-solidem Medium kultiviert, nach drei Wochen Kolonien von spontan kontrahierenden Zellen bildeten.<sup>51</sup>



**Abbildung 1: Differenzierungspotential von humanen ADSCs.**

Humane ADSCs können auch in nichtmesenchymale Gewebe wie Nervengewebe differenziert werden. Modifiziert nach Strem et al.<sup>74</sup>

In einer Studie wurden ADSCs in infarziertes, murines Myokard injiziert. Die anschließende immunohistochemische Analyse zeigte, dass die Donorzellen in das umgebende Myokard migrierten und kardiomyozytäre Marker wie Nkx2.5, Troponin I und Myosin Heavy Chain (MHC) exprimierten. Hingegen wurde keine CD31-, CD45- oder MyoD-Expression festgestellt.<sup>79</sup>

Stammzellen ändern *in vitro* ihren Phänotyp, was die Suche nach den Kandidatenzellen erschwert. Für die ideale Stammzelltherapie wäre es wünschenswert, eine Stammzellfraktion zu applizieren, deren Potential über die Induktion einer lokalen Angiogenese hinausgeht. Ein struktureller und funktioneller Ersatz von untergegangenem Myokard würde den optimalen Therapieerfolg darstellen.

Damit derartige Kandidatenzellen frühzeitig erkannt und effektiv selektiert werden könnten, wäre ein Indikator notwendig, der signalisiert, wann eine Zelle eine kardiomyozytäre Transdifferenzierung durchläuft. Dies hätte den Vorteil, dass die Zellen nach ihrer intrinsischen Transdifferenzierungskapazität isoliert würden und nicht zum Beispiel CD-Epitoprofile als Selektionskriterium benutzt werden müssten.

Eine Möglichkeit zur Detektion von spezifischen Zellpopulationen liefert die Gentherapie mit der Reportergentechnologie. Durch die Kombination von gewebsspezifischen Promotoren mit Fluoreszenzreportergenen werden spezifisch Zellen markiert und können auf verschiedene Weise identifiziert werden. Das Maß an gemessener Fluoreszenz korreliert dabei mit der intrinsischen Genexpression.

### **1.3 Gentherapie**

In der Gentherapie werden seit Jahren diverse Virusgattungen, unter anderem Adenoviren und Lentiviren, als Vehikel zum Gentransfer *in vitro* und *in vivo* eingesetzt.<sup>80, 81</sup> Die Grundidee des Gentransfers ist der Transport von Nukleinsäuresequenzen in Zielzellen. Diese Nukleinsäuresequenz kodiert meist ein Protein, das dann von den Zielzellen synthetisiert wird.<sup>82, 83</sup> Das Protein kann daraufhin im Wirt verschiedene diagnostische oder therapeutische Funktionen erfüllen.

#### **1.3.1 Lentiviren**

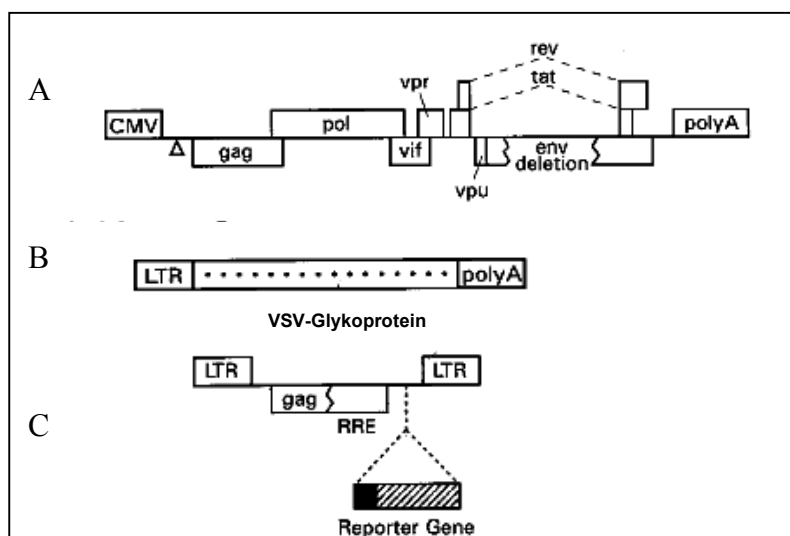
Lentiviren sind RNA-Viren und gehören zur Gruppe der Retroviren. Bei rekombinanten Retroviren wurden Abschnitte in der *gag*, *pol* oder *env* Region, Abschnitte in denen viruseigene Gene kodiert werden, entfernt, sodass diese Viren sich nicht replizieren können.<sup>84</sup> Gleichzeitig wurde aufgrund der Verkleinerung des Genoms die Immunogenität der Viren verringert.

Das Virus dringt, vermittelt über eigene Rezeptorproteine wie gp120 und gp41, nach Interaktion mit dem Wirtszellrezeptor (z. Bsp.: T-Helferzellrezeptor CD4) in die Wirtszelle ein. Im Zytosol erfolgt die Transkription der Virus-RNA in Provirus-DNA, vermittelt durch das virale Enzym reverse Transkriptase. Diese Provirus-DNA wird durch das ebenfalls viral kodierte Enzym Integrase in das Wirtsgenom eingebaut. Die Integration des Virusgenoms birgt die Gefahr von Mutationen falls es durch den Einbau der Provirus-DNA zu einer Deaktivierung eines Tumorsuppressorgens oder Aktivierung eines Protoonkogens kommt. Vorteile des Gentransfers mittels Lentiviren sind die stabile Integration und damit die dauerhafte Expression des applizierten Gens. Die geringe Immunogenität der Lentiviren im Vergleich zu den Adenoviren ist ein weiterer Vorteil für den *in vivo* Einsatz von Lentiviren.<sup>85</sup> Im Jahr 1997 gelang der

Gentransfer mittels eines HIV-1 basierten Lentivirus in der Retina der Ratte, im Jahre 1998 der Transfer im Gehirn, Muskel und in der Leber. Dabei konnte gezeigt werden, dass über einen Zeitraum von mindestens zwölf Wochen eine konstante Expression des transferierten Gens bestand.<sup>86, 87</sup> Lentiviraler Gentransfer eignet sich demnach für eine langfristige Integration von Genen in das Wirtsgenom. Bis heute konnte eine Vielzahl von Geweben infiziert werden. Lentiviren stellen daher eine sehr gute Option zum experimentellen Gentransfer dar.

### 1.3.2 Reportergentechnologie auf Basis eines lentiviralen Vektors

Die Reportergentechnologie bietet eine Vielfalt von Einsatzmöglichkeiten. Ein Ansatz ist die Infektion von Zellen vor experimentellen Transplantationen. Diese können mittels Gentransfer markiert und anschließend im Wirtsorganismus detektiert werden.



**Abbildung 2: Die drei Plasmidkomponenten des verwendeten HIV-1 Vektorsystems.**

A) Helferplasmid: Das Dreieck symbolisiert eine 33bp Deletion, im Bereich zwischen 5'-splice donor Sequenz und dem Beginn der gag-Sequenz, die das Packsignal betrifft. Die Kästen mit gezackten Linien zeigen Abschnitte mit partiellen Deletionen. B) VSV-G Vektor (*Envelope*). C) Vehikelplasmid (*plasmid of interest*): Vektor mit gag-Region und RRE-Kassette proximal des Reportergens. Modifiziert nach Mochizuki et al.<sup>91</sup>

Zugleich kann die Technologie genutzt werden, um die intrinsische Genexpression von Zellen zu überprüfen oder gezielt die Expression bestimmter Gene in Zellen zu regulieren. Auf Basis dessen können einzelne Zellfraktionen isoliert und weiter analysiert werden. Unter welchen Bedingungen die Expression eines integrierten

Gens initiiert wird, hängt entscheidend von dem gentechnisch veränderten Genom des Lentivirus ab. Reiser et al. beschrieben die Gliederung eines rekombinanten HIV-1-Genoms in drei Plasmide, die getrennt voneinander genetisch verändert werden konnten. Zwei der drei Plasmide kodierten spezifische, viruseigene Proteine, das dritte Plasmid (*plasmid of interest*) kann als Vehikel für den Gentransfer (*gene of interest*) genutzt werden.<sup>88-90</sup>

Die in das Wirtsgenom integrierte DNA wird wie die zelleigene DNA transkribiert. Abhängig vom Promoter erfolgt die Transkription des Zielgens zell- oder gewebsspezifisch. Anhand der unterschiedlichen Genexpression können heterogene Zellpopulationen gemäß der selektiven Reporterexpression in weitere phänotypische Fraktionen gegliedert und Subpopulationen isoliert werden.

#### ***1.4 Kombination von Stammzell- und Reportergentechnologie***

Für die Identifizierung der optimalen Stammzellpopulation zur zellbasierten Myokardtherapie stellt die Reportergentechnologie eine hilfreiche Methode dar. Der Einsatz von lentiviralen Konstrukten, die spezifisch Zellen markieren, die einen kardiomyozytären Phänotypus besitzen, stellt einen Ansatz zur Identifikation geeigneter Stammzellen dar. Die parallele Verwendung von zwei lentiviralen Konstrukten mit komplementärer Promoter- und Markerproteinkombination könnte zusätzlich die Spezifität der Ergebnisse erhöhen. Als herzspezifische Proteine kommen unter anderem Transkriptionsfaktoren und Bestandteile des Sarkomers in Frage. Gängige fluoreszierende Markerproteine sind das enhanced green fluorescent protein (eGFP) sowie als roter Fluoreszenzfarbstoff DsRed2.

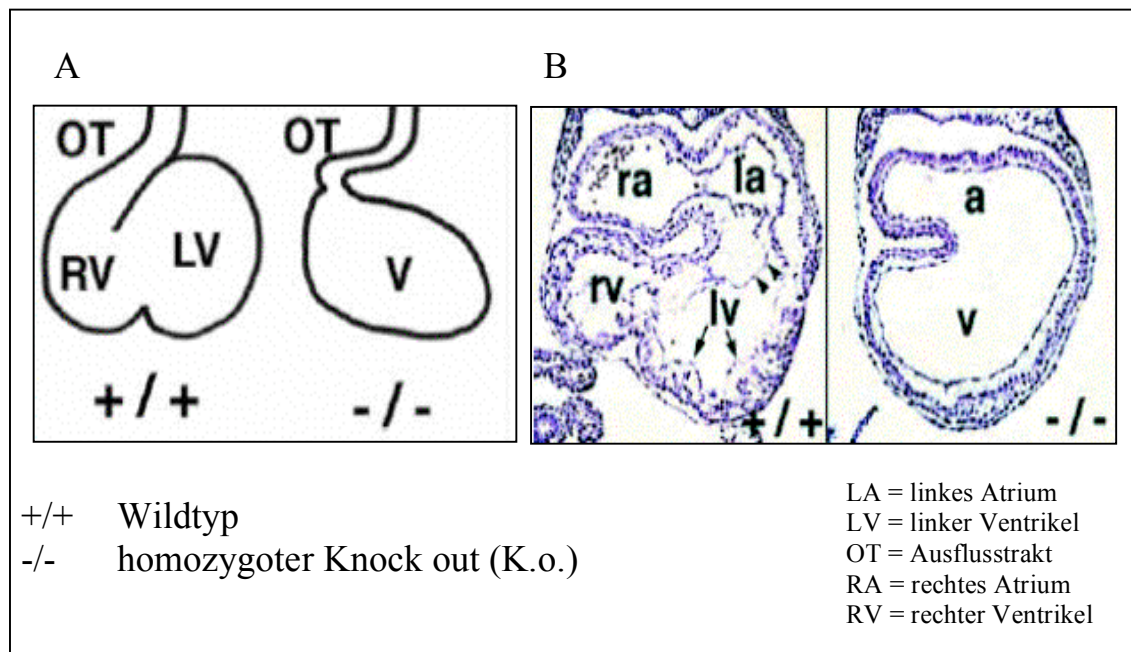
##### ***1.4.1 Homeoboxgen und Transkriptionsfaktor Nkx2.5***

Das Homeoboxgen Nkx2.5 (Synonym Csx) ist ein Vertreter der NK2-Klasse Homeoproteine und ein Analogon zum tinman-Gen der *Drosophila melanogaster*.<sup>92, 93</sup> Es kodiert einen Transkriptionsfaktor und frühen Marker kardialer Entwicklung. Nkx2.5 ist in Mausembryos ab dem achten Tag im präkardialen Mesoderm sowie im benachbarten Entoderm des Pharynx nachweisbar.<sup>94, 95</sup> Die Präsenz von Nkx2.5 ist essentiell für normale Ausreifung des embryonalen Herzens. Nkx2.5 ist insbesondere

bedeutend für die Bildung der Herzschleife und des Erregungsleitungssystems jedoch nicht für die Ausdifferenzierung der Herzzelllinien selbst.<sup>95-98</sup>

Homozygote Nkx2.5-Knockoutmausembryos starben noch vor Beendigung der Herzformation. Zudem wurde die Expression von ANF, BNF, MLC-2v, N-myc und MEF-2 herunterreguliert.<sup>99, 100</sup> Nkx2.5 ist auch für die Aufrechterhaltung des Phänotyps des adulten Herzen mitverantwortlich. Im adulten Herzen der Ratte ist ANF weiterhin ein Zielgen von Nkx2.5.<sup>97, 101, 102</sup>

Die hohe Gewebsspezifität von Nkx2.5 macht es zu einem passenden Gen für die Detektion kardiomyozytärer Zellen. Eine Kombination mit einem Reporter gen würde einen Vektor ergeben, der nach Integration in das Genom der Wirtszelle eine Nkx2.5-Expression der Zelle mit einem Fluoreszenzsignal anzeigt.



**Abbildung 3: Effekt von Nkx2.5 auf die Herzformierung.**

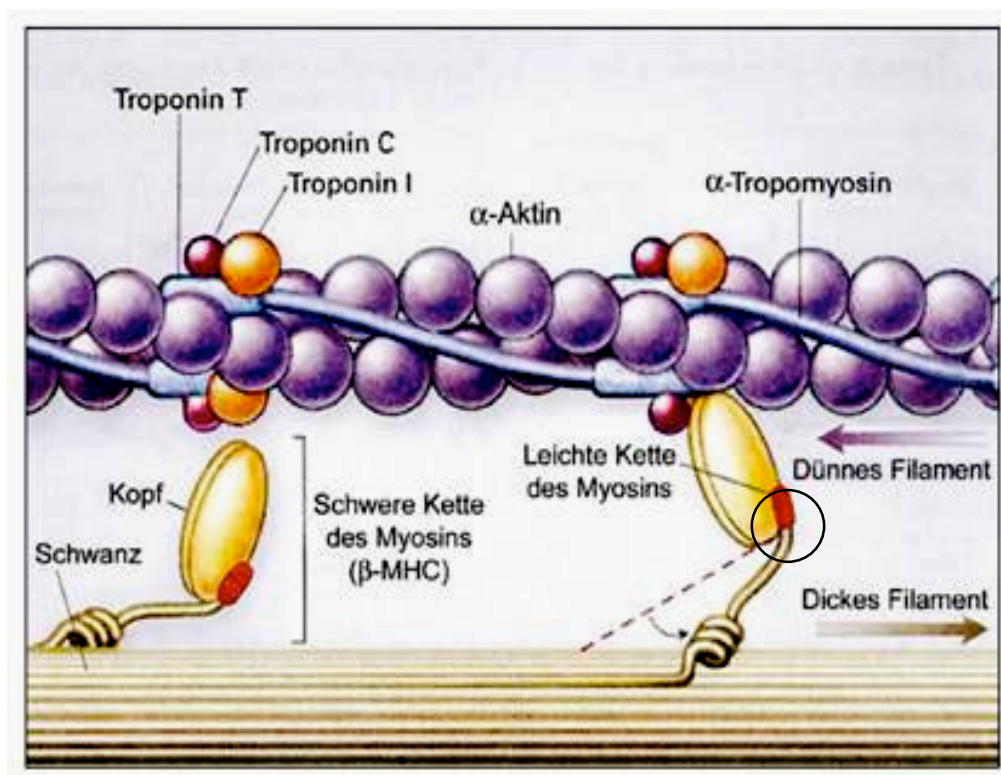
Nkx2.5-K.o. hat einen inhibitorischen Effekt auf die Herzschleifenformierung in Mausembryos: Normal im Wildtyp (+/+); keine Ventrikelseparierung im K.o. (-/-) Histologische Analyse embryonaler Mausherzen: Vollständige Gliederung des Herzens in Atria (LA, RA) und Ventrikel (LV, RV) im Wildtyp; minimale Unterteilung in Atrium und Ventrikel im K.o. Modifiziert nach Tanaka et al.<sup>100</sup>

### 1.4.2 MLC-2v (Myosin-Leichtkette - ventrikulärer Isotyp 2)

MLC-2v ist wesentlicher Bestandteil des Sarkomers. Die leichte Myosin-Kette 2 (MLC-2) ist eine essentielle Komponente der Myosin-Moleküle mit regulierender Funktion bei der Bindung von Calcium. Nach dem Calcium gebunden hat, kommt es

zur Aktivierung der schweren  $\beta$ -Myosinkettenuntereinheit ( $\beta$ -Myosin Heavy Chain –  $\beta$ -MHC). Durch eine reversible Konformationsänderung im Halsbereich der  $\beta$ -MHC-Untereinheit findet die Kraftübertragung und die damit verbundene Verschiebung der Filamente statt. Im transgenen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von MLC-2v die Rate der Kontraktionszyklen in atrialen Kardiomyozyten erhöht.

Dies könnte eine Erklärung für die größere Kraftgeneration im Ventrikel im Vergleich zum Atrium sein.<sup>104</sup> Die Isoform MLC-2v wird vor allem im Ventrikel und nur in geringerem Maße in Atrium und dem Ausflusstrakt exprimiert.<sup>105</sup> MLC-2v ist in seiner Expression abhängig von der Präsenz von Nkx2.5 und stellt einen der ersten Marker für eine ventrikuläre Differenzierung dar.<sup>106</sup> Aufgrund der eben genannten Eigenschaften stellt MLC-2v eine weitere Option für die Reportergentechnologie zur Detektion von kardiomyozytären Zellen dar.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Komponenten eines Sarkomers.** Hervorgehoben (Kreis) ist die Lokalisation der Myosin leichten Kette. Modifiziert nach Seidman und Seidman.<sup>103</sup>



## 2. Zielsetzung

Adipose Tissue Derived Stem Cells (ADSCs) stellen eine neue Population von adulten Stammzellen dar. Es wurde beschrieben, dass ADSC über eine multilineare Differenzierungskapazität verfügen. Am Mausmodell konnte die spontane Differenzierung von Fettgewebsstromazellen in schlagende Herzmuskelzellen beobachtet werden. Bisher gelang jedoch noch keine Isolierung und Expansion eines entsprechenden humanen Phänotyps.

In der hier vorliegenden Dissertation wurde der Frage nachgegangen, ob in der heterogenen Population der humanen ADSCs eine Fraktion von Zellen existiert, welche die Fähigkeit besitzt, sich in kardiomyozytäre Zellen zu differenzieren. Die Grundlage dafür war die Konstruktion zweier Lentiviren mit denen man in der Lage ist, heterogene Zellpopulationen *in vitro* zu infizieren und daraufhin kardiomyozytäre Fraktionen mittels eines Durchflußzytometers maschinell aufzutrennen. Die anschließende Expansion und Analyse der isolierten Zellpopulationen sollte Informationen über die jeweiligen Phänotypen liefern.

Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit adressiert:

1. Ist es möglich durch den Einsatz von zwei lentiviralen Konstrukten eine Fraktion von potentiellen kardiomyozytären Zellen aus dem humanen subkutanen Fettgewebe zu gewinnen?
2. Welche Eigenschaften adulter Kardiomyozyten besitzen die isolierten Zellfraktionen?
3. Können die isolierten Zellen *in vitro* expandiert werden, ohne dabei den kardiomyozytären Phänotyp zu verlieren?

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Viruskonstruktion

Das Genom des HIV-1 basierten Lentivirus besteht aus drei Plasmiden; dem genetisch veränderten Plasmid (*plasmid of interest*) einem Helferplasmid (*package plasmid*), welches Enzyme wie die Integrase kodiert und einem Hüllplasmid, welches das VSV-G Glykoprotein kodiert.<sup>89</sup> Letztere wurden unverändert verwendet. Das dritte Plasmid (pCMV-eGFP/pCMV-DsRed2) enthielt einen humanen Cytomegalieviruspromotor (pCMV) und ein daran gekoppeltes Reportergen (eGFP oder DsRed2). Zusätzlich kodierte es ein Ampicillinresistenzgen. Das Plasmid hatte eine Größe von 9,6kbp und enthielt das *cis*-aktivierende Woodchuck-hepatitis-virus post-transcriptional Regulatory Element (WPRE), welches als Verstärker für die transgene Expression in den Wirtszellen fungiert.<sup>107</sup> Im Bereich der Long Terminal Repeat Region (LTR), in der Regulationsgene für die Transkription liegen, wurde die U3 Region (dU3) entfernt, um die Replikationsfähigkeit des Virus aufzuheben.

Aus den vorliegenden Plasmiden pMLC-2v-SVOA, pNkx2.5-LacZ, pCMV-eGFP und pCMV-DsRed2 wurden folgende konstruiert:

- pNkx2.5-eGFP
- pMLC-2v-DsRed2

Dafür mussten schrittweise die genannten Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen gespalten und die Promoterfragmente mittels Gelelektrophorese vom restlichen Vektor getrennt werden. Dem schlossen sich Extraktions- und Aufreinigungsschritte als Vorbereitung auf die Ligation der Plasmide an. Mit dem Ligationsansatz wurden ultrakompetente E.coli-Stämme (XL-1 Blue oder XL-10 Gold, Stratagene, La Jolla, CA, USA) transfiziert, welche das Ligationsprodukt replizierten. Ausgestrichen auf einer LB Agar Nährbodenplatte (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf Kolonien untersucht. Entstandene Bakterienkolonien wurden zur weiteren Expansion in LB Broth Nährlösung (Sigma-Aldrich) überführt. Nach einem weiteren Tag der Inkubation wurden die Bakterien lysiert, die Plasmid-DNA isoliert, durch Restriktionsendonukleasen gespalten und durch eine Gelelektrophorese analysiert. Beim Vorliegen des gesuchten Klons wurde eine weitere Kultur angelegt mit dem Ziel etwa 200–500µg Plasmid-DNA zu

gewinnen, welche für die nachfolgenden Schritte der Virusherstellung notwendig waren. Des Weiteren werden die einzelnen Schritte der Virusproduktion und der *in vitro* Untersuchungen chronologisch dargelegt.

### 3.1.1 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Von der Probelösung wurden 2,2µl in 217,8µl molekularbiologischem Wasser (Sigma-Aldrich) in einem 0,5ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf, Westbury, NY, USA) verdünnt. Für die Doppelbestimmungen wurden jeweils 100µl der verdünnten Probe auf eine 96-Lochplatte von BD Falcon™ (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) gegeben. Als Nullwert wurde molekularbiologisches Wasser verwendet. Die Messungen wurden mit einem µQuant 96-Lochplatten-Auslesegerät (BIO-TEK Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) bei 230, 260, 280 und 330 nm Wellenlänge durchgeführt. Als Software wurde das KC4™-Programm (BIO-TEK Instruments, Inc.) benutzt.

### 3.1.2 Plasmidspaltung

Für eine Plasmidspaltung wurden 0,5µl des Restriktionsenzym mit dem optimalen Reaktionspuffer zusammengebracht. Dabei wurde darauf geachtet, das Endvolumen so gering wie möglich zu halten, um die Reaktionseffizienz zu erhöhen.

Enzym	Schnittstelle	Puffer	BSA	Units für 1µg DNA/16h	Hersteller
AgeI	A/CCGGT	1	nein	1	New England Biolabs®
EcoRV	GAT/ATC	3	ja	0,5	New England Biolabs®
HindIII	A/AGCTT	2	nein	0,13	New England Biolabs®
HpaI	GTT/AAC	4	nein	0,25	New England Biolabs®
NheI	G/CTAGC	2	ja	0,25	New England Biolabs®
NotI	GC/GGCCGC	3	ja	0,25	New England Biolabs®
XbaI	T/CTAGA	2	ja	0,13	New England Biolabs®
XhoI	C/TCGAG	2	ja	0,13	Invitrogen®

**Abbildung 5: Verwendete Restriktionsenzyme zur Klonierung der eingesetzten Plasmide.**

Angabe von Schnittstellen, bevorzugter Reaktionspuffer, Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) im Reaktionsansatz und benötigte Units zur Spaltung von 1µg DNA pro 16h.

Der Ansatz wurde bei 37°C für die berechnete Dauer in einem Thermocycler (Eppendorf) inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse mittels Gelelektrophorese. Es wurden in Abhängigkeit der Anzahl und Größe der Plasmidfragmente zwischen 0,25-0,5µg Plasmid-DNA aufgetragen.

### ***3.1.3 T4 DNA-Polymerase Reaktion***

Für die Generierung von 3'-blunt Enden durch Auffüllung von 3'-Endüberhängen wurde die DNA in einfachem T4 DNA Polymerase Reaktionspuffer in der Gegenwart von 100µM dNTPs aufgelöst. Es wurde eine Einheit T4 DNA Polymerase pro Mikrogramm DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei 12°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Titrierung von EDTA bis zu einer Konzentration von 10µMol und einem 20minütigen Inkubationsschritt bei 75°C gestoppt.

### ***3.1.4 Agarosegelelektrophorese***

Vorbereitend wurden Stocklösungen von 50x TAE- oder zehnfachem TBE-Puffer angesetzt. Ein Liter Gesamtvolumen des 50x TAE-Puffers setzte sich aus 242g Tris-Base (890mM), 57,1ml Eisessig, 37,2g Na<sub>2</sub>EDTA2H<sub>2</sub>O und molekularbiologischem Wasser zusammen. Für den 10x TBE-Puffer wurden 108g Tris-Base (890mM), 55g Borsäure (890mM), 40ml 0,5M EDTA (pH=8,0) mit molekularbiologischem Wasser auf einen Liter gebracht. Der pH-Wert der Puffer wurde anschließend mittels 1N HCl und 2N NaOH eingestellt. Als pH-Meter diente das Accumet<sup>®</sup> Model 15 (Fisher Scientific International Inc.). Alle gelisteten Chemikalien wurden von Fisher (Fisher Scientific International Inc.) bezogen.

Für die Herstellung des Agarosegels wurde die Stocklösung (TAE-/TBE-Puffer) auf die einfache Konzentration verdünnt. Pro Gel wurden je nach Größe zwischen 15 bis 200ml an einfachem TAE- oder TBE-Puffer benötigt und dafür in einen Erlenmeyerkolben überführt. Dem Puffer wurde, abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, 0,8–1,5% Ultra Pure<sup>™</sup> Agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) beigemischt. Daraufhin wurde der Ansatz kurz geschwenkt und in einer Mikrowelle solange erhitzt bis die Lösung klar wurde. Pro 100ml Agarose wurden 3µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) (Invitrogen Corporation) zur DNA-Markierung zugegeben. Die flüssige Agarose wurde mittels

25ml Spacesaver™ Pipetten (BD Biosciences) in die Gelform gegossen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur zum Polymerisieren stehengelassen.

### ***3.1.5 Probenaufbereitung und Gellauf***

Für analytische Gele wurden 0,25–0,5µg an Proben-DNA aufgetragen, für Trenngele bis zu 10µg DNA. Die besagte Menge DNA wurde mit zehnfachem Blue Juice™ Gel Lade Puffer (Invitrogen Corporation) versetzt und danach mit molekularbiologischem Wasser auf ein Volumen von 15-25µl für analytische und 80-120µl für präparative Gele gebracht. Je nach Größe des Gel wurden als Elektrophoresekammern die Joule Box™ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) oder Elektrophoresekammern von Fisher Scientific mit dem Netzteil Modell 1000/500 von Bio Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Die angelegte Spannung für kleine Gele (15ml) betrug 100V bei einer Laufzeit von 25-30 Minuten. Bei großen Gelen (200ml) wurde eine Spannung von 200V bei einer Gellaufzeit von 60 bis 150 Minuten angelegt. Zum Nachfärben wurden die Gele für fünf bis zehn Minuten in einfachem TAE-/TBE-Puffer zusammen mit 5-15µl Ethidiumbromidlösung gegeben und bei 60U/min auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und neuer einfacher TAE-/TBE-Puffer hinzugegeben, um das überschüssige Ethidiumbromid auszuwaschen. Nach weiteren fünf bis zehn Minuten auf dem Schüttler wurde von dem Gel ein Foto angefertigt. Als Software diente AlphaImager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA).

### ***3.1.6 DNA-Extraktion aus Agarosegelen***

Die verwendeten Reagenzien entstammten dem Qiagen Mini Elute™ Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). Die Bande wurde mittels eines Skalpell aus dem Gel geschnitten, in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) überführt und auf einer Feinwaage (Accu-124, Fisher Scientific International Inc.) gewogen. Es wurde das dreifache Volumen des Gelfragments (100mg~100µl) an Puffer QG hinzugegeben. Das Röhrchen wurde für zehn Minuten bei 50°C unter gelegentlichem Vortexen inkubiert bis das Gelfragment komplett gelöst war. Daraufhin wurde das einfache Volumen des Gelfragments an Isopropanol (Sigma-Aldrich) addiert, der Ansatz geschüttelt, in eine QIAquick® Spin Säule überführt und

für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen. Zum Entfernen eventueller Agarosereste wurden 500µl QG Puffer zur Säule hinzugegeben und diese dann für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Zum Waschen der Säule wurden 750µl Puffer PE addiert und dann bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen, um anschließend die Säule bei gleichen Bedingungen erneut zu zentrifugieren. Die Säule wurde in ein neues 1,5ml Zentrifugenröhrchen platziert. Zur Eluierung der DNA wurden 30µl Puffer EB auf das Zentrum der QIAquick® Membran pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule erneut bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Dieser Prozedur schlossen sich eine DNA-Konzentrationsbestimmung und eine analytische Gelelektrophorese an.

### ***3.1.7 DNA-Aufreinigung***

Zur Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen wurde das Qiagen QIAquick® PCR Purifikationskit (Qiagen Inc.) verwendet. Zur DNA-Probe wurde das fünffache Volumen an Puffer PB hinzugegeben. Der Ansatz wurde in eine QIAquick® Spin Säule überführt und für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Danach wurden 500µl Bindungspuffer PB hinzugegeben und die Säule für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Der Durchsatz wurde entfernt. Es folgte ein Waschschriff, bei dem 800µl Puffer PE addiert und anschließend die Säule bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert wurde. Der Durchsatz wurde verworfen und die Säule erneut für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert, um Reste des Puffers PE zu entfernen. Zur Eluierung wurde die Säule in ein neues 1,5ml Zentrifugenröhrchen platziert und 50µl Elutionspuffer EB auf die Membran der Säule pipettiert. Säule und Zentrifugenröhrchen wurden erneut bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Vom erhaltenen Eluat wurden 2,2µl für die DNA-Konzentrationsbestimmung verwendet. Die DNA-Proben wurden bei -20°C gelagert.

### ***3.1.8 Herstellung von Agarplatten***

Zwanzig Gramm LB Agar (Sigma-Aldrich) wurden in 500ml hochreinem Wasser aufgelöst und danach zum Autoklavieren für 45 Minuten auf 120°C erhitzt. Nachdem der flüssige Agar auf 40°C abgekühlt war, wurde unter sterilen Bedingungen

Ampicillin (50mg/ml) hinzugeben und der Ansatz sorgfältig gemischt. Anschließend wurden jeweils 10ml des Agars in eine sterile Nunc<sup>®</sup> Petrischale (Nalge, Nunc, Rochester, NY, USA) gegeben und unter sterilen Bedingungen polymerisieren gelassen. Die fertigen Platten wurden bei 4°C gelagert.

### ***3.1.9 Plasmidligation und Transformation von E.coli***

#### ***Bakterienstämmen***

In einem 1,5ml Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) wurden 50–150ng Vektor zusammen mit dem DNA-Insert (3–9facher molarer Überschuss), 10x T4 DNA-Ligase Puffer (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc.), 1µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc.) sowie molekularbiologischem Wasser (Sigma-Aldrich) auf ein finales Ansatzvolumen von 20µl gebracht. Verlangte es der Ligationsansatz wurde 1µl vorverdünnter, reaktionsspezifischer DNA-Adapter (eZclone Systems, New Orleans, LA, USA) hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Alternativ wurden Ligationen mittels des Quick Ligation<sup>™</sup> Kits (New England Biolabs<sup>®</sup> Inc.) durchgeführt. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurden Vektormengen von bis zu 200ng pro Reaktion verwendet sowie die Inkubationszeit von den empfohlenen fünf Minuten auf bis zu vier Stunden bei Raumtemperatur verlängert.

Für die Transformationen wurden 50–100µl E.coli Bakterienzellsuspension der Stämme XL-1 Blue oder XL-10 Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA) zunächst auf Eis aufgetaut und dann in ein gekühltes 14ml Falcon<sup>®</sup> Polypropylene Röhrchen (BD Biosciences) überführt. Es wurden 1,7µl β-Mercaptoethanol (231µmol/l) (Sigma-Aldrich) hinzu-pipettiert und bei gelegentlichem Schwenken für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde hinzupipettiert und der Ansatz für weitere 30 Minuten auf Eis gelagert. Beim folgenden Hitzeschockschritt wurde das Röhrchen für 45 Sekunden in 42°C warmes Wasser getaucht und anschließend für zwei Minuten auf Eis gekühlt. Daraufhin wurden 900µl S.O.C. Medium (Invitrogen) zugefügt und das Röhrchen dann für 90 Minuten bei 37°C und 250U/min in einen Schüttler (Sanyo-Gallenkamp, Loughborough, Großbritannien) gestellt. Es wurden 100–200µl der Zellsuspension auf Agarplatten, welche als Selektionsfaktor Ampicillin (50mg/ml) enthielten, mittels eines feuersterilisierten Hakens ausgestrichen und über Nacht bei

37°C invers in einen Inkubator gestellt. Parallel zu dem Versuch wurde eine Kontrolltransformation unter Verwendung des pUC19-Plasmids (Stratagene) durchgeführt.

### ***3.1.10 Expansion und Glycerolstocks der Bakterienkolonien***

Für eine weitere klonale Expansion der Bakterien, wurde mittels einer feuersterilisierten Öse vorsichtig die gewünschte Bakterienkolonie von der Agarplatte gestrichen und in ein 14ml Falcon® Polypropylene Röhrchen (BD Biosciences) überführt. Als Kulturmedium dienten 2ml autoklavierte LB Broth Lösung (Acros Organics B.V.B.A, Geel, Belgien) versetzt mit 50mg/ml Ampicillin. Der Ansatz wurde über Nacht auf einem Schüttler (Sanyo-Gallenkamp) bei 37°C und 250U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5ml Suspension für die Plasmidextraktion sowie 0,5ml für die Glycerolstocks abgenommen. Die verbliebene Suspension wurde bis zu einer Woche lang bei 4°C gelagert oder als Bakterienstocklösung eingefroren. Zum Einfrieren von Bakterienklonen wurde eine 60%ige Glycerollösung angesetzt und dann im Verhältnis von 1:1 mit der Bakteriensuspension gemischt. Abgefüllt in Nunc® Kryoröhrchen (Nalge) wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

### ***3.1.11 Plasmidextraktion (Miniprep)***

Zur Extraktion wurde das QIAGEN® Plasmid Mini Kit (Qiagen Inc.) verwendet. Das Protokoll des Herstellers wurde hierfür modifiziert. Von der über Nacht inkubierten Bakteriensuspension wurden 1,5ml in ein 1,5ml Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc., Hampton, NH) überführt und für 30 Sekunden bei 13.000U/min in einer Eppendorf 5415C Zentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 250µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250µl Lysispuffer P2 wurde das Zentrifugenröhrchen mehrfach geschüttelt und für vier Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Zum Stoppen der Reaktion wurden 350µl des Neutralisationspuffer N3 hinzupipettiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde sofort mehrfach geschüttelt, woraufhin sich ein weißes Präzipitat bildete. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 13.000U/min zentrifugiert. Es formte sich ein kompaktes, weißes Pellet. Der Überstand wurde in eine QIAprep® Spin Säule pipettiert, welche dann bei



13.000U/min für eine Minute zentrifugiert wurde. Der Durchsatz wurde verworfen. Das weitere Protokoll entspricht dem der DNA-Aufreinigung ab dem Schritt der Zugabe des Puffers PB. Der Extraktion schlossen sich eine Konzentrationsbestimmung, eine Kontrollspaltung und eine analytische Gelelektrophorese an.

### ***3.1.12 Plasmidextraktion (Maxiprep)***

Für die spätere Virusherstellung wurden 250µg DNA pro Plasmid benötigt. Damit diese Menge an Plasmid-DNA gewonnen werden konnte, wurden 200µl der oben beschriebenen Bakteriensuspension in 200ml LB Broth (Acros Organics B.V.B.A) mit 50mg/ml Ampicillin pipettiert. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37°C und 250U/min in einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Volumen auf vier 50ml Corning® Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) verteilt und für 15 Minuten bei 4°C und 3400U/min in einer Centra GP8R Zentrifuge (International Equipment Company, Chattanooga, TN, USA) zentrifugiert. Für die Extraktion wurde das Qiagen Endofree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc.) benutzt. Der Überstand wurde verworfen und die vier Pellets in 10ml Puffer P1 resuspendiert. Vor Beginn der Prozedur wurde RNase A zum Puffer P1 hinzugegeben. Zur Suspension wurden 10ml Lysispuffer P2 hinzugegeben, der Ansatz gründlich geschüttelt und bei Raumtemperatur für vier Minuten stengelassen. Zum Stoppen der Reaktion wurden 10ml auf Eis gekühlten Neutralisationspuffers P3 zum Ansatz gegeben, vermengt und daraufhin das gesamte Volumen in das QIAfilter® Cartridge überführt. Der Ansatz wurde bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in ein neues 50ml Corning® Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) filtriert. Zum Entfernen des verbliebenen Endotoxins wurden 2,5ml Puffer ER zum Lysat gegeben, das Röhrchen geschüttelt und für 30 Minuten auf Eis gelagert. Währenddessen wurde eine QIAGEN-tip® 500 Säule mittels 10ml Puffer QBT equilibriert. Der Ansatz wurde dann auf die Säule gegeben. Nachdem das Volumen durchgelaufen war, erfolgten zwei Waschschrirte wobei jeweils 30ml Puffer QC zur Säule hinzugegeben wurden. Zum Eluieren der DNA wurde die Säule in ein neues 50ml Corning® Zentrifugenröhrchen gestellt und 15ml Puffer QN addiert. Die DNA wurde mittels 10,5ml Isopropanol (Sigma-Aldrich) präzipitiert. Der Ansatz wurde dazu bei 3400U/min für 90 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

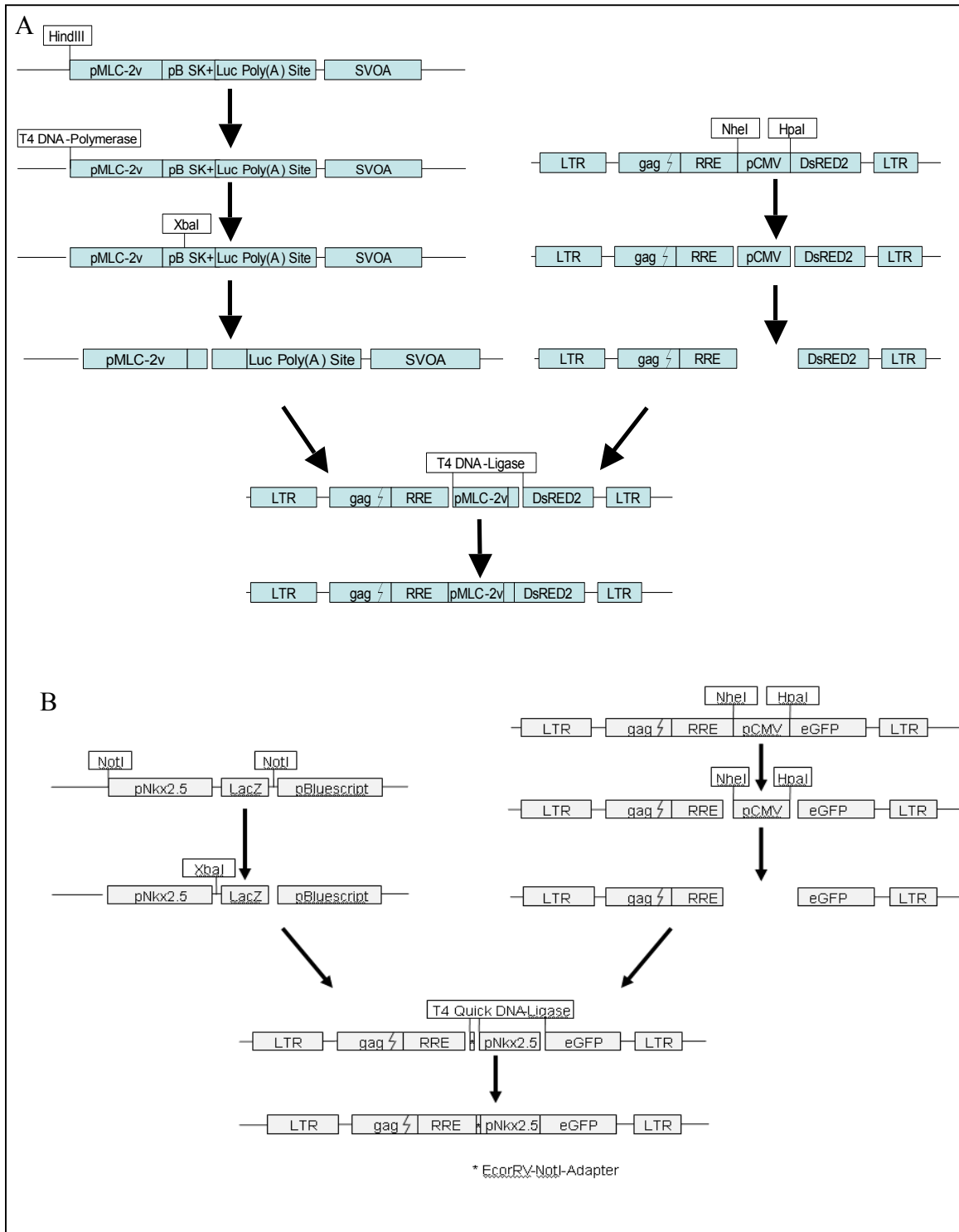
vorsichtig abgenommen und 5ml Endotoxin freies 70% Ethanol zum Pellet zugefügt. Das Pellet wurde dann erneut bei 3400U/min für 90 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen ohne dabei das Pellet zu stören. Das Pellet wurde für 10 Minuten an der Luft trocknen gelassen und daraufhin in 500µl Endotoxin freiem Puffer TE aufgelöst. Es wurde die DNA-Konzentration bestimmt und eine Kontrollspaltung mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

### ***3.1.13 Restriktionsstrategie***

Für die Restriktionsansätze wurden zwischen drei bis zehn Mikrogramm Plasmid-DNA verwendet. Das den Nkx2.5-Promoter enthaltende Plasmid (pNkx2.5-LacZ; pBluescript) wurde schrittweise mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI gespalten. Das zweite Plasmid, welches den MLC-2v-Promoter enthielt (pMLC-2v-SVOA), wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym HindIII zwischen der CMV-Promoterregion und dem eGFP-Gen gespalten. Danach wurde das 5'-Ende des pMLC-2v-SVOA-Plasmids in einem weiteren Schritt durch das Enzym T4 DNA-Polymerase (New England Biolabs®) zu einem Bluntend aufgefüllt. Mittels eines PCR Purifikationskits (Qiagen) wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt. Dem folgte der abschließende Spaltungsschritt mit dem Restriktionsenzym XbaI. Zur Kontrolle der Spaltungen und zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt.

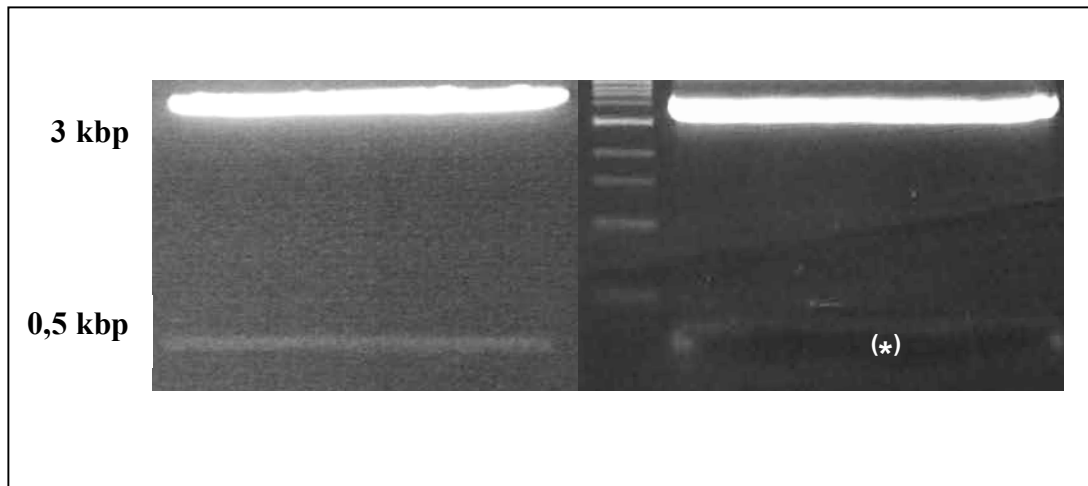
Die beiden Zielvektoren pCMV-eGFP und pCMV-DsRed2 wurden mit den Restriktionsenzymen NheI und HpaI gespalten. Anschließend wurde mittels Agarosegelelektrophorese das Gerüst des Plasmids vom Cytomegalieviruspromoter (pCMV) getrennt. Die oben genannte Promoter-DNA sowie der Vektor wurden mit einem Skalpell als Gelblock aus dem TBE-Agarosegel geschnitten, gewogen und danach unter Verwendung eines Gelextraktionskits (Qiagen) aufgereinigt.

Im Ligationsansatz wurde die Promoter-DNA mit dreifacher molarer Konzentration gegenüber der Vektor-DNA zusammengebracht. Bei der Ligation von Nkx2.5 und dem eGFP enthaltenden Vektor wurde zusätzlich ein EcorV-NotI-Adapter (eZ Clones, New Orleans, LA) verwendet.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Einzelschritte zur Klonierung der Vektoren.**

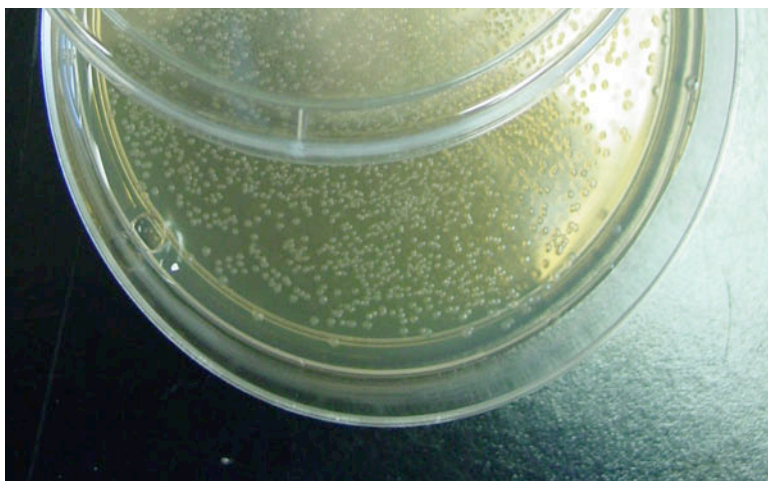
A) Klonierung des Vektors MLC-2v-DsRed2 auf Basis der Plasmide pMLC-2v-SVOA (linker Arm) und pCMV-DsRed2 (rechter Arm). B) Einzelschritte zur pNkx2.5-eGFP-Klonierung auf Basis der Plasmide pNkx2.5-LacZ (linker Arm) und pCMV-eGFP (rechter Arm).



**Abbildung 7: Auftrennung der Plasmid-DNA nach enzymatischer Spaltung.**

Links) Plasmid pMLC-2v-SVOA nach Spaltung mit HindIII und XbaI mit MLC-2v-Promoter (\*) und Plasmidgerüst (Bande bei 4 kbp). Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-Fragmente des Plasmids pMLC-2v-SVOA nach einer Spaltung mittels der Restriktionsendonukleasen HindIII und XbaI. Rechts) Nach Gelextraktion; die mit (\*) markierte Stelle entspricht der Höhe in der sich die pMLC-2v-DNA (257bp) nach einer Auftrennung befand.

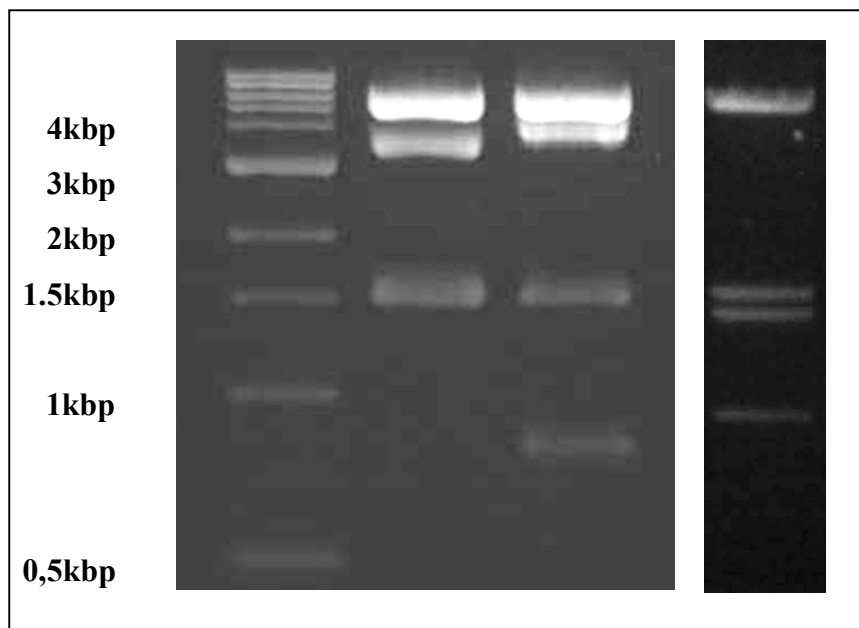
Anschließend wurde den Proben je 500ng Plasmid-DNA für die Gelelektrophorese entnommen. Die erhaltenen Bandenmuster stimmten mit den vorher berechneten Größen der einzelnen Fragmente überein. Auf Basis vorhandener Restriktionskarten für die Ausgangsplasmide wurden die Restriktionsendonukleasen ausgewählt, um ein charakteristisches Bandenmuster in der anschließenden Gelelektrophorese zu erzeugen.



**Abbildung 8: XL-10 E.coli transformiert mit pNkx2.5-eGFP und expandiert auf Agarplatten.**

Ein Mikroliter Plasmid-DNA-Lösung enthielt 10ng DNA; 50 µl E.coli Bakteriensuspension wurden nach Inkubation mit der Plasmidlösung mit einem feuersterilisierten Haken ausgestrichen. Die Agarplatten beinhalteten 50µg/µl Ampicillin-Antibiotikum im Agar (Fisher Scientific) als Selektionszusatz.

Das Plasmid pNkx2.5-eGFP wurde demnach zum einen mit den Enzymen HindIII und AgeI (1,5kbp; 1,5kbp; 3,7kbp; 5,8kbp) als auch parallel dazu mit HindIII und XhoI (0,7kbp; 1,5kbp; 4,5kbp; 5,8kbp) in jeweils vier Fragmente (Größe der Fragmente in kbp) gespalten. Das Plasmid pMLC-2v-DsRed2 wurde mit dem Enzym HindIII gespalten (0,8kbp; 1,3kbp; 1,5kbp; 5,8kbp).



**Abbildung 9: Restriktionsanalyse der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-eGFP.**

Links) Spaltung des Plasmids pNkx2.5-eGFP durch die Enzyme AgeI und HindIII (mittlere Spur, beachte Doppelbande bei 1,5kbp) und XhoI und HindIII (rechte Spur). Rechts) Spaltung des Plasmids pMLC-2v-DsRed2 durch das Enzym HindIII.

### ***3.1.13 Plasmidsequenzierung***

Das erste Primerpaar wurde anhand der vorliegenden Vektorkarte für die beiden Vektoren pCMV-eGFP und pCMV-DsRed2 ermittelt. Die Primer wurden über die Firma Invitrogen bezogen (Sequenzen siehe Abbildung 10). Die Proben wurden wie folgt für das Sequenzieren vorbereitet. In einem 0,2ml Zentrifugenröhrchen (Eppendorf) wurden 400ng Plasmid-DNA in molekularbiologischem Wasser aufgenommen und zusammen mit dem Primer auf sechs Mikroliter Gesamtvolumen gebracht. Die Endkonzentration des Primers im Ansatz betrug 5-7pmol/l. Die Proben wurden in der Abteilung für Gentherapie der Tulane University sequenziert.

<b>Primer-paar</b>	<b>Sense 5'-3'</b>	<b>Antisense 5'-3'</b>
1	GGAATAGAAGAAGAAGGTGG	CCACATAGCGTAAAAGGAGC
2	CGTTGGAAGGTGCTTTGGG	GGACACGCTGAACTTGTGG
3	TTTGGACTGCTTGGAGAGGG	AAGTCTGCCTAAGATAGCC

**Abbildung 10: Primer zur Sequenzierung der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2.**

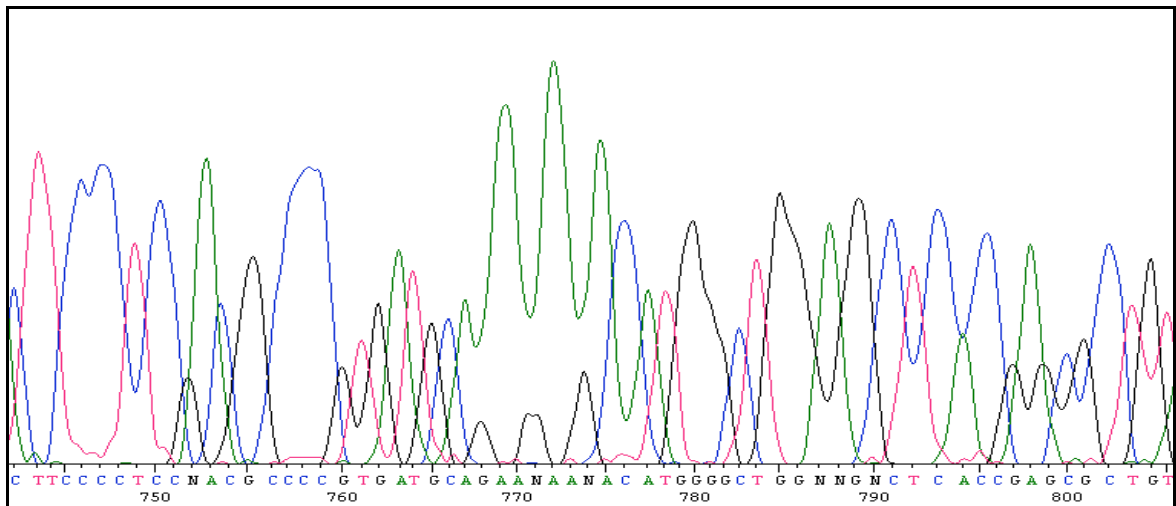
Die erhaltenen Sequenzen wurden unter Verwendung der Software SeqManII™ (DNASTAR Inc.) zusammengesetzt. Das Primerpaar #2 und #3 für die Sequenzierung des Plasmids pNkx2.5-eGFP wurden auf Basis der gewonnenen Sequenzen erstellt. Die Sequenzierungsstatistik der beiden Plasmide ist in Abbildung 10 nachzuvollziehen.

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>pNkx2.5-eGFP</b>	<b>pMLC-2v-DsRed2</b>
Gesamtlänge aller Sequenzen:	5269 Basen	2106 Basen
Durchschnittliche Länge/Sequenz:	878 Basen	1053 Basen
Absolute Länge der Konsensussequenz:	4177 Basen	1141 Basen
Oberer Strang:	3 Sequenzen	1 Sequenz
Unterer Strang:	3 Sequenzen	1 Sequenz
Gesamt:	6 Sequenzen	2 Sequenzen

**Abbildung 11: Sequenzierungsdaten der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2.**

Das Plasmid pNkx2.5-eGFP wurde in drei Sequenzierungsschritten, das Plasmid pMLC-2v-DsRed2 in einem Sequenzierungsschritt analysiert.

Es wurden drei Schritte zur Sequenzierung der Insertionsstelle des Plasmids pNkx2.5-eGFP durchgeführt. Für die Analyse des Plasmids pMLC-2v-DsRed2 genügte ein Sequenzierungsschritt (Insert 250bp versus 3,4kbp). Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels EditSeq™-Software zusammengeführt. Die Konsensussequenzen wurden mit denen der *Genom*-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) verglichen. Die erhaltenen Sequenzen stimmten mit den beim NCBI eingetragenen Nkx2.5/MLC-2v-Sequenzen überein.



**Abbildung 12: Sequenzierungsrohdaten in der Insertionsstelle des Plasmids MLC2v-DsRed2.** Sequenzabschnitt des Plasmids pMLC-2v-DsRed2; unklare Nukleotidabschnitte konnten auf Basis der \*.abi-Dateien und SeqManII™-Software (DNASTAR Inc., WI, USA) korrigiert werden.

### ***3.1.14 Transfektion von 293T Zellen und***

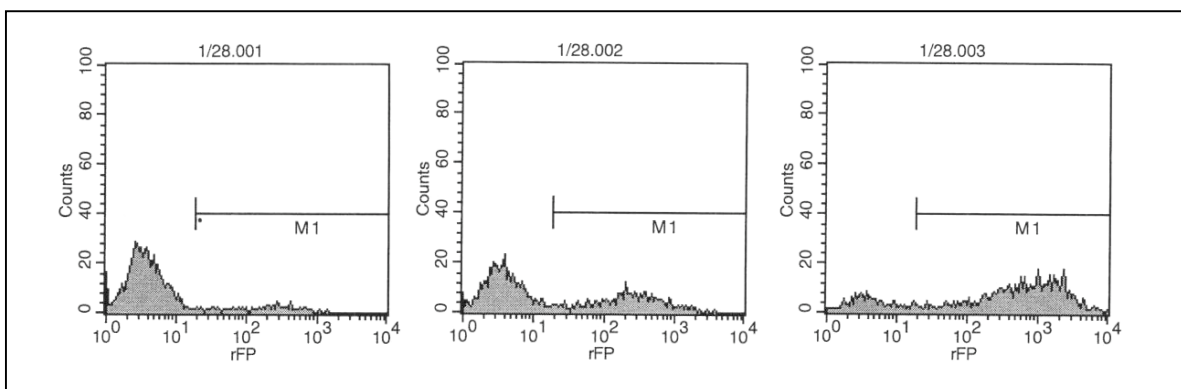
#### ***Viruskonzentrationsbestimmung***

Für die Herstellung lentiviraler Vektoren wurden 293T Nierenkarzinomzellen (Invitrogen) mit den drei kodierenden Plasmiden mittels Calciumphosphatpräzipitation transfiziert. Für das Verfahren wurden in zehn 150mm Kulturschalen (Nunc) je  $8 \times 10^6$  293T Zellen ausgesät. Als Medium dienten 25ml Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM; Mediatech, Herndon, VA, USA) mit zehn Prozent FBS (Atlanta Biologicals, Norcross, GA, USA), einem Prozent L-Glutamin und einem Prozent Penicillin/Streptomycin). Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei 35% Konfluenz der 293T Zellen wurde mit der Transfektion begonnen. Zunächst wurden 25µl 25mM Chloroquin (Sigma) in jede Kulturschale hinzugegeben. Der Transfektionsansatz wurde in einem konischen 50ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) vorbereitet. Es wurden 5ml steriles Wasser in das Zentrifugenröhrchen gefüllt und daraufhin 140µg des pCD/NL-BH\*ΔΔΔ Helferplasmids, 70µg des pLTR-G Envelope-Plasmids, 210µg des Vektorplasmids sowie 3890µl 2M CaCl<sub>2</sub> hinzupipettiert. Das Ansatzvolumen wurde mit sterilem Wasser auf 30ml gebracht und dann gemischt. Vom Ansatz wurden dann 15ml in ein neues 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15ml zweifache Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) (Mediatech) hinzugegeben. Pro Kulturschale wurden 6ml Medium benötigt. Dieser Schritt wurde für die übrigen Kulturschalen wiederholt, woraufhin

diese dann über Nacht in einem Inkubator gelagert wurden. Nach 12–18 Stunden wurde das Medium gewechselt. Als Kulturmedium wurde DMEM (Mediatech) mit zehn Prozent FBS (Atlanta Biologicals), einem Prozent L-Glutamin und einem Prozent Penicillin/Streptomycin (beides Mediatech) verwendet. Weitere 48–60 Stunden später wurde das virushaltige Medium abgenommen und bei 450U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels eines 0,45µm Polysulfon Filter steril filtriert und anschließend bei -80°C gelagert. Zur Konzentrierung des Lentivirusüberstandes wurden 30ml in ein Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) gegeben und bei 25.000U/min und 4°C für zwei Stunden zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die Ultrazentrifugenröhrchen für zwei Minuten zum Lufttrocknen gelagert. Damit sich das Pellet im Rest des Mediums auflösen konnte, wurden die Ultrazentrifugenröhrchen bei 4°C für etwa zwei Stunden gelagert. Zur Titrierung wurden  $5 \times 10^4$  humane Osteosarkomzellen (HOS, Invitrogen) mit verschiedenen Konzentrationen der lentiviralen Vektoren zusammengebracht, nachdem sie mit 2,5U RNase-free DNase I (Takara, Pittsburgh, PA, USA) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Zu erkennen war sowohl eine proportionale Zunahme der Anzahl an fluoreszierenden Zellen, als auch eine Rechtsverschiebung der Fluoreszenzintensitäten. Zur Berechnung der Transduktionseinheiten/ml (durchschnittlich  $1-2 \times 10^9$  TU/ml) wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{TU/ml} = \frac{\text{Zellzahl zum Zeitpunkt der Transduktion} * \text{rel. Anteil an fluoreszierenden Zellen} * \text{Verdünnungsfaktor}}{100}$$



**Abbildung 13: FACS-Analyse von HOS-Zellen 48h nach Infektion mit pMLC-2v-DsRed2.** Links) 0,5µl; Mitte) 5µl und rechts) 50µl pMLC-2v-DsRed2-Viruskonzentrat. Gemessen wurde die rote Fluoreszenz (rFP; DsRed2) bei 594nm Wellenlänge (Texas Red).



## ***3.2 Etablierung und Validierung der lentiviralen Konstrukte***

### ***3.2.1 Quantifizierung der lentiviralen Integrationseinheiten***

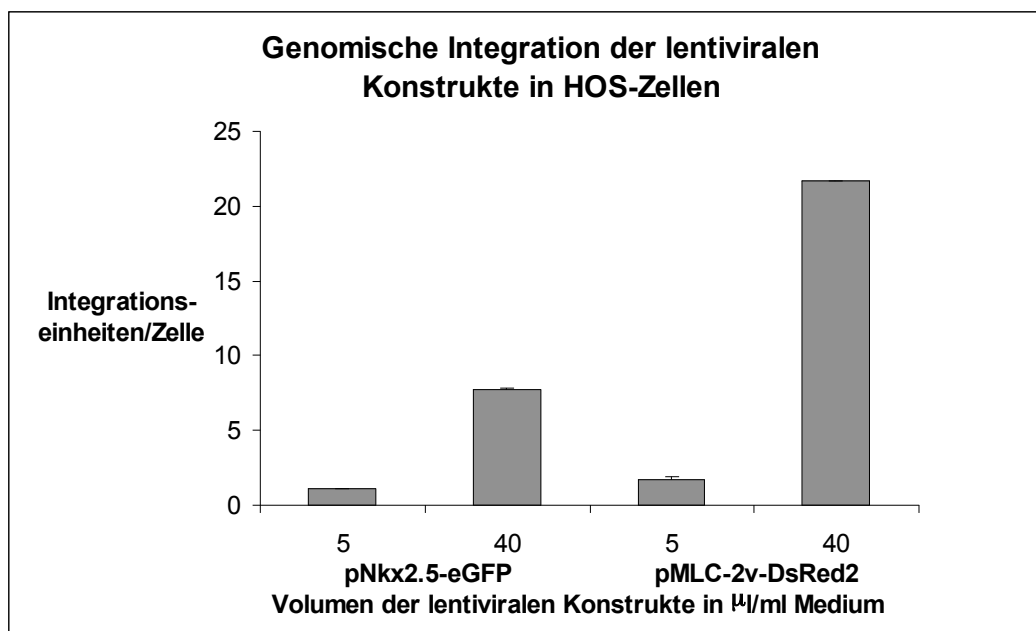
Eine Million HOS-Zellen wurden bei 1500U/min für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 200µl Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Mediatech) resuspendiert. Die aufgelisteten Materialien entstammten dem Qiagen DNeasy<sup>®</sup> Kit (Qiagen Inc.). Um RNA-freie DNA zu erhalten wurden 4µl RNase A (100mg/ml) zum Ansatz pipettiert und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 20µl Proteinase K und zur Lyse der Zellen 200µl Puffer AL. Der Ansatz wurde umgehend geschüttelt und bei 70°C für zehn Minuten inkubiert. Zum Ansatz wurden 200µl molekularbiologisches Ethanol (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und gründlich geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde in eine DNeasy<sup>®</sup> Spin Säule überführt, welche daraufhin bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert wurde. Durchsatz und Sammelröhrchen wurden verworfen und die Säule in ein neues Sammelröhrchen platziert. Beim ersten Waschschrift wurden 500µl Puffer AW1 zur Säule hinzugegeben. Die Säule wurde dann bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Erneut wurde das Sammelröhrchen ausgetauscht. Beim zweiten Waschschrift wurden 500µl Puffer AW2 zur Säule hinzupipettiert mit anschließender dreiminütiger Zentrifugation bei 13.000U/min. Die Säule wurde dann in ein neues 1,5ml Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) platziert und 200µl Elutionspuffer AE auf das Zentrum der DNeasy<sup>®</sup>-Membran pipettiert. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Säule abschließend bei 13.000U/min für 60 Sekunden zentrifugiert. Bei Bedarf wurde der Elutionsschrift wiederholt. Als nächster Schritt wurde die DNA-Konzentration mittels eines auf der Hoechst-Färbung basierenden DNA-Quantifikationskits (BioRad) bestimmt. Die Real-time PCR wurde mittels eines ABI PRISM 7700 Sequenz Detektors (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in einem Gesamtvolumen von 50µl durchgeführt. Der Ansatz enthielt 25µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 50ng genomische DNA und 10pM des sense- und antisense-Primers und der Probe, die mit dem partiell deletierten gag-Gen, das in jedem Vektor enthalten war, korrespondierte.

Die Sequenzen waren wie folgt:

- 5'-TTCGCAGTTAATCCTGGCCT-3' (forward primer),
- 5'-GCACACAATAGAGGACTGCTAATTGTA-3' (reverse primer),
- 5'-FAM-TAGAGACATCAGAAGGCTGTAGACAAA-3' (Probe).

Das Thermoprofil bestand aus initialen zwei Minuten bei 50°C, zehn Minuten bei 95°C und 40 Zyklen bei 95°C für 15s und 60°C für jeweils eine Minute. Verdünnungsreihen des pCMV-eGFP/pCMV-DsRed2-Plasmids wurden angefertigt, um Standardkurven zu erstellen. Die Menge an genomischer DNA in den jeweiligen Reaktionen wurde durch eine parallel laufende PCR bestimmt. Die Daten wurden mittels der Sequence Detector Software Version 1.7 (Applied Biosystems) ausgewertet. Anhand der Ermittlung der Transduktionseinheiten konnten für die weiteren Experimente die Viruskonzentrationen so adaptiert werden, dass gleiche Virusvolumen auch gleiche Viruskonzentrationen bedeuteten.

Die Daten zeigten eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Anzahl der Integrationseinheiten und eingesetztem Virusvolumen. Es wurde eine Viruslast von 1,0 (5µl) und 7,8 (40µl) Viruskopien für den Lentivirus mit pNkx2.5-eGFP beziehungsweise 1,7 (5µl) und 21,7 (40µl) Viruskopien pro Zelle für pMLC-2v-DsRed2 ermittelt.



**Abbildung 14: Q-PCR-Analyse zur Ermittlung von Virusintegrationseinheiten.**  
 Infektion von HOS-Zellen mit 5µl und 40µl Virusvolumen pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2.

### 3.2.2 Gewinnung von humanen ADSCs

Das Fettgewebe wurde dem Labor durch die Sektion für Plastische Chirurgie der Tulane Universität, New Orleans zur Verfügung gestellt. Das Gewebe stammte von Patienten beider Geschlechter im Alter von 30-65 Jahre.

Das Fettgewebe wurde mittels einer Schere zerkleinert, mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Mediatech) gewaschen und anschließend mit 25mg Collagenase VIII pro Gramm Fett sowie 5mM CaCl<sub>2</sub> (beides Sigma-Aldrich) als Kofaktor versetzt. Mittels DPBS auf 20ml Gesamtvolumen aufgefüllt, wurde die Suspension in einem 50ml Corning® Zentrifugenröhrchen (Fisher Scientific International Inc.) auf einem Wipptisch bei 37°C für 90 Minuten inkubiert. Die resultierende Zellsuspension wurde filtriert (Porengröße: 100µm), wobei das Filtrat in einem neuen 50ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und mit 40ml HBSS (Mediatech) versetzt wurde. Die Suspension wurde bei 500U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Zwei weitere Waschrritte mit je 20ml HBSS und fünf Minuten Zentrifugation schlossen sich an. Zuletzt wurde das Pellet in alpha-Modification of Eagle's Medium (α-MEM, Mediatech) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und anschließend in T75 Zellkulturflaschen (Nalge) ausgesät. Beim Erreichen von 70–80%iger Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert.



**Abbildung 15: Humane Fettgewebprobe nach den ersten Waschrritten.**

Die Probe wird zunächst von Blut- und Gewebsresten gesäubert und dann mittels Skalpell/Schere in wenige Millimeter große Stückchen zerkleinert.

### ***3.2.3 Extraktion neonataler Rattenkardiomyozyten***

Schwangere Ratten wurden von der Firma Charles River bezogen. Die Verwahrung erfolgte in den Räumen des Tulane Vivarium Sciences Centers, New Orleans, LA, USA. Die Tierversuche wurden gemäß der Vorschriften des Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) durchgeführt (IACUC Protocol #C157-B13.02-62). Ein bis zwei Tage nach Geburt des Nachwuchses wurde die Extraktion durchgeführt. Die Tötung der Rattenmutter erfolgte durch CO<sub>2</sub>-Intoxikation, der Nachwuchs wurde mittels chirurgischer Schere dekapitiert. Eine Ratte gebar zwischen 13-18 Rattenjungen. Unter Verwendung des Worthington Neonatal Rat Cardiomyocyte Extraktionskits (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) wurde die Extraktion der Kardiomyozyten durchgeführt. Die Prozedur wurde in zwei Schritten an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt.

Die Extraktion der Herzen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach der Dekapitation der Rattenjungen wurde mit einer chirurgischen Schere der Thorax eröffnet, das schlagende Herz herausgenommen und in eine auf Eis gelagerte Sechslöchplatte mit HBSS (Mediatech) überführt. Die einzelnen Rattenherzen wurden schrittweise in den einzelnen Lochungen gewaschen, anschließend in eine auf Eis gekühlte Petrischale (Nalge), gefüllt mit HBSS, überführt. Mit einer Schere wurden Herzen in etwa ein Kubikmillimeter große Stücke zerkleinert. Die Herzen wurden zweimal mit je 10ml HBSS gewaschen. Es wurde HBSS hinzugegeben bis das Gesamtvolumen in der Petrischale etwa 9ml betrug. Daraufhin wurde 1ml Trypsin (im Kit enthalten) hinzupipettiert und der Inhalt der Petrischale gründlich gemischt. Die Endkonzentration von Trypsin betrug 50µg/ml. Die Petrischale wurde für 16-20h bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Herzen zunächst auf Eis gelagert und dann unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet. Der Inhalt der Petrischale wurde in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zugabe von Trypsininhibitor wurde der enzymatische Verdauungsprozess gestoppt. Anschließend wurde der Inhalt des Zentrifugenröhrchens im Wasserbad auf 33-37°C erwärmt. Für den nächsten Verdauungsschritt mit dem Enzym Kollagenase wurde ein Fläschchen des Enzyms mit 5ml Leibovitz<sup>TM</sup> L-15 (beides im Kit enthalten) rekonstituiert. Der Inhalt des Fläschchens wurde in das Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen

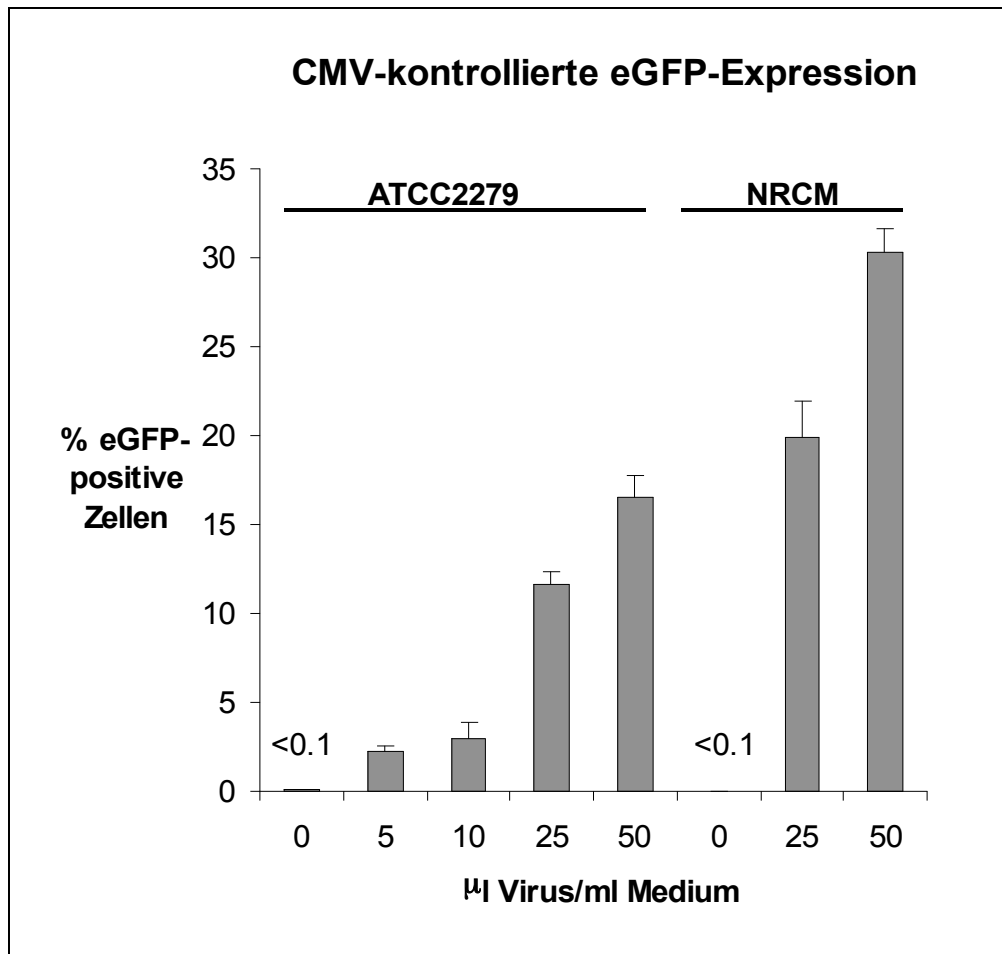
wurde geschüttelt und auf einem Wipptisch bei 6U/min bei 37°C für 45 Minuten inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt: Der Inhalt des Zentrifugenröhrchens wurde zum mechanischen Zerkleinern zehnmal in einer 10ml Pipette (Fisher Scientific Inc.) aufgezogen. Das Zentrifugenröhrchen wurde für fünf Minuten stehengelassen damit sich die Gewebsreste setzen konnten. Der Überstand wurde daraufhin durch einen steriles Sieb (im Kit enthalten) filtriert. Die im Sieb verbliebenen Gewebsreste wurden in Leibovitz-Medium<sup>TM</sup> resuspendiert, dann in die gleiche 10ml Pipette aufzogen, um diese weiter zu zerkleinern. Anschließend wurde der Filtrierungsvorgang wie oben beschrieben wiederholt. Das Filtrat wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um restliches Kollagen zu zersetzen. Der Ansatz wurde danach für fünf Minuten bei 150U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet anschließend in Leibovitz<sup>TM</sup>-Medium resuspendiert. Es wurden  $1,25 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in T75 Zellkulturflaschen ausgesät, welche zuvor mit einer Gelatin- und Fibronectinlösung (Sigma) beschichtet wurden. Nach 24h Inkubation bei Standardbedingungen wurde mit den Experimenten begonnen.

### ***3.2.4 Kontrollinfektionen zur Validierung der HIV-1 basierten***

#### ***Lentiviren***

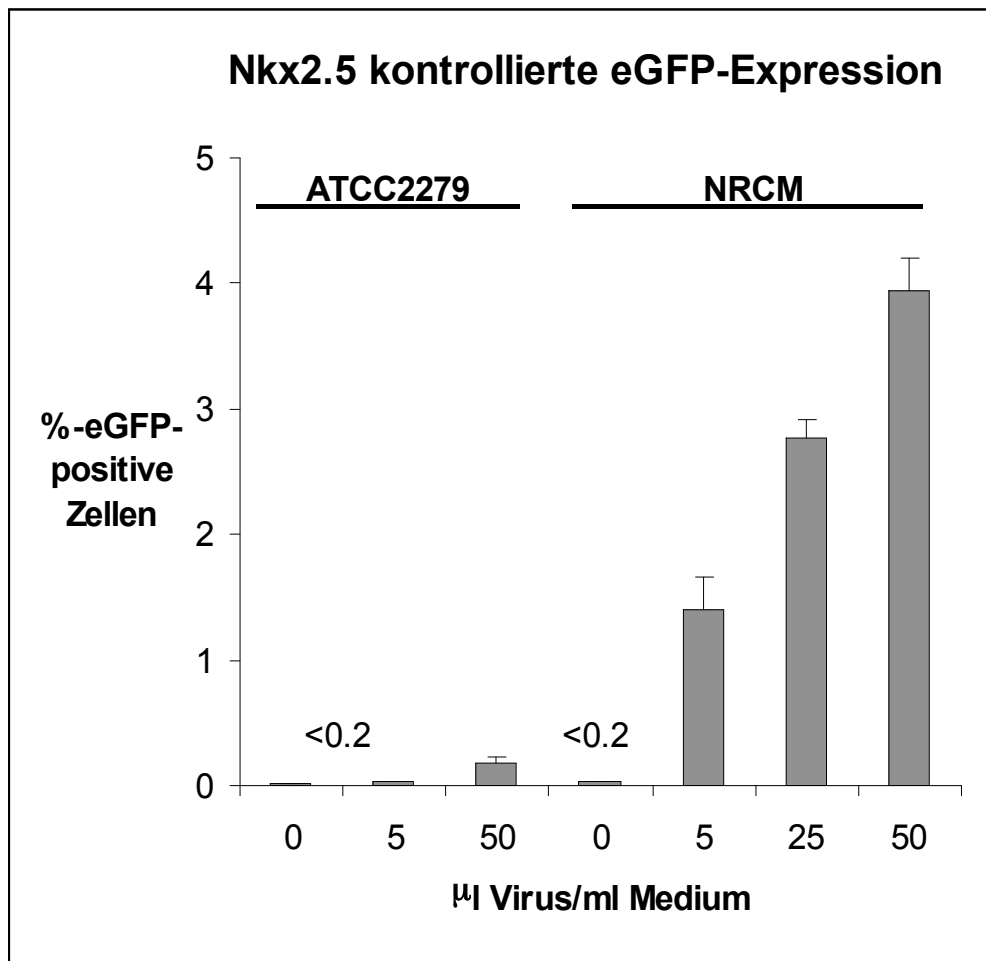
Zur Ermittlung der Spezifität der Viren wurden Zellen verschiedener Gewebe als Positiv-und Negativkontrollen verwendet. Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (NRCM) wurden als Positivkontrolle und murine Pankreasendothelzellen (ATCC2279) als Negativkontrolle eingesetzt. NRCM exprimieren sowohl den Transkriptionsfaktor Nkx2.5 als auch das Protein MLC-2v als Teil des Sarkomers. Hingegen exprimieren murine Pankreasendothelzellen (EC) keines der beiden Produkte. Zusätzlich wurde ein weiterer Lentivirus als Kontrolle hinzugezogen. Dieser enthielt ein Plasmidkonstrukt, in welchem ein Cytomegalieviruspromoter die Expression des Fluoreszenzfarbstoffes eGFP kontrollierte (pCMV-eGFP). Durch diesen Promotor wird nachdem der Virus in die Wirtszelle eingedrungen und das Virusgenom im Genom des Wirtes abgelegt wurde, konstitutiv transkribiert. Aufgrund der Kopplung an eGFP wird eine erfolgreich infizierte Wirtszelle eGFP produzieren. Die eGFP-Produktion ist dann fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.



**Abbildung 16: FACS-Analyse von ECs und NRCMs nach Infektion mit pCMV-eGFP.**  
 Prozentuale eGFP-Fluoreszenz von ATCC2279 Endothelzellen und neonatalen Rattenkardiomyozyten 72h nach Infektion mit verschiedenen Virusvolumina von pCMV-eGFP.

Die Infektion von ATCC2279 Endothelzellen und NRCMs mit verschiedenen Volumina von pNkx2.5-eGFP resultierte in einem dosisabhängigen Anstieg von eGFP<sup>pos</sup>-Zellen in der Gruppe der NRCMs, allerdings in geringerem Maße verglichen zur Infektion mit pCMV-eGFP. Im Gegensatz zur Infektion mit pCMV-eGFP (circa 30%) konnten selbst bei maximaler Viruslast nur circa 4% der NRCMs erfolgreich infiziert werden.

Im Vergleich dazu konnte bei der Infektion der Endothelzellen mit maximalen Virusdosen pNkx2.5-eGFP kein signifikanter Anstieg an eGFP-Positivität beobachtet werden, wohingegen bei maximaler Viruslast etwa 15-20% der Endothelzellen erfolgreich mit pCMV-eGFP infiziert werden konnten. Die Prozentwerte für eGFP<sup>pos</sup>-Zellen blieben nahezu konstant auf dem Niveau der Kontrollinfektionen.



**Abbildung 17: FACS-Analyse von ECs und NRCMs nach Infektion mit pNkx2.5-eGFP.**  
 Prozentuale eGFP-Fluoreszenz von ATCC2279 Endothelzellen und neonatalen Rattenkardiomyozyten 72h nach Infektion mit verschiedenen Virusvolumina von pNkx2.5-eGFP.

### 3.2.5 Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden unter sterilen Konditionen bei 37°C und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre aus 95% Luft und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Als Kulturmedium für die humanen ADSCs, murinen Pankreas- (American Type Culture Collection 2279 (ATCC, Manassas, VA, USA) diente  $\alpha$ -MEM (Mediatech) mit 20% fetalem Kälberserum (FKS) (Atlanta Biologicals, Norcross, GA, USA), 1% Penicillin (5000 I.U./ml), 1% Streptomycin (5000  $\mu$ g/ml) und 1% L-Glutamin (200 mM) (beide Mediatech). Es wurden  $0,5-1,5 \times 10^6$  Zellen pro 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche (Nalge) in 12 ml Kulturmedium ausgesät. Für Versuche eingesetzte Zellen entstammten der ersten Passage. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden in mit Gelatin/Fibronectin (Sigma) beschichteten Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Subkultivierung wurden die konfluenten Zellen zunächst zweimal mit 5ml HBSS gewaschen, anschließend mit 1ml Trypsin (0.25%)/EDTA (1mM) (Fisher Scientific International Inc.) benetzt und für fünf min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1ml Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI, Sigma) und 8ml  $\alpha$ MEM erfolgte die Ermittlung der Zellzahl.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen zunächst wie für die Subkultivierung vorbereitet. Nach fünfminütiger Inkubation mit Trypsin und Zugabe von SBTI wurden 8ml  $\alpha$ MEM zur Zellsuspension addiert und gemischt. Es wurden 50 $\mu$ l Zellsuspension abgenommen, mit 9,95ml isotonischer Kochsalzlösung Casyton (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) in ein Messgefäß gegeben und anschließend im Zellzählgerät (CASY 1, Schärfe System) analysiert.

### ***3.3 Differenzierungsexperiment mit 5-Azacytidine***

ADSC wurden in Sechsllochplatten (5x10<sup>4</sup>/10cm<sup>2</sup>) ausgesät und nach 24h wie oben beschrieben mit pNkx-2.5eGFP und pMLC-2v-DsRed2 infiziert. Nach 16h wurde das virushaltige Medium gewechselt und die Zellen für 48h kultiviert.

Während des Experiments wurden die ADSCs mit steigender Konzentration von 5-Azacytidine (1-10 $\mu$ mol/l) in Standardmedium für 24h unter Normalbedingungen inkubiert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen für drei Wochen weiter kultiviert. Anschließend wurde die eGFP-Fluoreszenz mittels FACS quantifiziert.

### ***3.4 Molekularbiologische Analyse der ADSCs***

#### ***3.4.1. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion***

Es wurden zwischen 0,1–1,0x10<sup>6</sup> Zellen für RNA-Extraktionen eingesetzt. Vor Beginn der Extraktion wurde dem Puffer RLT 10 $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) pro ml Puffer beigefügt. Des Weiteren wurde DNase I (1500 Kunitz Units) in 550 $\mu$ l RNase-freiem Wasser (New England Biolabs<sup>®</sup>) rekonstituiert und dann als 50 $\mu$ l Aliquots bei minus 20°C eingefroren.

Die Zellen wurden bei 1500U/min für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und anschließend das Pellet mit 350 $\mu$ l Lysispuffer RLT resuspendiert. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder<sup>™</sup> Mini Spin Säule pipettiert und die Säule



dann bei 13.000U/min für zwei Minuten in der Biofuge Fresco Zentrifuge (Heraeus Instruments, München, Deutschland) zentrifugiert. Zum Durchsatz wurden 350µl 70%iger Ethanol (Sigma-Aldrich) addiert, der Ansatz gemischt und dann auf eine RNeasy Mini Spin Säule aufgetragen. Die Säule wurde dann bei 13.000U/min für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchsatz wurde verworfen. Es wurden 10µl DNase I Stocklösung in 70µl Puffer RDD (beides New England Biolabs®) gegeben, gemischt und anschließend auf das Zentrum der RNeasy Kieselgelmembran pipettiert. Die Säule wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden dann 350µl Puffer RW1 auf die Säule pipettiert und diese für 30 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gestellt. In zwei aufeinander folgenden Waschschrritten wurden jeweils 500µl Puffer RPE auf die Kieselgelmembran pipettiert und die Säule für 30 Sekunden beziehungsweise zwei Minuten bei 13.000U/min zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurden 30µl RNase-freies Wasser direkt auf das Zentrum der Kieselgelmembran pipettiert und die Säule abschließend für 60 Sekunden bei 13.000U/min zentrifugiert. Daraufhin wurde die Konzentration der RNA im Durchsatz bestimmt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde unter Verwendung des SuperScript III Reverse Transkriptase<sup>TM</sup> Kits (Invitrogen) durchgeführt. Die verwendete Menge an Total-RNA für eine RT-Reaktion betrug ein Mikrogramm.

Diese wurde mit je einem Mikroliter der dNTP- und der Primermischung zusammengegeben. Anschließend wurde mit DEPC-behandeltem Wasser das Volumen des Ansatzes auf zehn Mikroliter adaptiert.

Einer fünfminütigen Inkubation bei 65°C folgte ein Kühlschritt auf Eis für mindestens eine Minute. Der cDNA-Synthesemix wurde nach Herstellerangaben vorbereitet. Jeweils 10µl davon wurden zu den Ansätzen hinzugegeben.

Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurde der Ansatz zunächst für zehn Minuten bei 25°C, dann für 50 Minuten bei 50°C und letztlich für fünf Minuten bei 85°C inkubiert. Der letzte Hitzeschritt beendete die Synthesereaktion.

Es folgte die Zugabe von 1µl RNase H mit 20minütiger Inkubation bei 37°C. Die cDNA wurde entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt. Die drei Schritte der PCR-Reaktion wurden unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Denaturierung der Template cDNA wurde erreicht, indem die doppelsträngige Ausgangs-DNA bei Temperaturen >90°C inkubiert wurde. Die Doppelstränge

dissoziieren dabei und liegen in der Lösung als Einzelstränge vor, bis die Temperatur abgesenkt wird.

RT-PCR Primersequenzen (5'-3')		Produktlänge	Ann.- (bp)	Elong.- temp.	
Zyklen	temp.			in °C	in °C
GAPDH	Forward: AGCCACATCGCTCAGACACC Reverse: GTA CT CAGCGGCCAGCATCG	302	67	68	35
Nkx2.5	Forward: GCCGAAAAGAAAGAGCTGTG Reverse: AGGTACCGCTGTTGCTTGAA	167	60	74	38
MLC-2v	Forward: GACCAGAACAGGGATGGCTTC Reverse: TCAGGGTCAAACACTTTGAATGC	215	68	74	35
GATA-4	Forward: TCCCTCTTCCCTCCTCAAAT Reverse: TCAGCGTGTAAGGCATCTG	194	61	74	38
Troponin I	Forward: CCCTGCACCAGCCCCAATCAGA Reverse: CGAAGCCCAGCCCGTCAACT	250	67	68	35
Troponin T	Forward: GGCAGCGGAAGAGGATGCTGAA Reverse: GAGGCAGCCAAGTTGGGCATGAACGA	150	71	74	35
alpha-MHC	Forward: GTCATTGCTGAAACCGAGAATG Reverse: GCAAAGTACTGGAATGACACGCT	413	67	74	35
Connexin 43	Forward: ATGAGCAGTCTGCCTTTCGT Reverse: TCTGCTTCAAGTGCATGTCC	230	63	68	35
Connexin 45	Forward: GGAAGATGGGCTCATGAAAA Reverse: GCAAAGGCCTGTAACACCAT	210	63	68	35
MyoD	Forward: AGCACTACAGCGGCGACT Reverse: GCGACTCAGAAGGCACGTC	266	64	74	35
Myogenin	Forward: TAAGTTGTGTAAGAGGAAGTCG Reverse: CCACAGACACATCTTCCACTGT	435	62	74	35
Kv4.3	Forward: CACCCAGAAAGAGGAGCACAT Reverse: AGTATCTGGCAGGTTAGAATT	322	58	72	38
L-Type C <sub>V</sub> α <sub>1c</sub> (Ca <sup>2+</sup> -Kanal)	Forward: CTGGACAAGAACCAGCGCATAGTGCG Reverse: ATCACGATCAGGAGGCCACAGGG	562	56	72	34

**Abbildung 18: Liste der RT-PCR Primersequenzen zur Analyse der ADSC-Fraktionen.**

Das Annealing erfolgte bei zuvor ermittelten, primerspezifischen Temperaturen. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug stets 25µl. Dies setzte sich aus 12,5µl AccuPrime™ Supermix (Invitrogen), 50-100ng der cDNA, jeweils 0,5µl des Sense-/Antisense-Primers (10mM) (Invitrogen) sowie molekularbiologischem Wasser (Sigma-Aldrich) zusammen.

Je nach untersuchtem Transkript wurde die PCR mit Abwandlungen von dem folgenden Schema durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte bei 94°C für 30 Sekunden, das Annealing bei 68°C für 45 Sekunden und die Extension bei 74°C für 45 Sekunden. Der finale Extensionsschritt erfolgte bei 74°C für vier Minuten. Den Ansätzen wurden dann 5-10µl für Analysezwecke entnommen und der Rest der Proben bei -20°C gelagert. Zur Analyse diente die Gelelektrophorese.

### ***3.4.2 Immunozytochemie***

Zunächst wurden die auf Glasplättchen kultivierten eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen dreimal mit FBS gewaschen und dann mit 4%igem Paraformaldehyd (Sigma) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die Zellen wurden daraufhin dreimal mit PBS (mit 0,3%igem Triton X-100 (Sigma)) gewaschen und mit 10%igem Ziegen Serum für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Zellen wurden für eine Stunde mit dem primären Antikörper inkubiert. Die verwendeten Antikörper waren Ziege anti-Nkx2.5 (R&D, Inc., Minneapolis, MN, USA), Maus anti-ANP, Maus anti-MLC-2v (beide Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland), Maus anti-β-MHC, Maus anti-kardiales Troponin T (cTnT), Ziege anti-kardiales Troponin I (cTnI) (alle Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), Kaninchen anti-α-sarkomeres Aktin (Sigma), Ziege anti-L-Typ-Calciumkanal (Chemicon, Temecula, CA, USA) und Maus anti-Ki67 (Novocastra Laboratories Ltd., Norwell, MA, USA). Nach drei Waschschritten mit PBS (Mediatech) wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper, Alex Fluor 488 Esel-anti-Ziege, Alex Fluor 488 Esel-anti-Maus, Alex Fluor 488 Esel-anti-Kaninchen (alle Invitrogen), bei einer Verdünnung von 1:1000 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hoechst 33342-Färbung wurde als Zellkernfärbung verwendet. Die Zellen wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie (Leica SP2, Solms, Deutschland) analysiert. Isotypenkontrollantikörper (Sigma) wurden verwendet um unspezifische Bindungen auszuschließen.

### ***3.5 Zellzyklusanalyse***

Zur Analyse wurden die Zellen trypsinisiert, in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  resuspendiert und mit 4°C kaltem 70%igen Ethanol für eine Stunde fixiert. Nach zweifachem Waschen mit PBS und jeweiligem Zentrifugieren wurde 50µg/ml

Propidiumiod (Sigma) zur Markierung sowie RNase A (20µg/ml) zum Pellet hinzugegeben. Dem schloss sich ein Inkubationsschritt mit von mindestens drei Stunden bei 4°C an. Die Proben wurden dann mittels eines FACS Caliburs und der Cell Quest Software (Becton-Dickenson) analysiert.

### ***3.6 Elektrophysiologische Untersuchungen an isolierten Zellfraktionen***

#### ***3.6.1 Calcium-Imaging***

Zur Messung der Calciumaufnahme in die Zellen wurden diese mit dem calciumsensiblen Farbstoff Fura2-am (Invitrogen) inkubiert, welcher die Zellwand passieren kann. Im Zytosol wird enzymatisch ein Aminosäureesterrest abgespalten, woraufhin der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Beim Eindringen von Calcium in die Zelle und Kontakt mit dem Farbstoff, verändert dieser seine Fluoreszenzeigenschaften. Änderung der gemessenen Fluoreszenz bedeutet somit Änderung der Zellcalciumkonzentration. Die Messungen wurden bei 340nm und 380nm Wellenlänge genommen.

Zur Messung wurden die Zellen in Sechslachplatten auf 25mm Glasplättchen (Fisher Scientific) mit einer Dichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Diese wurden zuvor mit einer Gelatin-/Fibronectinlösung beschichtet. Die Zellen wurden bei Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Messungen durchgeführt. Die folgenden Schritte wurden im abgedunkelten Raum durchgeführt. Für den Versuch wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit HBSS gewaschen sowie ein Milliliter Waschluffer (125mM NaCl; 5,9mM KCl; 1,2mM MgCl<sub>2</sub>; 1,28mM CaCl<sub>2</sub>; 3mM Glukose; 25mM HEPES (alles Sigma)) und 7,5µg/ml Fura2-am (50µg/50µl) in jede Vertiefung der Sechslachplatte hinzugegeben. Die Zellen wurden für 45 Minuten in den Inkubator gestellt. Danach wurde der Waschluffer ausgetauscht. Die Sechslachplatte wurde für weitere 20 Minuten in den Inkubator gestellt, um die intrazelluläre Deesterifikation des Fura2-am-Farbstoffs zu erlauben. Der Puffer wurde aspiriert und die Zellen dreimal mit Waschluffer gewaschen. Das Glasplättchen wurde aus der Sechslachplatte genommen und in eine nicht-fluoreszierende Kammer eines invertierten Mikroskops überführt. Angeschlossen an dieses war ein Xenonlampenverstärkersystem (Ionoptix Inc., Milton, MA, USA). Die Daten wurden mit der Ionwizard Software (Ionoptix Inc.) gewonnen. Die

Epifluoreszenz (Werte gemittelt) wurde von einzelnen Zellen gemessen und die Calciumkonzentrationen als Quotient der Messpunktwerte von 340nm (Calcium gebundenes Fura-2am) und 380nm (Calcium ungebundenes Fura-2am) Wellenlänge errechnet. Als depolarisierende Lösung (80mM KCl-Lösung) diente ein Puffer bestehend aus 50,9mM NaCl; 80mM KCl; 1,2mM MgCl<sub>2</sub>; 1,28mM CaCl<sub>2</sub>; 3mM Glukose; 25mM HEPES (alles Sigma).

### ***3.6.2 Patch Clamp***

Die kultivierten eGFP<sup>POS</sup>/DsRed2<sup>POS</sup>-Zellen (Passage 4) wurden mit Trypsin inkubiert, auf 15mm Glasplättchen (Fisher Scientific Inc.) in Zwölflochplatten (Nunc) transferiert und für mindestens zwei Stunden in Standardkulturmedium bei 37°C inkubiert. Die Aufnahmen wurden in einer Kammer durchgeführt, die mit abgewandelter Tyrode-Lösung (NaCl 136mM; KCl 2mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,33mM; Glukose 10mM; Hepes 10mM; pH mittels NaOH auf 7,3 eingestellt; Osmolarität 320-330 mosmol/l) mit einer Durchflussrate von 1,5 ml/min perfundiert wurde. Die Messungen wurden mittels einer Glaspipette (Widerstand 2-3MΩ) durchgeführt. Diese war mit einer Lösung gefüllt, bestehend aus NaCl 140mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; EGTA 2mM; Hepes 10mM; ATP 2mM; und GTP 0,25mM. Mittels KOH wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt; die Osmolarität betrug 300-310 mosmol/l. Ein AxoPatch-1D-Verstärker und AxoGraph Software (Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) wurden zur Datengewinnung und Verarbeitung eingesetzt. In 10V-Schritten je 300ms wurde der Potentialbereich von -100mV bis +100mV durchlaufen um einen Kaliumstrom zu induzieren.

### ***3.7 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)***

Hierfür wurden  $5 \times 10^5$  eGFP<sup>POS</sup>/DsRed2<sup>POS</sup>-Zellen trypsinisiert und mit 3%igem Glutaraldehyd (Sigma) für zwei Stunden bei 4°C fixiert. In derselben Lösung wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit 1%igem OsO<sub>4</sub> (Sigma) inkubiert, danach in Ethanolreihen dehydriert und abschließend in Epon 812 (Shell Chemical Corp., San Francisco, CA, USA) eingebettet. Zur Untersuchung der Ultrastruktur der Zellen wurden 60-90nm dicke Schnitte angefertigt und mittels eines Transmissionselektronenmikroskops analysiert.

## 4. Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von lentiviralen Konstrukten geeignet ist, um eine Zellpopulation von kardiomyozytären Zellen aus dem humanen Fettgewebe zu identifizieren. Die isolierten Zellen exprimierten verschiedene kardiale Gene. Ein Teil dieser Zellen wies elektrophysiologische Eigenschaften auf, die charakteristisch für Kardiomyozyten sind. Die isolierten Zellen ließen sich *in vitro* über mehrere Passagen expandieren ohne den Phänotypen zu ändern. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Schritte von der Virusklonierung bis zur ADSC-Phänotypisierung chronologisch dargestellt.

### 4.1 Plasmidklonierung und Validierung

Die erfolgreiche Klonierung und Validierung der lentiviralen Konstrukte stellte die Grundlage der nachfolgend aufgeführten Ergebnisse und somit einen wesentlichen Bestandteil der Dissertation dar. Da die lentiviralen Konstrukte vorrangig einen methodischen Aspekt der Dissertation darstellen, wurden die Ergebnisse der Teilschritte im Kapitel Materialien und Methoden dargelegt.

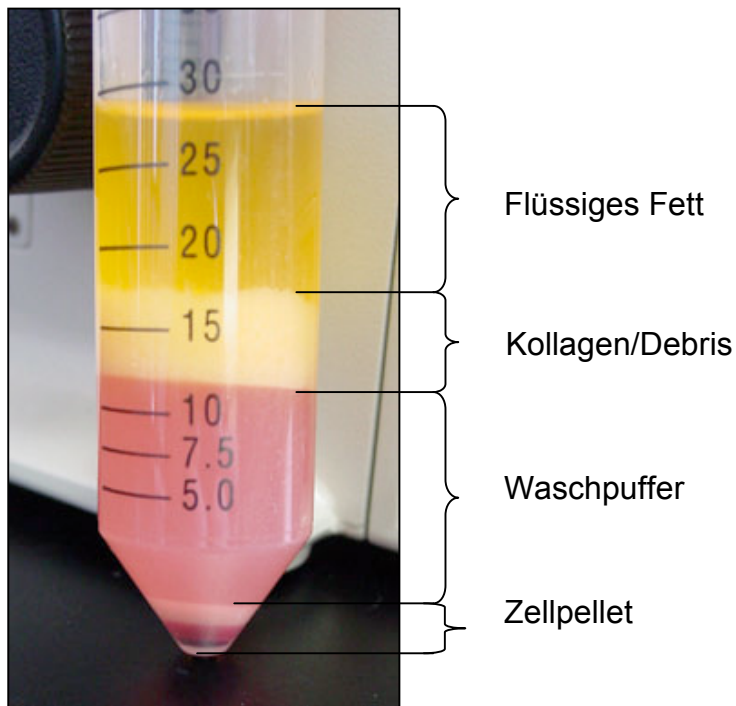
Nach erfolgreicher Klonierung der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2 wurde deren Integrität mittels Sequenzierung und Kontrolltransformationen an humanen Osteosarkomzellen überprüft. Anschließend wurden die Viruspartikel hergestellt und deren Fähigkeit zur genomischen Insertion mittels quantitativer Real-Time-PCR ermittelt.

#### **Anmerkung:**

Im Rahmen eines Material Transfer Agreements wurden die Plasmide zur Erstellung der lentiviralen Konstrukte an die Arbeitsgruppe von Dr. Santini, Faculty of Medicine am Heart Science Centre, NHLI Division, Imperial College London versendet. Die Konstrukte werden von Dr. Santinis Arbeitsgruppe zur Untersuchung der kardialen Differenzierung von humanen embryonalen Stammzellen eingesetzt.

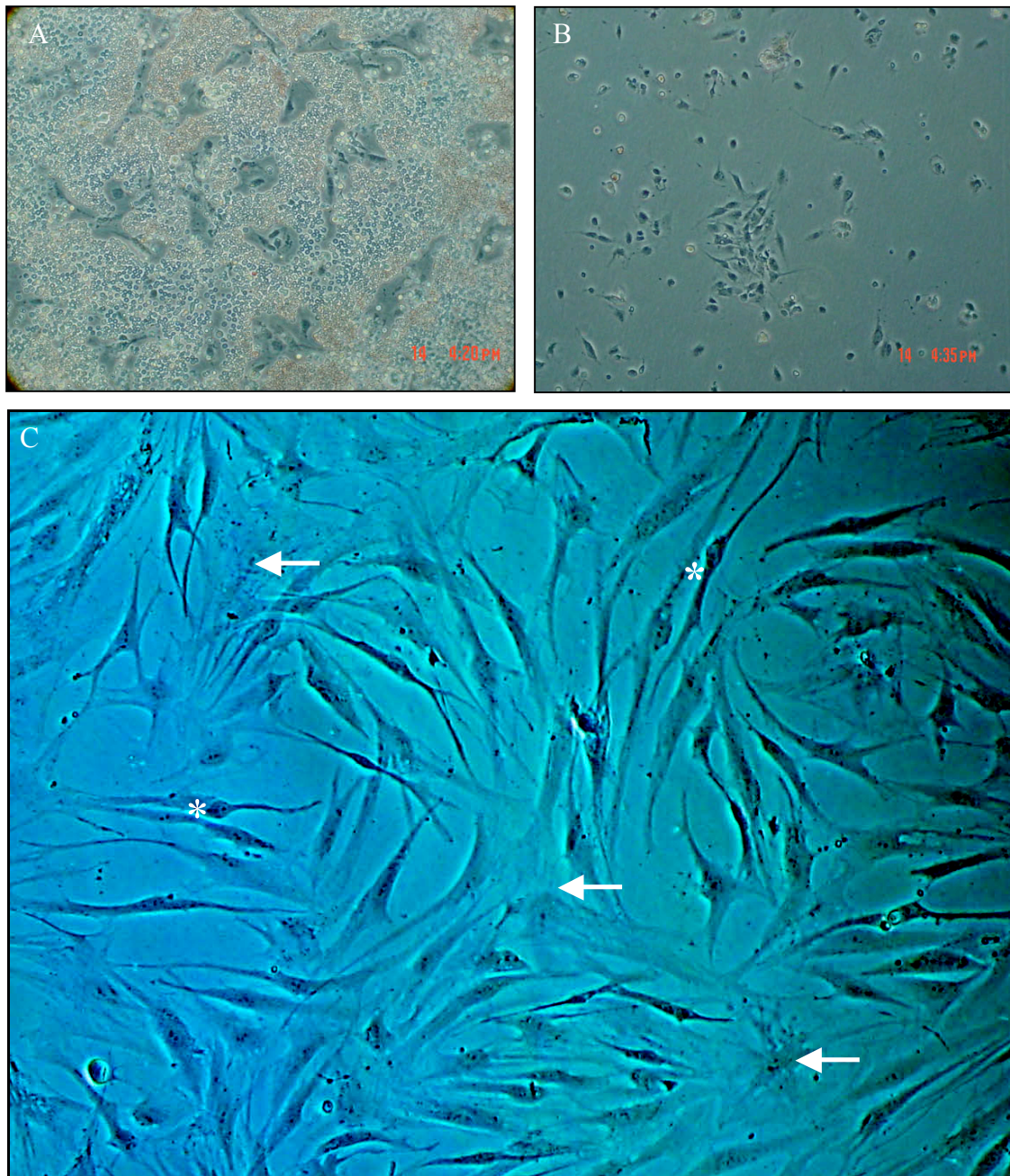
## 4.2. ADSC Kultivierung und Infektion mit lentiviralen Konstrukten

Die am Plastik adhärierenden Zellen stellten die Ausgangspopulation für sämtliche Experimente dar. Pro Gramm humanen subkutanen Fettgewebes wurden zwischen  $0,2-1,1 \times 10^6$  adhärierende Zellen gewonnen.



**Abbildung 19: Auftrennung der Fettgewebssuspension nach enzymatischer Verdauung.** Zellsuspension nach Collagenase VIII Inkubation und anschließendem Zentrifugationsschritt. Das Pellet enthielt neben ADSCs vor allem Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Zellen des peripheren Blutes.

Es konnten verschiedene Phänotypen *in vitro* gefunden werden. Vorrangig wurden Zellen beobachtet die einen fibroblastenartigen Phänotyp aufwiesen. Der vorrangige Zelltyp war der von spindelförmigen, elongierten Zellen, die eine hohe Proliferationskapazität zeigten und nach Expansion regelmäßig zu wirbelförmigen Konglomeraten konfluieren. Im Gegensatz dazu wurden große, breite Zellen beobachtet, die vergleichsweise langsamer proliferierten und auch bei längerer Kultivierung nicht konfluieren. Einen Zelltypus wie den von Prockop et al. beschriebenen der rapidly self renewing cells (RSCs), gefunden in Zellkulturen von MSCs, konnten wir in unseren routinemäßigen Observationen nicht mit Sicherheit identifizieren.<sup>108, 109</sup>



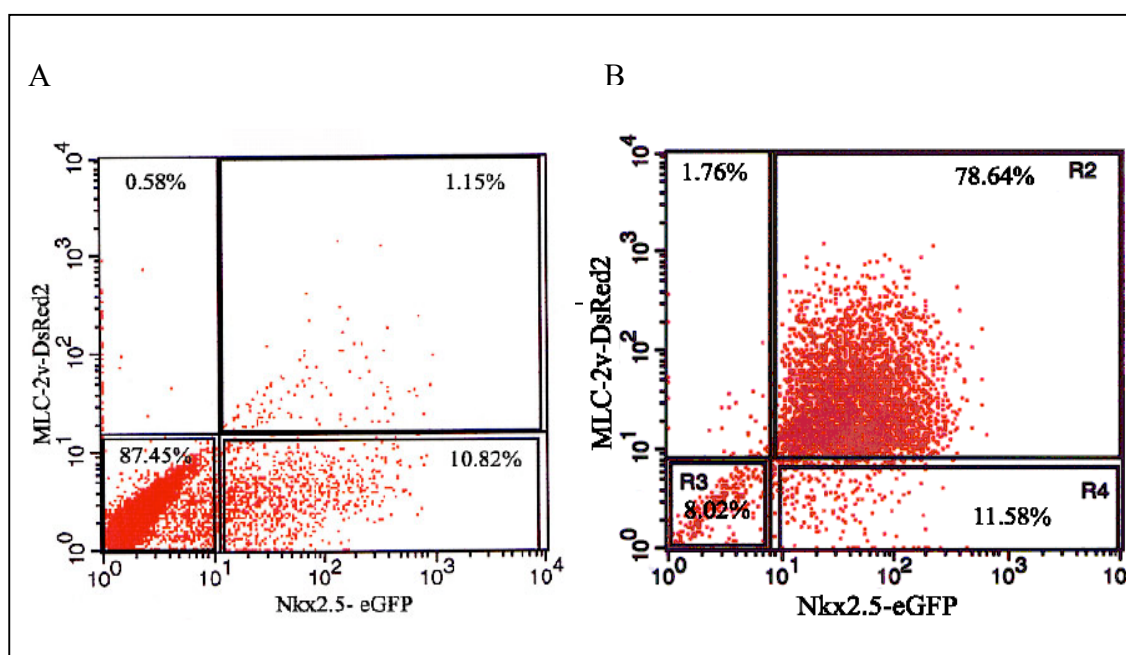
**Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von *in vitro* expandierten ADSCs.**

A) ADSCs, 24h nach Extraktion in Kultur, auffällig ist die Vielzahl von nicht adhärenierenden Zellen und Debris. B) ADSCs 24h nach Extraktion und Waschschrift, die adhärenierenden Zellen sind zumeist abgerundete Zelleib mit nur vereinzelt kurzen Zellausläufern. C) ADSCs, eine Woche nach Isolierung aus dem humanen Fettgewebe. Die Pfeile zeigen auf breitbasige ADSCs mit multiplen Fortsätzen als einen gegenwärtigen Phänotyp im Vergleich zu den spindelförmigen, elongierten ADSCs (\*). Lichtmikroskopische Aufnahme mit 10x Vergrößerung.



#### 4.2.1 Infektion von ADSCs mit anschließender FACS-Analyse

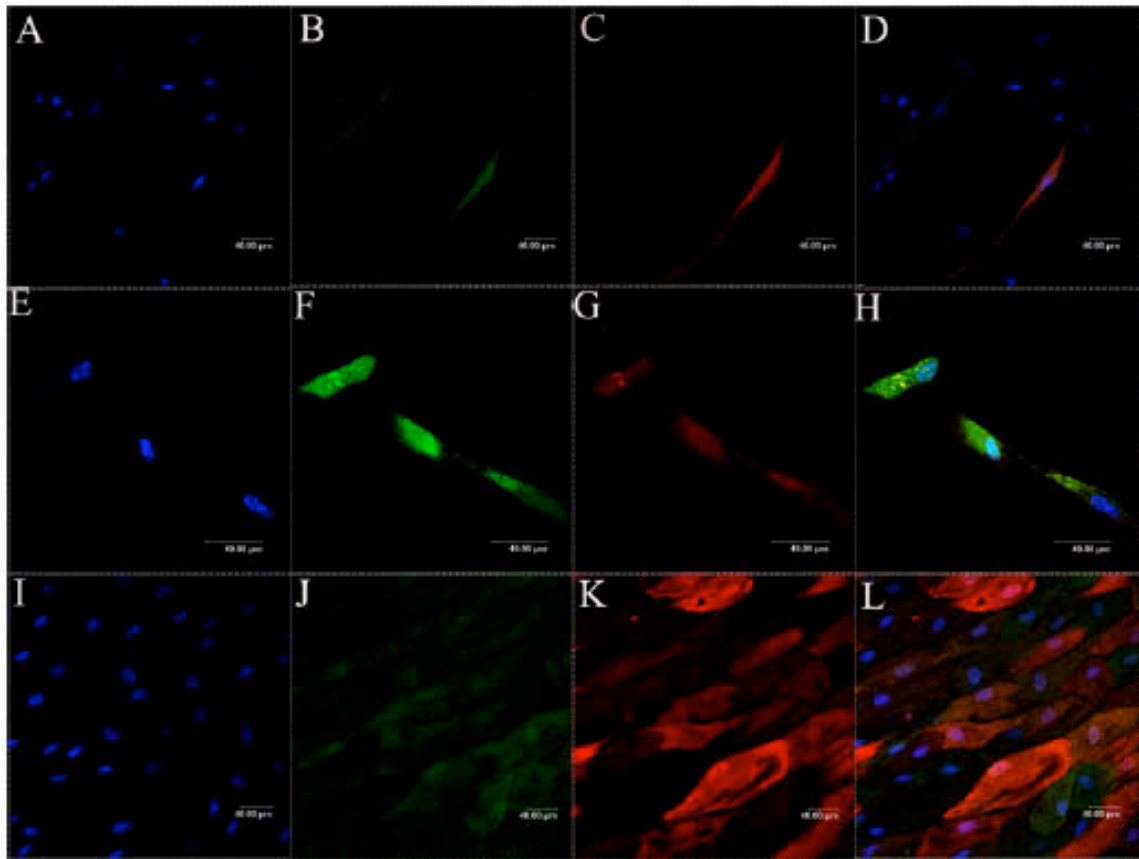
Sortiert wurden die eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen und eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen. Als Nullabgleich wurden nicht infizierte ADSC verwendet. Die ermittelten Werte für die einzelnen Fraktionen betragen zwischen drei bis zwölf Prozent für eGFP<sup>pos</sup>-Zellen, ein bis fünf Prozent für DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen, der prozentuale Anteil von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen lag zwischen 0,7 – 2,5%.



**Abbildung 21: FACS-Untersuchungen an simultan infizierten ADSC-Populationen.**

A) FACS-Analyse mit pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2 simultan infizierter ADSCs nach 72h. Auf der X-Achse ist logarithmisch die Intensität der grünen Fluoreszenz (eGFP; 488nm), auf der Y-Achse die der roten Fluoreszenz (DsRed2; 594nm) aufgetragen. Isoliert wurden die Zellen aus dem rechten oberen Quadranten (eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen). B) Zweite FACS-Analyse der aus der ersten Analyse gewonnenen eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen nach 14 Tagen der Expansion *in vitro*.

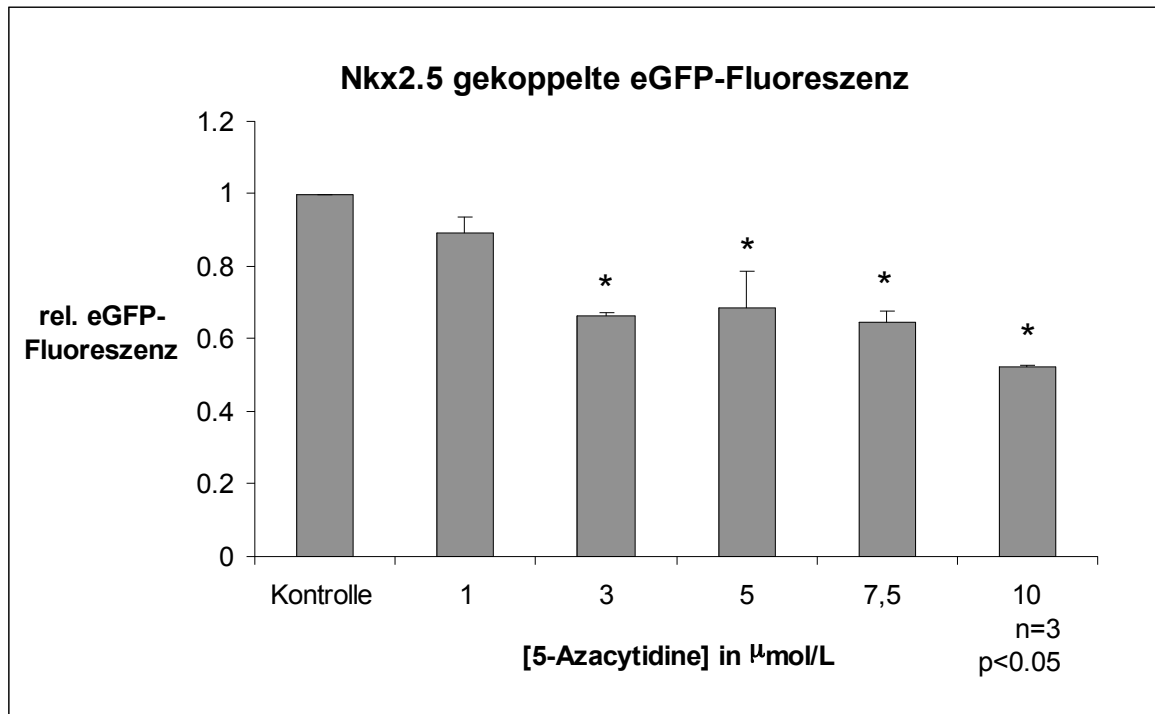
Die sortierten Zellen wurden nach zwei Wochen in Kultur unter Standardbedingungen erneut mittels FACS analysiert. Die Fraktion der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen betrug danach zwischen 60-80% der gesamten untersuchten Zellen. Der Anteil an eGFP<sup>pos</sup>-Zellen betrug durchschnittlich zwischen 5-16%, der DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen 0,5-7% und der eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen 4-15%.



**Abbildung 22: Konfokale Lasermikroskopie-Aufnahmen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen.**  
 (A-D) ADSC (Passage 1) kultiviert unter Standardbedingungen wurden parallel mit den beiden Lentiviren pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2 infiziert. (E-H) eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen nach der FACS-Analyse am 14. Tag. (I-L) Die sortierten Zellen proliferierten weiterhin (Tag 28 nach Infektion). (A,E,I): Kernfärbung mit Hoechst 33342 (Dapi 350nm); (B,F,J): EGFP<sup>pos</sup>-Zellen (FITC 488nm); (C,G,K): DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen (Texas Red, 594nm); (D,H,L): Overlay.

### ***4.3 5-Aza-Effekt auf die Nkx2.5-gekoppelte eGFP-Expression in ADSCs***

ADSCs wurden für 24h mit unterschiedlichen Konzentrationen 5-Azacytidine (5-Aza) inkubiert und danach unter Standardbedingungen inkubiert. Die FACS-Analyse nach drei Wochen zeigte, dass eine Inkubation mit steigender 5-Azacytidine-Konzentration zu einer dosisabhängigen Verringerung der relativen eGFP-Fluoreszenz innerhalb der ADSCs im Vergleich zu der Kontrollgruppe führte (ADSCs ohne Inkubation mit 5-Azacytidine).



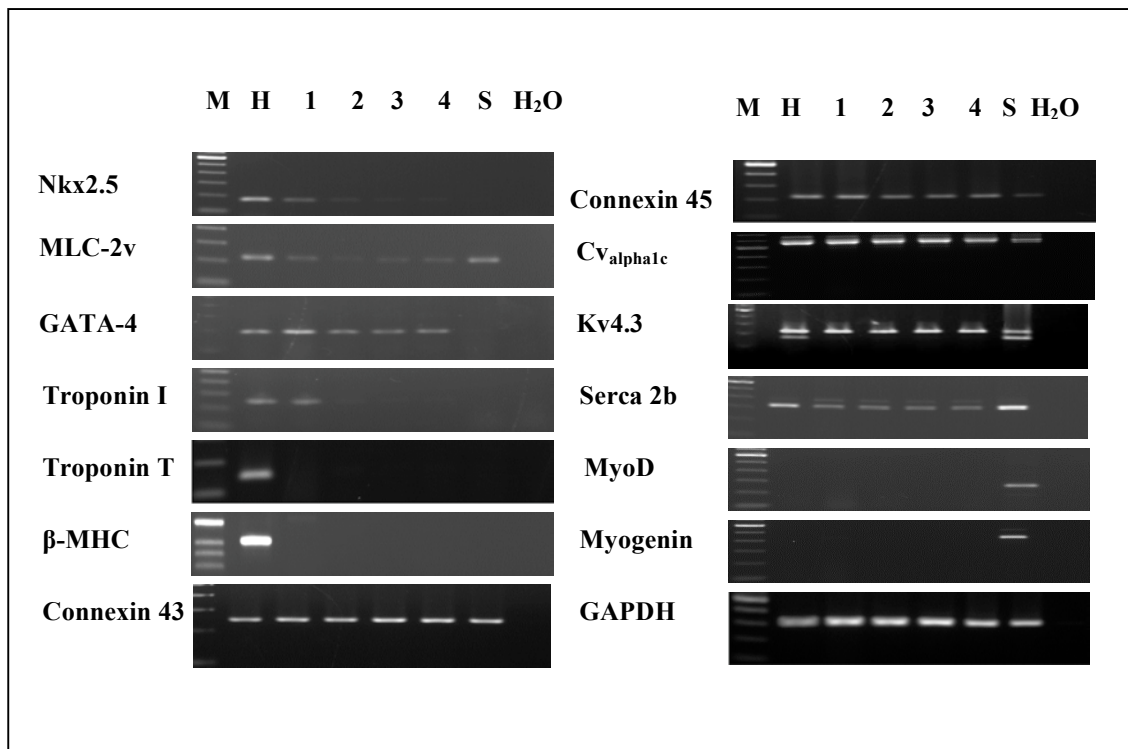
**Abbildung 23: Einfluss von 5-Aza-Inkubation (24h) auf die Expression von eGFP in ADSCs.** Die FACS Analyse erfolgte nach 21 Tagen Kultivierung unter Standardbedingungen. Relative eGFP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (ADSC ohne 5-Azacytidineinkubation; n=3). Die ADSCs wurden 72h vor dem Experiment mit dem Virus pNkx2.5-eGFP infiziert.

#### 4.4 RT-PCR- und Immunzytochemieanalyse der isolierten ADSCs

##### 4.4.1 RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit RNA von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen, eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen, infizierten (nicht sortierten) und nichtinfizierten ADSCs durchgeführt. Als Kontrollen dienten Herz- und Skelettmuskel-RNA (jeweils Ambion, Austin, TX, USA). Für die Standardisierung wurde das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH verwendet.

ADSCs exprimierten die Gene MLC-2v, Nkx2.5, GATA-4, Connexin 43, Connexin 45, Serca 2b, die  $\alpha$ -1c-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals (Cv<sub>α1c</sub>) sowie den spannungsgesteuerten Kaliumkanal Kv4.3 auf RNA-Level. Einzig eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zeigten RNA-Expression von Troponin I. Auch war die Expression für Nkx2.5 und MLC-2v höher als in den Vergleichsgruppen.



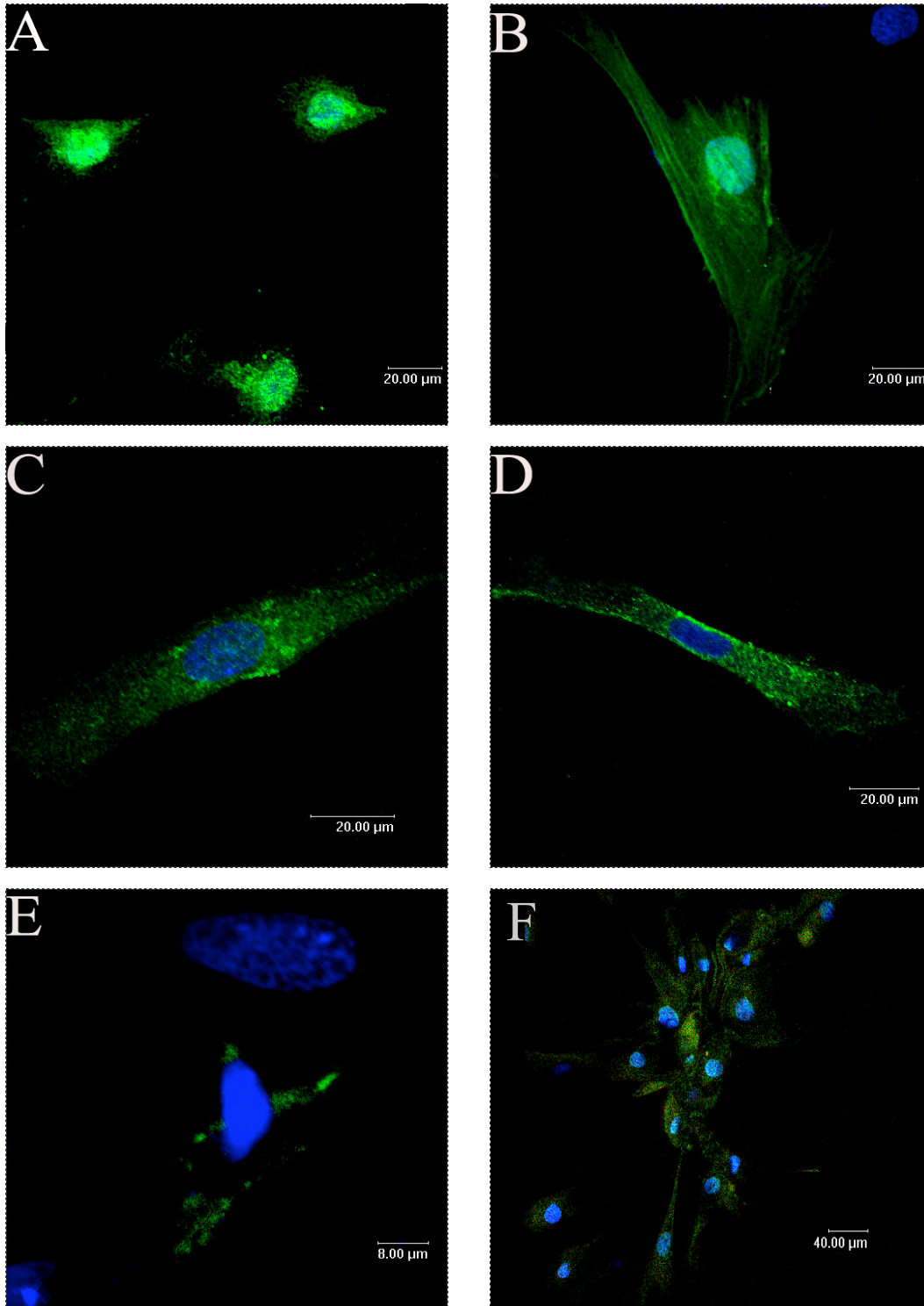
**Abbildung 24: RT-PCR-Ergebnisse von verschiedenen ADSC-Fraktionen.**

Legende: 1 = eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen; 2 = eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen; 3 = nicht infizierte ADSCs; 4 = infizierte ADSCs; M = DNA-Marker (Invitrogen); H = humane Herzmuskel-RNA; S = humane Skelettmuskel-RNA; H<sub>2</sub>O = Wasserprobe.

Kardiale Marker wie ANP, Troponin T,  $\beta$ -MHC konnten nicht detektiert werden. Die skelettalen Marker MyoD und Myogenin waren in keiner der ADSC-Fraktionen nachweisbar.

#### **4.4.2 Immunfluoreszenzfärbungen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen**

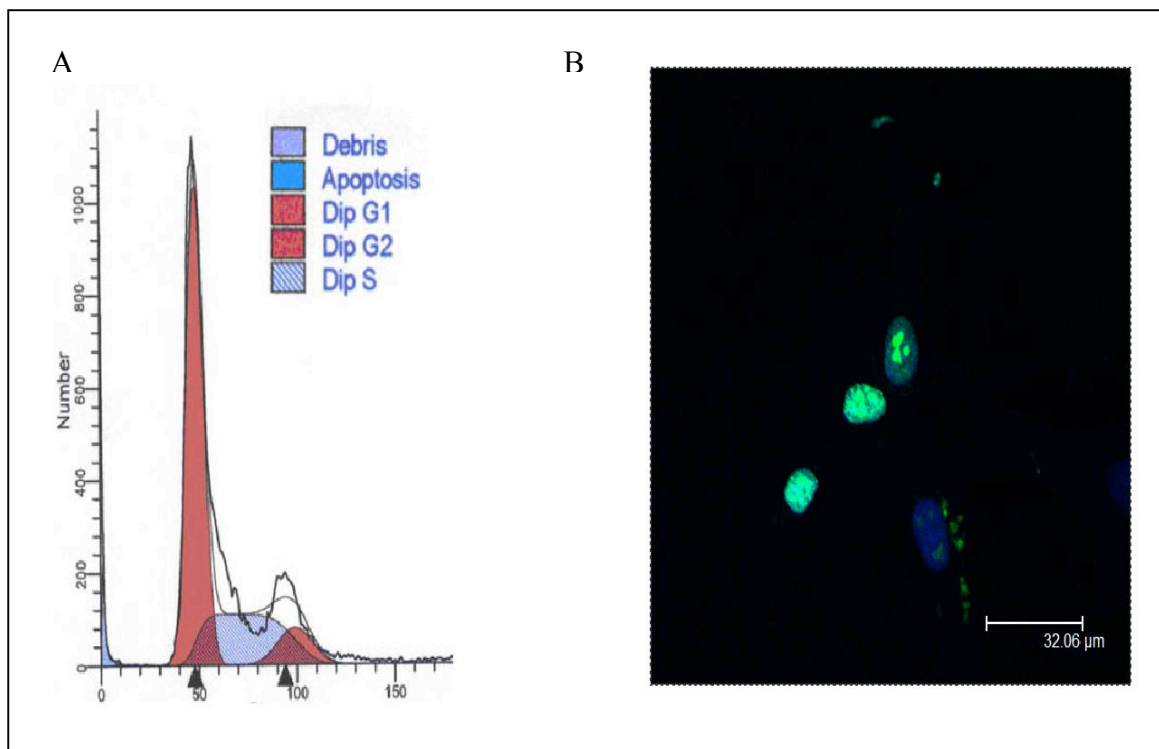
Die Aufnahmen wurden unter Verwendung des Leica TCS SP5 Systems (Leica Camera AG, Solms, Deutschland) erstellt. Die Messungen wurden bei den Exzitationswellenlängen von 350nm (DAPI), 488nm (FITC) und 596nm (Texas Red) vorgenommen. Die immunzytochemische Analyse zeigte, dass eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen die kardialen Nkx2. Marker 5, MLC-2v, Troponin I und die  $\alpha$ 1c-Untereinheit des L-Typ Calciumkanals (Cv <sub>$\alpha$ 1c</sub>) sowie das sarkomere Protein Titin exprimierten. Die kardialen Marker ANP und  $\beta$ -MHC waren nicht nachweisbar.



**Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen.**  
 Konfokale Lasermikroskopaufnahmen zeigen Expression von: A) Nkx2.5; B) MLC-2v; C) Troponin I; D) Titin; E) L-Typ-Calciumkanal  $\alpha 1c$ -Untereinheit; F) Overlay eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen (FITC/Texas Red/Dapi Filter) vor Fixierung. Hoechst 33424 Kernfärbung (Dapi; 350nm). 40x Vergrößerung.

#### 4.5 Zellzyklusanalyse von $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen

Ziel der Untersuchungen war es zu ermitteln, ob  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen nach kardiomyogener Differenzierung weiterhin den Zellzyklus durchlaufen. Die Analyse von  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen (Passage 4) mittels FACS ergab, dass 15-25% der Zellen sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Aktive DNA-Synthese fand somit weiterhin statt. Diese Ergebnisse wurden durch den immunzytochemischen Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigt. Dieser war in 60-80% der  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen nachweisbar.



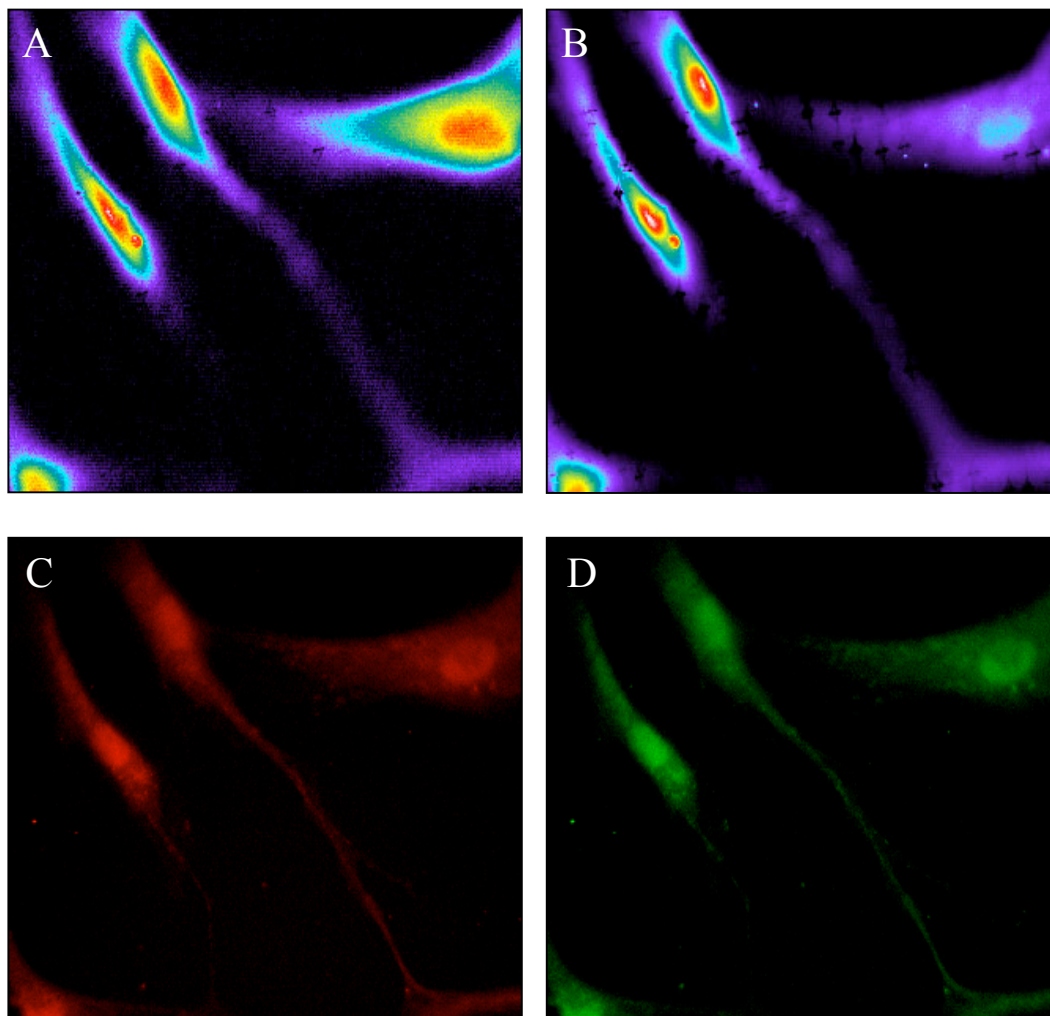
**Abbildung 26: Zellzyklusanalyse von kultivierten ADSCs.**

A) FACS-Analyse: Circa 20% der  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen befanden sich in der S-Phase des Zellzyklus. B) Konfokale Lasermikroskopaufnahme: Immunzytochemische Analyse: Mehr als 60% der  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen exprimieren Ki67 (grüne Fluoreszenz, FITC 488nm), Hoechst 33424 Kernfärbung (blaue Fluoreszenz, Dapi 350nm).

## 4.6 Elektrophysiologische Analyse von $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen

### 4.6.1 Calcium Imaging

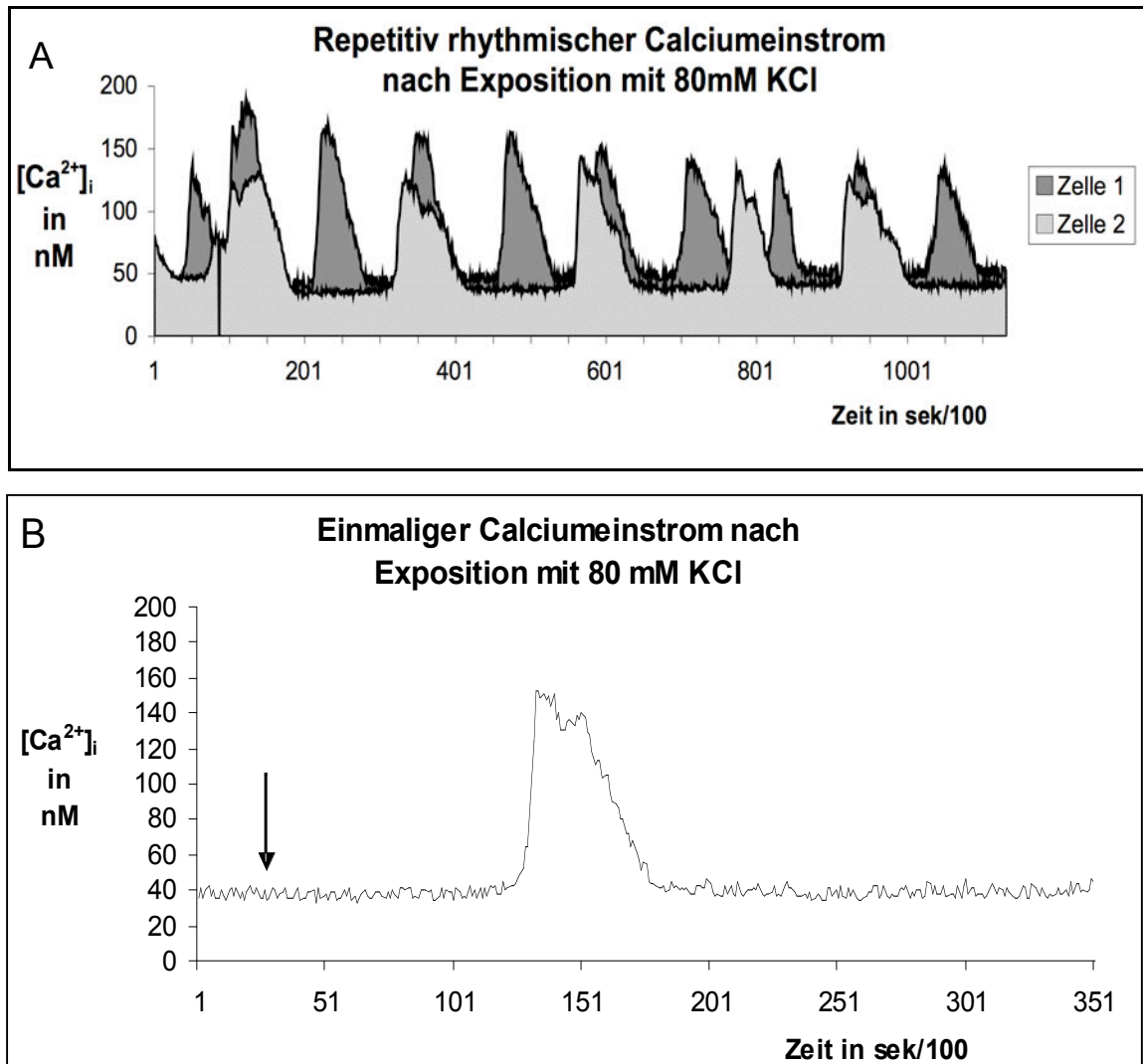
Durch den Einsatz der 340/380nm Ratiotechnologie konnten hochauflösend die Calciumströme gemessen werden. Die Analyse ergab, dass durchschnittlich 15-20% der  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen nach Stimulation mit 80mM KCl-Lösung eine L-Typ Calcium-Kanal spezifische Reaktion zeigten.



**Abbildung 27: Calciummessungen in kultivierten  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -ADSCs.**

A)  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen beladen mit Fura-2am Calciumindikator (Invitrogen) vor Stimulation mit 80mM KCl (Wellenlänge: 380nm). B)  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen nach Aktivierung (380nm). Die Zelle rechts oben im Bild depolarisierte nach Exposition mit 80mM KCl. Untere Reihe) Die  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen zeigen jeweilige Fluoreszenz bei Zwischenschaltung von C) Texas Red Filter (594nm) und D) FITC Filter (488nm).

Die errechnete Ratio von Fura-2am-gebundenem Calcium wurde mit einer Standardkurve verglichen, um die intrazelluläre Calciumkonzentration zu bestimmen. Einige Zellen zeigten zudem einen repetitiven Calciumeinstrom. Auffällig sind die unterschiedlichen Frequenzen der Calciumeinstrome.



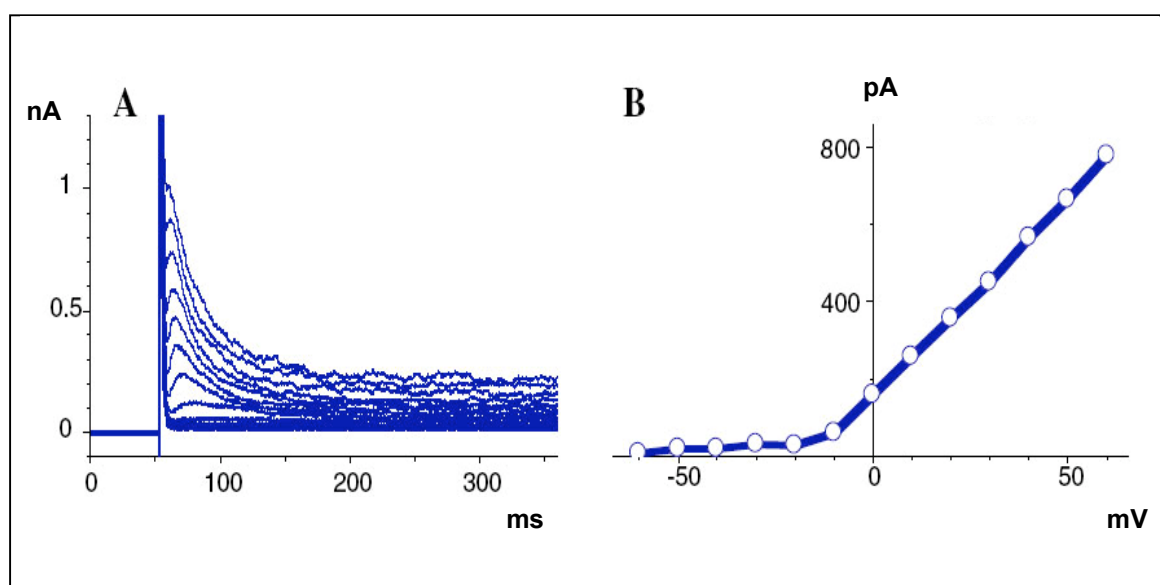
**Abbildung 28: Calciumkonzentrationsänderungen in ADSCs nach KCl Inkubation.**

A) Rhythmisch repetitive Calciumionenkonzentrationsänderung in zwei eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen nach Exposition mit 80mM KCl-Lösung. Die Dauer eines Zyklus beträgt in Zelle 1 1,27s und 2,13s bei Zelle 2. Der Strich signalisiert den Zeitpunkt des Beginns der KCl-Injektion. B) Der Graph zeigt eine nichtrepetitive Konzentrationsänderung des intrazellulären Calciums in einer eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zelle nach Exposition mit 80mM KCl. Der Pfeil signalisiert den Zeitpunkt des Beginns der KCl-Injektion.



#### 4.6.2 Patch Clamp

EGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen (Passage 4) wurden auf 15mm Glasplättchen (Fisher Scientific Inc.) in Zwölflochplatten ausgesät. Dabei wurde darauf geachtet, dass die eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zum Zeitpunkt der Patch Clamp Untersuchung abgerundet waren und nur punktuell adhärirten, sodass eine maximale Zelloberfläche zur Verfügung stand. EGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zeigten einen transienten Kaliumstrom vermittelt durch einen spannungsabhängigen Kaliumkanal.

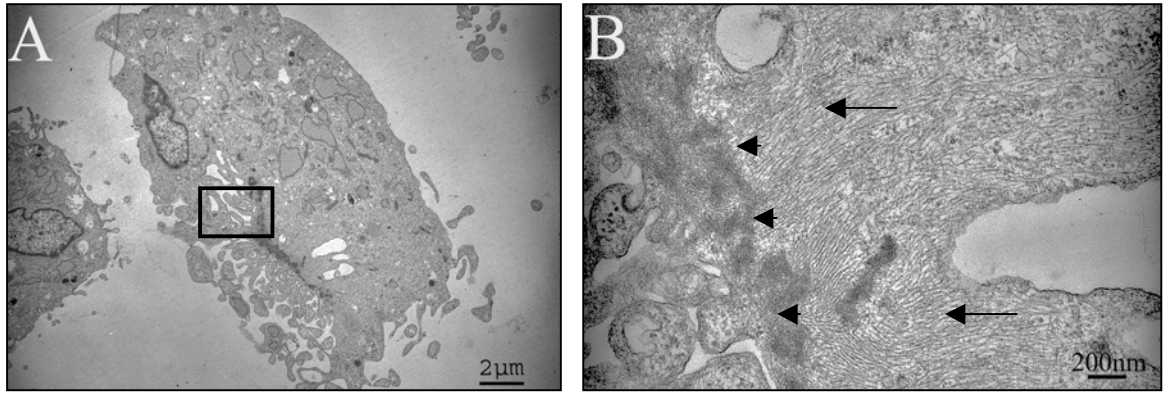


**Abbildung 29: Patch Clamp Kaliumstrombestimmung in eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen.**

A) EGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zeigten einen vorübergehenden Auswärtsstrom bei einem gehaltenen Potential von -80mV, vermittelt durch einen spannungsabhängigen Kaliumkanal. In 20mV-Schritten (300ms pro Schritt) wurde der Bereich von -60mV bis +80mV durchlaufen. Auf der X-Achse ist die Zeit in ms und auf der Y-Achse die Stromstärke in nA aufgetragen. B) Stromstärke- und Spannungskurve von A). Der Ionenstrom wurde bei -10mV aktiviert. Auf der X-Achse ist die Spannung in mV, auf der Y-Achse ist die Stromstärke in pA aufgetragen.

#### 4.7 TEM - Untersuchung von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen

In 3-5% Prozent der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen konnten organisierte Mikrofilamente beobachtet werden. Die Mikrofilamente waren parallel in Bündeln formiert und inserierten in subplasmalemalen Verdichtungszone, charakteristisch für kontraktile Zellen. Im Gegensatz dazu konnten in den untersuchten eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen derartige Mikrofilamentanordnungen nicht entdeckt werden. In keiner der beiden Gruppen wurden sarkomere Strukturen beobachtet.



**Abbildung 30: TEM-Aufnahme des Zytosols einer ADSC.**

Die TEM-Aufnahmen (A, B) zeigen Mikrofilamente in  $eGFP^{pos}/DsRed2^{pos}$ -Zellen. Abbildung B) entspricht der Vergrößerung der Box aus A). Die Pfeilspitzen in B) zeigen auf subplasmalemmale Matrixverdichtungen, die Pfeile auf die parallel angeordneten Mikrofilamente.

## **5. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass der Einsatz von lentiviralen Vektoren eine Methode zur Isolierung und Anreicherung von kardiomyozytären Zellen aus humanem subkutanem Fettgewebe darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass die gewonnenen eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen ein distinktes Genprofil innerhalb der ADSCs aufweisen. Neben der Expression von Nkx2.5 und MLC-2v in den eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen, exprimierten die eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen weitere kardiogene Gene. Die Daten der molekularbiologischen Untersuchungen wurden durch die Ergebnisse der elektrophysiologischen Analysen gestützt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte chronologisch analysiert und diskutiert.

### ***5.1 Virusvalidierung***

HOS-Zellen wurden mit steigender Konzentration von Viruspartikeln (pNkx2.5-eGFP und pMLC2v-DsRed2) infiziert, mit dem Ergebnis des dosisabhängigen Anstiegs an fluoreszierenden HOS-Zellen. Zur Kontrolle, ob die lentiviralen Konstrukte in das Genom der Wirtszellen (HOS) integrierten, wurden die Integrationseinheiten mittels Q-RT-PCR bestimmt. Für beide Konstrukte konnte gezeigt werden, dass zwischen Anstieg der Integrationseinheiten und eingesetztem Virusvolumen ein direkt proportionales Verhältnis besteht. Diese Ergebnisse bestätigten, dass die vorgenommenen genetischen Modifikationen die Funktionalität des Vektorsystems nicht beeinflussten.

### ***5.2 FACS-Analysen von infizierten Zellpopulationen***

Die Kontrollinfektionen wurden an ATCC2279<sup>TM</sup> Endothelzellen und NRCMs mit den Konstrukten pNkx2.5-eGFP und pCMV-eGFP durchgeführt. Es zeigte sich in den Endothelzellen, dass selbst bei den hohen Viruskonzentrationen (50µl/ml pNkx2.5-eGFP) weniger als 0,2% der Endothelzellen ein eGFP-Signal detektierbar war. Hingegen konnte mit gleichen Viruskonzentrationen von pCMV-eGFP in 15-20% der Endothelzellen ein eGFP-Signal hervorgerufen werden. Dieses Ergebnis

demonstrierte, dass der Austausch des CMV-Promotors gegen pNkx2.5 eine Gewebsrestriktion bewirkte.

Es fiel auf, dass die gleiche Virusdosis (pCMV-eGFP) in ADSCs und NRCMs in einer signifikant höheren eGFP-Positivität (durchschnittlich circa 30-40%) resultierten. Dies spricht dafür, dass Endothelzellen tendenziell weniger effizient von den Viruskonstrukten infiziert werden konnten. Vergleicht man die eGFP-Positivität für die Endothelzellinfektionen, zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Endothelzellen die mit maximaler Virusdosis pCMV-eGFP oder pNkx2.5-eGFP (17% versus 0,2%) infiziert wurden. Diese Ergebnisse lassen auf eine hohe Gewebsspezifität von schließen.

Die Infektion von NRCMs mit 50µl/ml pNkx2.5-eGFP resultierte in einer 3-5%igen eGFP-Positivität versus etwa 30% in der Vergleichsgruppe infiziert mit gleichen Mengen von pCMV-eGFP. Diese Diskrepanz könnte aufgrund einer Kontamination der primären NRCM-Zellkulturen mit Fibroblasten und glatten Muskelzellen beruht haben, welche während des Extraktionsprozesses nicht entfernt wurden. Da diese Zellfraktionen kein Nkx2.5 exprimierten, könnten diese Zellen nach mehreren Tagen der Kultivierung und Proliferation im Vergleich zu den nicht proliferierenden NRCMs das Ergebnis verzerrt haben. Wiederholte Untersuchungen mit kürzeren Inkubationszeiten sowie ein eventueller Einsatz von Mitose inhibierenden Substanzen wie Mitomycin würden weiteren Aufschluss geben, wie sensitiv der Einsatz von pNkx2.5-eGFP zur Detektion von kardialen Zelllinien ist. Zudem sollten simultane Infektionen der aufgelisteten Zelllinien mit beiden Vektoren durchgeführt werden, um die Sensitivität und Spezifität dieses Vektorsystems möglichst genau zu bestimmen.

Die FACS-Daten zeigten, dass eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen angereichert werden konnten. Die isolierten eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen behielten über mehrere Passagen den gleichen Phänotyp. Die Population von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen war nicht klonal und beinhaltete, wenn auch zu einem geringeren Anteil, weiterhin verschiedene ADSC-Fraktionen. Bisher gelang es uns nicht Einzelzellkulturen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zu expandieren. Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass es mindestens einen *in vitro* stabilen Phänotyp von kardiomyozytären Zellen gibt, der anhand der Vektorsysteme identifiziert und expandiert werden konnte. Die Verwendung von bicistronischen Vektoren mit integrierter Antibiotikaresistenz wäre eine technische Erweiterung und könnte zur hochspezifischen Selektion von kardiomyozytären Zellen beitragen.

Zum Vergleich, in einer Studie wurde ein rekombinantes Plasmid verwendet, in dem der MLC-2v-Promotor die Expression des Enhanced Green Fluorescent Proteins (eGFP) kontrollierte. Von den transduzierten murinen MSCs wurden mittels FACS Zellen mit hoher eGFP-Expression isoliert. Diese Zellen begannen nach drei Wochen in Kultur zu kontrahieren, exprimierten kardiale Marker wie  $\beta$ -MHC und MLC-2v und ordneten sich nach Transplantation parallel zu den Host-Kardiomyozyten an.<sup>110</sup>

### ***5.3 5-Aza-Effekt auf die Nkx2.5-gekoppelte eGFP-Expression in ADSCs***

Bisher konnte *in vitro* unter anderem an murinen und humanen mesenchymalen adulten Stammzellen des Knochenmarks die Induktion eines kardiomyozytären Phänotyps mittels 5-Azacytidine gezeigt werden.<sup>52, 77, 111</sup> Die eingesetzten 5-Azacytidine-Konzentrationen in unseren Experimenten entsprachen den Dosen verwendet in der Fachliteratur.<sup>36, 112</sup> Die FACS-Analyse der ADSCs nach drei Wochen in Kultur zeigte allerdings eine dosisabhängige Reduktion der eGFP-Expression nach 24stündiger Inkubation mit 5-Azacytidine. Keine der verwendeten Dosen führte zu einem prozentualen Anstieg der eGFP-Expression.

Eine Erklärung dafür wäre, dass bestimmte ADSC-Subpopulationen durch 5-Azacytidine eine Transdifferenzierung beginnen und somit partiell ihre Proliferationskapazität gegenüber den unbeeinflussten ADSCs einbüßten. In der Literatur wird argumentiert, dass nach dem Einsatz von 5-Azacytidine die Stammzellen vermindert auf induktive Effekte aus der Umgebung reagieren würden.<sup>113</sup> Modulierende Einflüsse auf die weitere Differenzierung der adulten Stammzellen könnten somit verloren gegangen sein. Des Weiteren ist es möglich, dass die höheren Konzentrationen von 5-Azacytidine (7,5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M) bereits toxische Wirkungen auf die ADSCs gehabt haben, wenn auch morphologische Korrelate lichtmikroskopisch nicht festzustellen waren. Die von Fukuda et al. beschriebene induzierbare kardiomyozytäre Ultrastruktur der kultivierten MSCs sowie spontane Zellkontraktionen nach 5-Azacytidine Inkubation konnten in unseren Untersuchungen nicht beobachtet werden.<sup>114</sup>

Insgesamt ist die Aussagekraft dieses Experiments limitiert. Eine Q-RT-PCR-Analyse der einzelnen Proben zu Beginn, im Verlauf und Ende der Kultivierung würde einen

detaillierten Eindruck von etwaigen Änderungen des Expressionsprofils der ADSCs geben. Ebenso könnte eine vergleichende elektrophysiologische Analyse der ADSCs mehr Informationen über eine etwaige Transdifferenzierung liefern.

Ingesamt ist jedoch zu bemerken, dass kein spezieller Zusatz im Induktionsmedium notwendig war, um eine basale Transdifferenzierung der ADSCs zu bewirken. Kritischerweise muss angemerkt werden, dass der Zusatz von FBS zum Kultivierungsmedium sowie die *in vitro* Kultivierungsbedingungen bereits eine Differenzierungsinduktion bewirken konnten. In unserem Falle verwendeten wir bis zu 20% FBS im Standardmedium, was möglicherweise einen induktiven Effekt ausübte. Es sollten daher weitere Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von FBS durchgeführt werden, um den Einfluss von FBS auf die Transdifferenzierung der ADSCs zu eruieren.

Durch den Einsatz von demethylierenden Substanzen wie 5-Azacytidine wird die Integrität der Stammzell-DNA angegriffen. Angesichts der Proliferationskapazität der Stammzellen könnte dies ein Risiko bezüglich Mutationen darstellen.

Die Kokultivierung von adulten Stammzellen mit NRCMs oder die Induktion mittels nuklearer und zytoplasmatischer Extrakte von NRCMs können hierbei wichtige Informationen über die involvierten Zell-Zell-Kontakte und parakrinen Mechanismen liefern, die für eine Transdifferenzierung verantwortlich sind.<sup>20, 115</sup>

Des Weiteren transdifferenzierten humane adulte MSCs nach Inkubation mit einem Cocktail aus Insulin, Dexamethason und Ascorbinsäure in kardiomyozytäre Zellen *in vitro*.<sup>78</sup> Die Verwendung von ausschließlich körpereigenen Substanzen als Induktionsmediumszusatz wäre zu bevorzugen, um eventuelle Immunreaktionen nach einer Transplantation zu vermeiden. Möglicherweise können Erkenntnisse der embryonalen Stammzellforschung genutzt werden, um alternative Wege zur Induktion von Kardiomyozyten aus adulten Stammzellen zu finden. So konnte gezeigt werden, dass der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und das Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) wichtig für die embryonale Kardiogenese sind.<sup>116-118</sup>

#### **5.4 RT-PCR-/Immunzytochemieanalyse von *eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>*-Zellen**

Unsere RT-PCR-Analyse ergab, dass ADSCs kardiale Gene wie Nkx2.5, MLC-2v und GATA-4 unter Standardkultivierungsbedingungen exprimierten. Nkx2.5 und GATA-4 sind Transkriptionsfaktoren, wobei Nkx2.5 als einer der ersten embryonalen

Marker gilt und für die Herzformation, die Ausbildung und die Aufrechterhaltung des Erregungsleitungssystems im adulten Phänotyp eine wesentliche Rolle spielt.<sup>94, 119-121</sup> Ferner ist für die Expression von MLC-2v die Präsenz von Nkx2.5 notwendig. Nkx2.5 reguliert die Expression von Connexin 43, einem gap junction Protein, welches wie Connexin 45 in sämtlichen ADSC-Fraktionen gefunden wurde. Die Ausbildung von gap junctions ist elementar für die synchrone Kontraktion im adulten Myokard. Gap junctions sind jedoch nicht herzspezifisch und kommen unter anderem im Gehirn und im Epithelverbund des Gastrointestinaltrakts vor.

GATA-4, ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor ist ebenso in hohem Maße in Kardiomyozyten verschiedener Entwicklungsstufen nachweisbar. GATA-4 ist in seiner Funktion von Bedeutung für Kardiogenese, insbesondere für die Ausreifung des atrialen Septums.<sup>122, 123</sup> GATA-4 reguliert zusätzlich die Expression von Nkx2.5, ANF und agiert als Kofaktor von Nkx2.5.<sup>119, 124, 125</sup> Die nachgewiesenen Nkx2.5, GATA-4 und MLC-2v sind jeweils frühe Marker von Kardio- und Ventrikulogenese. Einzig in eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen konnte kardiales Troponin I nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in keiner Fraktion der ADSCs die sarkomeren Proteine  $\beta$ -MHC und Troponin T detektiert werden. Unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen schienen somit keine ausdifferenzierten Kardiomyozyten innerhalb der ADSCs zu existieren. Diese Ergebnisse gingen einher mit den licht- und transelektronenmikroskopischen Untersuchungen, die keine Hinweise auf ausgereifte sarkomere Strukturen innerhalb der einzelnen ADSC-Fraktionen lieferten.

ADSCs transkribierten ferner die RNA des Kaliumkanals Kv4.3 und die der kardialen  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit eines L-Typ Calciumkanals. Dies lässt darauf schließen, dass ADSCs Eigenschaften exzitatorischer Zellen besitzen. Diese Ergebnisse ähnelten denen von Balana et al. und deren Experimenten an humanen MSCs.<sup>126</sup> Das ermittelte Expressionsprofil lässt darauf schließen, dass in einer Subfraktion der ADSCs frühe kardiomyozytäre Zellen existieren. Mittels immunzytochemischer Analyse konnte innerhalb der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen die Expression von MLC-2v, Nkx2.5, Troponin I und die  $\alpha_{1c}$ -Untereinheit eines L-Typ-Calciumkanals auch auf Proteinebene nachgewiesen und somit die Ergebnisse der RT-PCR bestätigt werden. Zugleich überprüften wir, ob innerhalb der ADSC-Fraktionen Markergene skelettaler Muskulatur exprimiert wurden. In keiner der ADSC-Fraktionen konnte eine Expression von MyoD und Myogenin nachgewiesen werden.

### **5.5 Zellzyklusanalyse von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen**

Die FACS-Analyse zeigte, dass sich circa 20% der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Darüber hinaus wurde in 70% der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen der Mitosemarker Ki-67 nachgewiesen. Diese Ergebnisse signalisieren, dass trotz einer kardiomyozytären Transdifferenzierung die Proliferationskapazität weiterhin bestehen blieb. Dies steht teilweise im Kontrast zu der in der Literatur beobachteten Verlängerung des Zellzyklus der transdifferenzierten humanen ADSCs und spricht wiederum für einen frühen kardialen Phänotyp der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen.<sup>115</sup> Zu überlegen wäre eine Zellzyklusanalyse nach weiteren Induktionsversuchen und verschiedenen Passagen, um den Zusammenhang einer möglichen Transdifferenzierung und deren Einfluss auf die Proliferationskapazität genauer zu verstehen.

### **5.6 Calcium Imaging und Patch Clamp Analyse**

Es konnte gezeigt werden, dass in etwa 15-20% der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen nach Inkubation mit 80mM KCl eine L-Typ-Calciumkanal charakteristische Reaktion auslösbar war. Bei der Patch Clamp Untersuchung zeigten einige eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen bei einem Membranpotential von -10mV einen transienten Kaliumionenausstrom ( $I_A$ ). Dieser ist charakteristisch für exzitatorische Zellen. Die Ergebnisse dieser funktionellen, elektrophysiologischen Untersuchungen bestätigen die Resultate der RT-PCR und Immunzytochemie. Gleichzeitig zeigte sich, dass die Fraktion von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen wiederum heterogen ist und möglicherweise Progenitorzellen verschiedener Entwicklungsstufen umfasst.

Experimente verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass murine und humane ADSCs *in vitro* kontrahieren und kardiospezifisch auf die Inkubation mit Sympathomimetika und Parasympathomimetika reagieren.<sup>51, 115</sup> Wichtig wäre es zu prüfen, inwiefern eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen auf die Inkubation mit Vertretern dieser Substanzgruppen reagieren. Dies könnte als weiterer Beweis für die Präsenz von kardiospezifischen Kanälen dienen und die bisherigen Ergebnisse erhärten.



### **5.7 TEM-Untersuchungen von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-ADSCs**

Die TEM-Analyse ergab, dass eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen keine strukturellen Äquivalente adulter Kardiomyozyten jedoch in einigen Zellen Merkmale myogener Zellen aufwiesen. Es fanden sich in 3-5% der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen organisierte Mikrofilamente. Die parallel angeordneten Mikrofilamente und subplasmalemalen Matrixverdichtungszone entsprachen in ihrer Ausprägung einem frühen myogenen Phänotypus. Im Gegensatz dazu, konnten keine derartigen Filamentanordnungen in eGFP<sup>neg</sup>/DsRed2<sup>neg</sup>-Zellen gefunden werden. Die morphologischen Entdeckungen stimmten in Teilen mit denen von Xu et al. überein, die in humanen MSCs beschrieben wurden.<sup>52</sup> Im Gegensatz dazu konnte die Expression von sarkomeren Strukturen aus *in vitro* Studien an murinen MSCs und ADSCs nicht bestätigt werden.<sup>51, 77, 115, 127</sup>

### **5.8 Erkenntnisse aus der experimentellen Stammzelltherapie**

Auf der Suche nach einer stammzellbasierten Therapie des Myokardinfarkts haben sich verschiedene Stammzellfraktionen als viel versprechend hervorgetan. Neben den hämatopoetischen, mesenchymalen und endothelialen Progenitorzellen werden seit einiger Zeit Stammzellen aus subkutanem Fettgewebe untersucht.<sup>50, 53, 57, 61, 128-134</sup>

Allen aufgeführten Zellen konnten experimentell proangiogene Eigenschaften nachgewiesen werden, sei es direkt durch endotheliale Transdifferenzierung (ADSCs oder MSCs) oder indirekt durch Sezernierung von proangiogenen Substanzen (ADSCs, MSCs oder EPCs). Es konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass MSCs sowie auch ADSCs in der Lage sind durch Transdifferenzierung einen kardialen Phänotyp anzunehmen.<sup>51, 52, 78, 115</sup> Die Transdifferenzierung ist unter anderem von endo-krinen, autokrinen, parakrinen, und elektromechanischen Einflüssen abhängig.

Das biologische Phänomen der Gewebsregeneration vermittelt durch autologe Stammzellen und die klinische Relevanz, welche sich daraus ergeben könnte, haben das Interesse von Wissenschaftlern und Ärzten geweckt. Verschiedene *in vivo* Experimente haben gezeigt, dass geschädigtes Myokard mittels Stammzellen aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut regeneriert werden könnte. Nach Injektion in infarzierte Herzen konnten positive Einflüsse auf die Ventrikelregeneration mit

sukzessiver Verbesserung der Ventrikelfunktion nachgewiesen werden.<sup>53, 57, 135</sup> Es ist belegt, dass endotheliale Progenitorzellen die Kapazität besitzen, Angiogenese zu induzieren und somit indirekt die Regeneration des Myokards positiv beeinflussen können.<sup>131, 136</sup> Auch murine MSCs konnten durch Transdifferenzierung in kardiomyozytäre Zellen untergegangenes Myokard ersetzen.<sup>58, 137</sup>

In Anbetracht dieser Ergebnisse existiert eine Diskussion über die zellulären Mechanismen, die in die strukturelle und funktionelle Regeneration des Myokards nach Stammzelltransplantation involviert sind.<sup>22, 138</sup> Neuere Ergebnisse stellen beispielsweise die Fähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen in Kardiomyozyten zu transdifferenzieren in Frage. Dies wirft unter anderem die Frage auf, ob Zellfusion oder Transdifferenzierung die Basis für die strukturelle Regeneration des Myokards darstellt.<sup>21, 22, 60</sup>

Den ADSCs wird ein MSC-ähnlicher Phänotyp und vergleichbare multilineare Potenz zugesprochen. Eine vergleichende Studie an MSCs und ADSCs ergab deutliche Gemeinsamkeiten bezüglich deren fibroblastenartiger Morphologie, des stabilen Phänotyps *in vitro* sowie ihrer Transkriptionsprofile.<sup>66</sup> Gleichzeitig konnte jedoch gezeigt werden, dass MSCs und ADSCs unter Durchlaufen verschiedener Signalkaskaden eine Transdifferenzierung in Osteozyten, Adipozyten sowie Chondrozyten vollziehen.<sup>139</sup>

Ein möglicher Vorteil der ADSCs für einen klinischen Einsatz gegenüber den MSCs ist die Verfügbarkeit. Bei einer durchschnittlichen Knochenmarksaspiration werden etwa 40ml, bei einer Liposuktion 200ml und mehr Volumen gewonnen. Studien belegen, dass aus 40ml Knochenmarksaspirat circa  $1,2 \times 10^9$  mononukleäre Zellen gewonnen werden können, worunter sich etwa  $2-3 \times 10^4$  Stammzellen befinden. In 200ml Lipoaspirat finden sich lediglich  $2 \times 10^8$  mononukleäre Zellen, jedoch ein höherer Anteil an Stammzellen.<sup>74</sup> Im Falle der interventionellen Behandlung von Myokardinfarkten könnte die Autotransplantation einer kritischen Anzahl von ADSCs innerhalb von Stunden ein Vorteil gegenüber dem Einsatz von MSCs sein.

In der Studie von Miyahara et al. wurden aus Fettgewebe gewonnene mesenchymale Stammzellen als Einzelzellschicht kultiviert und anschließend auf vernarbtes Myokard von Rattenherzen vier Wochen nach Infarkt transplantiert. Im Vergleich zu den Vergleichstieren mit transplantierten Fibroblasten wurde in der Stammzellgruppe eine vermehrte Angiogenese, eine verbesserte Ventrikelfunktion sowie die Neuentstehung von Kardiomyozyten registriert.<sup>140</sup>

Die intramyokardiale Injektion von ADSCs der Ratte in einem chronischen Myokardinfarktmodell war mit einer funktionellen Verbesserung des Ventrikels assoziiert. Dabei waren die Ergebnisse besser als in den Versuchsgruppen, in denen Knochenmarkstammzellen und kardiomyozytäre Zellen injiziert wurden.<sup>141</sup>

In der Myokardinfarktstudie von Valina et al. am Schwein zeigten ADSCs und Knochenmarkstammzellen nahezu identische Verbesserungen der linkventrikulären Pumpfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. ADSCs wurden zudem in neugebildeten Gefäßen detektiert.<sup>142</sup>

Die Myokardinfarktstudie von Strem et al. zeigte, wie intrakardial injizierte murine ADSCs in infarzierte Regionen migrierten und kardiale Marker exprimierten. Gleichzeitig waren keine der charakteristischen Marker von Leukozyten, Endothelzellen oder Skelettmuskelzellen innerhalb der injizierten Zellpopulation nachweisbar.<sup>79</sup>

Dies sind wertvolle Erkenntnisse aus der Verwendung von autologen ADSCs als Adjuvanz in der Therapie des Myokardinfarkts. Zu beantworten bleibt, welche Mechanismen primär zur verbesserten Ventrikelfunktion führen. Es wird argumentiert, dass Stammzellen zum Teil durch parakrine Effekte agieren, welche vor allem eine Angiogenese initiieren.<sup>143, 144</sup> Wie bereits beschrieben, konnten murine ADSCs *in vitro* in kardiomyozytäre Zellen differenziert werden und es gibt Hinweise, dass ADSCs auch *in vivo* transdifferenzieren.<sup>51, 79</sup> Die Daten der hier vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass auch humane ADSCs das Potential zur kardialen Transdifferenzierung besitzen. Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da wir einen rein deskriptiven Arbeitsansatz gewählt haben, ohne Einsatz von speziellen Induktionsmedien oder Co-Kulturmethode. Zwar konnten wir keine spontan kontrahierenden Zellen im Verlauf der Experimente beobachten wie in den Untersuchungsreihen von Planat-Benard et al. an murinen ADSCs.<sup>51</sup> Es war uns jedoch möglich unter Standardkulturbedingungen humane ADSC-Fraktionen mit kardialen Genprodukten reproduzierbar zu identifizieren, zu isolieren und ohne Verlust des Phänotyps *in vitro* zu expandieren. Eine Verwendung der isolierten Zellen im Rahmen einer Stammzelltherapie erscheint somit theoretisch durchführbar. Auch ist nicht ausgeschlossen, dass die Verwendung von Spezialmedien, Co-Kulturtechniken mit Kardiomyozyten oder die intramyokardiale Injektion der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zu einer zusätzlichen kardiomyozytären Ausreifung führen könnte.

### **5.8.1 Stand der klinischen Erkenntnisse**

Die Forschungsprogramme zur Ermittlung des Nutzens von Knochenmarksstammzellen zur Therapie von Herzinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz haben positive Ergebnisse geliefert. In der doppelt-verblindeten Phase-II-Studie Repair-AMI wurden wichtige Schritte unternommen, um klinische Endpunkte der Sicherheit und des Behandlungserfolges zu definieren.<sup>145</sup>

Ein Problem dieser Studie jedoch war, dass keine Langzeitdaten in Bezug auf Sicherheit und quantifizierbarer Verbesserung des Patienten erhoben wurden. Die kurzfristig ermittelten Sicherheitsprofile suggerierten, dass die Zelltransplantation unter ausreichender Überwachung nur mit einem minimalen Risiko für Arrhythmien einherging. Der Langzeiteffekt bleibt weiterhin fraglich, insbesondere da die parakrinen Effekte der Stammzellen nur kurzfristig nachweisbar sind. Hinsichtlich des Einsatzes von Zelltherapien zur Behandlung von progredienter Herzinsuffizienz ist die Frage zu beantworten, ob ein akuter Effekt signifikant eine chronische Erkrankung modulieren kann.<sup>17, 145, 146</sup>

Die Vorstellung Stammzellen gezielt in spezifische Zelllinien zu transdifferenzieren und sie in diesem Zustand halten zu können, auch *in vivo*, stellt weiterhin eine große Herausforderung dar. Des Weiteren bleibt zu klären, wie die Anzahl der Stammzellen, deren Differenzierungsstufe, der Zeitpunkt und die Form der Applikation für das jeweilige Erkrankungsbild ideal gewählt sind. Erschwerend dazu gibt es Hinweise, dass die Anzahl der Stammzellen mit dem Alter der Patienten geringer wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Telomerlänge in den Stammzellen umgekehrt proportional mit dem Alter des untersuchten Patienten abnimmt.<sup>147</sup> Auch ist unklar, inwiefern genetische Aberrationen der adulten Stammzellen, kongenital oder erworben, eine potentielle Bedrohung für die Patienten darstellen.

### **5.9 Ausblick**

Erkenntnisse über die molekularen Regulationsmechanismen von Proliferation und Differenzierung der ADSCs werden von Nutzen für das bessere Verständnis von Kultivierungs- und Differenzierungsmethoden sein. Weitere Entwicklungen der interventionellen Technologien, Erkenntnisse über endokrinologische Zusammenhänge von Gewebeschädigung und Stammzellrekrutierung sowie tiefere

Einblicke in die Physiologie von humanen adulten Stammzellen werden die Grundlage für zukünftige klinische Einsätze darstellen.

In Bezug auf die vorliegende Arbeit bleibt zu ermitteln, ob eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen *in vitro* weiter differenziert werden können. Substanzen wie 5-Azacytidine und die Extrakte von Rattenkardiomyozyten konnten bereits als induktive Zusätze etabliert werden.<sup>115, 127</sup> Fraglich ist, welche Effekte diese Substanzen auf die Integrität der Stammzell-DNA ausüben. Auch ist es möglich, dass die Inkubation von humanen Stammzellen mit xenogenen Zellextrakten die Expression von potentiell immunogenen Substanzen induziert. Diese Problematiken könnten den Einsatz der modifizierten Stammzellen für eine Transplantation erschweren. Die Reportergentechnologie wird womöglich vermehrt experimentell dazu genutzt, um Stammzellen zu isolieren, diese im Detail zu analysieren und nach Transplantation im Wirtsorganismus leichter detektieren zu können.

Ein denkbarer Ansatz zur Verbesserung ist die Selektion der kardiomyozytären Zellen auf Basis von Antibiotikaresistenzen. In bicistronischen Vektoren, in denen zwei Gene in Reihe geschaltet sind, könnte die Fluoreszenz- und Antibiotikaresistenzexpression simultan durch kardiale Promotor kontrolliert werden.<sup>90</sup> Der Selektionsprozess würde damit spezifischer und effizienter.

Eine weiterführende Aufgabe, die in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde, ist eine Oberflächenantigenanalyse der isolierten Zellfraktionen. Diese wäre hilfreich, um die isolierten eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen mit den Populationen von kardiomyozytären Stammzellen anderer Arbeitsgruppen sowie dem bekannten Oberflächenprofil der ADSCs vergleichen zu können.<sup>68</sup> Verschiedene Arbeiten adressierten die Problematik der Charakterisierung von MSCs und ADSCs mit der Erkenntnis, dass große Ähnlichkeiten in Multilinearität und Genexpressionsprofil zwischen beiden Populationen bestünden. Im Gegensatz dazu ist relativ wenig bekannt über das Oberflächenantigenprofil der beschriebenen kardiomyozytären Zellen. Eine Oberflächenantigenanalyse kann zudem wichtige Informationen liefern, um Selektionskriterien zu etablieren, die es ermöglichen Zellfraktionen zu isolieren, ohne dabei die Integrität der Zell-DNA durch Gentransfer oder Induktionsversuche zu beeinflussen.

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse würden dann helfen, die kardiomyozytären Zellen mittels FACS-Analyse zu isolieren. Im Falle eines akuten Myokardinfarkts könnten somit theoretisch innerhalb von Stunden nach Exzision des

subkutanen Fettgewebes Zellen zur Transplantation zur Verfügung stehen. Die Daten zeigten, dass das humane subkutane Fettgewebe eine Fraktion von spontan differenzierenden kardiomyozytären Zellen enthält, welche mehrere wesentliche Charakteristika von adulten Kardiomyozyten aufwiesen. Unser Ansatz des Gentransfers liefert möglicherweise ein System zur Isolierung von humanen adulten kardiomyozytären Zellen für die Therapie des akuten Myokardinfarkts dar. ADSCs könnten aufgrund ihres Differenzierungspotentials, ihren interessanten parakrinen Eigenschaften sowie der großen Verfügbarkeit innerhalb der adulten Stammzellen eine relevante Rolle einnehmen.

## 6. Zusammenfassung

### Einleitung:

Ein Myokardinfarkt führt zum Untergang von kontraktilen Gewebe. Auf der Suche nach alternativen Ansätzen für die Behandlung des akuten Myokardinfarkts bietet die Stammzell- und Gentherapie interessante Möglichkeiten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine kardiomyozytäre Zellfraktion aus dem humanen subkutanen Fettgewebe zu isolieren.

### Methoden:

Unter Verwendung von klonierten lentiviralen Vektoren in denen die kardialen Promotoren pNkx2.5 und pMLC-2v die Expression der Reportergene eGFP und DsRed2 kontrollierten, wurden die humanen ADSCs infiziert. Die infizierten ADSCs wurden durch FACS fraktioniert und unter anderem mittels RT-PCR, Immunzytochemie, Calcium-Imaging, Patch-Clamp und Zellzyklusanalysen charakterisiert. Des Weiteren wurde der Effekt einer Inkubation mit 5-Azacytidine auf die Nkx2.5-gekoppelte eGFP-Expression untersucht.

### Ergebnisse:

Es zeigte sich, dass ein bestimmter Subtyp von eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen zwischen 0,7-2,5% der ADSCs ausmachte. Diese Zellen zeigten ein von den anderen ADSC-Fraktionen unterschiedliches Genexpressionsprofil. Sie wiesen das höchste Expressionsniveau der kardialen Marker Nkx2.5 und MLC-2v auf. Als einzige Subpopulation exprimierten sie Troponin I. Diese Ergebnisse konnten durch immunzytochemische Analysen bestätigt werden. Die eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen konnten *in vitro* expandiert werden, ohne ihre kardiomyozytäre Genexpression einzubüßen. Die molekularen Marker quergestreifter Muskulatur MyoD und Myogenin wurden nicht nachgewiesen. Eine skelettmuskuläre Differenzierung ist somit unwahrscheinlich. Die Präsenz von spannungsabhängigen L-Typ-Calcium- und Kaliumkanälen wurde durch RT-PCR, Immunzytochemie, Calcium-Imaging und Patch Clamp-Analysen bestätigt.

Die durchgeführte Zellzyklusanalyse ergab, dass der Großteil der eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen den Mitosemarker Ki-67 exprimierte. Zwischen 15-25% der

eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen befanden sich in der S-Phase des Zellzyklus. Die Induktionsversuche mit 5-Azacytidine resultierten in einer dosisabhängigen, signifikanten Verringerung der Nkx2.5-gekoppelten eGFP-Expression. Bemerkenswerterweise war die eGFP-Expression ohne 5-Azacytidine-Zusatz im Medium am höchsten ausgeprägt.

### **Diskussion:**

Die vorgelegten Daten konnten zeigen, dass das humane subkutane Fettgewebe eine Fraktion von spontan differenzierenden kardiomyozytären Zellen enthält, welche mehrere wesentliche Charakteristika von adulten Kardiomyozyten aufwiesen. Unser Ansatz des Gentransfers liefert möglicherweise ein System zur Isolierung von geeigneten humanen adulten kardiomyozytären Zellen für die Therapie des akuten Myokardinfarkts.



## 7. Summary

### **Introduction:**

Myocardial infarction (MI) leads to a loss in cardiac tissue. Cardiac repair using cellular therapies is one potential conceivable new therapeutic option. In this study we investigated the potential of human adipose-derived stem cells (ADSCs) to differentiate into cardiomyogenic cells.

### **Methods:**

For analytical purposes we cloned two HIV-based lentiviral vectors in which Nkx2.5 and MLC-2v promoters controlled the expression of the fluorescent dyes eGFP and DsRed2. ADSCs were infected with both lentiviral vectors simultaneously and 48-72h later analyzed by FACS. eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-cells were investigated using e.g. RT-PCR, immunohistochemistry, Fura-2-calcium imaging, patch clamp and cell cycle analysis.

### **Results:**

Between 0.7-2.5% among regular ADSCs expressed eGFP and DsRed2 simultaneously. Sorted eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-cells expressed cardiomyocyte-specific mRNAs including: Nkx2.5, MLC-2v, GATA-4, Troponin I and L-type calcium channel alpha-1c subunit (Cav1.2). The skeletal markers MyoD, Myogenin were not detected. 15-20% of eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-cells showed L-type calcium channel specific response and patch clamp analysis revealed cardiac potassium channel presence in some cells. Cell cycle analysis showed that 20% of the cells were in the S-phase and more than 60% expressed mitosis marker Ki-67.

### **Conclusion:**

Our studies indicate that spontaneously transdifferentiating cardiomyogenic cells can be isolated from ADSCs *in vitro* using lentiviral fluorescent indicators and FACS. The isolated cells did not resemble a fully differentiated cardiac phenotype yet showed several characteristics of adult cardiomyocytes.

## **8. Danksagung**

Die vorliegenden Daten sind das Resultat von Arbeiten an der Tulane University in New Orleans und an dem M.D. Anderson Cancer Center in Houston, USA im Zeitraum vom April 2004 bis Oktober 2005. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Parwis Fotuhi für das in mich gesetzte Vertrauen und seinen Einsatz über das Wissenschaftliche hinaus positiv meine persönliche Entwicklung zu beeinflussen. Vor allem danke ich ihm für die konstruktive, freundschaftliche Kritik.

Herrn Professor Dr. E. Alt danke ich für die exzellenten Arbeitsbedingungen in seinen Laboren an der Tulane University in New Orleans und dem MD Anderson Cancer Center in Houston. Der offene und kollegiale Umgang war entscheidend für die angenehme Zusammenarbeit.

Bei Herrn Professor Dr. G. Baumann bedanke ich mich vor allem für die Hilfe bei der rechtlichen Durchführung des Austauschprogramms.

Bei Frau K. Daemen möchte ich mich ganz besonders für Ihre stets exzellente, unermüdliche und freundschaftliche Unterstützung danken. Frau Dr. X. Bai danke ich für die großartige Zusammenarbeit auch über die Zeit des Austauschprogramms hinaus. Dr. Kai Pinkernell danke ich für das Anlernen wesentlicher Techniken während meines Forschungsaufenthaltes.

Herrn Prof. Dr. K. Chien danke ich für die Bereitstellung von Plasmid-DNA. Herrn Prof. Dr. W. C. Claycomb und Frau Dr. M. L. Lam danke ich für den fachlichen Rat bei den Klonierungsarbeiten. Für die Bereitstellung ihrer Ressourcen zur Herstellung der Lentiviren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Reiser und Herrn R. Kutner bedanken. Auch bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. M. Li für den freien Zugang zu den Instrumenten zur intrazellulären Calciumbestimmung.

Leena Pradhan gilt mein ganz persönlicher Dank. Ihre immerwährende, liebevolle Unterstützung ermöglichte es mir diese Arbeit abzuschließen. Mein besonderer Dank gilt nicht zuletzt meinen lieben Eltern. Sie standen mir stets aufopferungsvoll zur Seite.

## 9. Literaturverzeichnis

1. WHO. World Health Organization - Cardiovascular Disease. 2008.
2. Mollmann H, Elsasser A, Nef HM, Weber M, Hamm CW. [Acute coronary syndrome with and without ST elevation]. *Herz*. 2006;31(9):820-826.
3. Lowel H, Meisinger C. [Epidemiology and demographic evolution exemplified for cardiovascular diseases in Germany]. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(10):804-811.
4. Wienbergen H, Gitt AK, Senges J. [Actual clinical practice of guideline-recommended therapy of acute ST elevation myocardial infarction]. *Herz*. 2005;30(8):700-703.
5. Rovai D, Bella GD, Rossi G, Lombardi M, Aquaro GD, L'Abbate A, Pingitore A. Q-wave prediction of myocardial infarct location, size and transmural extent at magnetic resonance imaging. *Coron Artery Dis*. 2007;18(5):381-389.
6. Weir RA, McMurray JJ. Epidemiology of heart failure and left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction. *Curr Heart Fail Rep*. 2006;3(4):175-180.
7. Tebbe U, Messer C, Stammwitz E, The GS, Dietl J, Bischoff KO, Schulten-Baumer U, Tebbenjohanns J, Gohlke H, Bramlage P. [Reduction of in-hospital mortality and improved secondary prevention after acute myocardial infarction. First results from the registry of secondary prevention after acute myocardial infarction (SAMI)]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2007;132(30):1559-1566.
8. Kober L, Torp-Pedersen C, Carlsen JE, Bagger H, Eliassen P, Lyngborg K, Videbaek J, Cole DS, Auclert L, Pauly NC. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Trandolapril Cardiac Evaluation (TRACE) Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333(25):1670-1676.
9. Dargie HJ. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. *Lancet*. 2001;357(9266):1385-1390.
10. Ball SG, Hall AS, Murray GD. ACE inhibition, atherosclerosis and myocardial infarction--the AIRE Study in practice. Acute Infarction Ramipril Efficacy Study. *Eur Heart J*. 1994;15 Suppl B:20-25; discussion 26-30.
11. Dickstein K, Kjekshus J. Effects of losartan and captopril on mortality and morbidity in high-risk patients after acute myocardial infarction: the OPTIMAAL randomised trial. Optimal Trial in Myocardial Infarction with Angiotensin II Antagonist Losartan. *Lancet*. 2002;360(9335):752-760.
12. Ambrosioni E, Borghi C, Magnani B. The effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. The Survival of Myocardial Infarction Long-Term Evaluation (SMILE) Study Investigators. *N Engl J Med*. 1995;332(2):80-85.
13. Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghide M, Aschermann M, van Veldhuisen DJ, Zannad F, Krum H, Mukherjee R, Vincent J. Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(3):425-431.

14. Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomised placebo-controlled international trial. The MIAMI Trial Research Group. *Eur Heart J*. 1985;6(3):199-226.
15. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *Jama*. 2001;285(13):1711-1718.
16. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *Bmj*. 1994;308(6921):81-106.
17. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1222-1232.
18. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009-3017.
19. Dobert N, Britten M, Assmus B, Berner U, Menzel C, Lehmann R, Hamscho N, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM, Grunwald F. Transplantation of progenitor cells after reperfused acute myocardial infarction: evaluation of perfusion and myocardial viability with FDG-PET and thallium SPECT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(8):1146-1151.
20. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation*. 2003;107(7):1024-1032.
21. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation*. 2003;108(17):2070-2073.
22. Zhang S, Wang D, Estrov Z, Raj S, Willerson JT, Yeh ET. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation*. 2004;110(25):3803-3807.
23. Zeng X. Human embryonic stem cells: mechanisms to escape replicative senescence? *Stem Cell Rev*. 2007;3(4):270-279.
24. Collas P, Noer A, Timoskainen S. Programming the genome in embryonic and somatic stem cells. *J Cell Mol Med*. 2007;11(4):602-620.
25. Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008;132(4):583-597.
26. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88(3):287-298.
27. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132(4):598-611.
28. Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*. 2008;451(7181):937-942.

29. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8):1128-1135.
30. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-776.
31. Biswas A, Hutchins R. Embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007;16(2):213-222.
32. Bang AG, Carpenter MK. Development. Deconstructing pluripotency. *Science*. 2008;320(5872):58-59.
33. Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentiation of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*. 1999;165(3-4):131-143.
34. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*. 2002;91(3):189-201.
35. Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca<sup>2+</sup> channel blockers. *Differentiation*. 1991;48(3):173-182.
36. Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, You S, Lee HT, Yoon HS. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation*. 2006;74(4):149-159.
37. Yang C, Przyborski S, Cooke MJ, Zhang X, Stewart R, Anyfantis G, Atkinson SP, Saretzki G, Armstrong L, Lako M. A key role for telomerase reverse transcriptase unit in modulating human embryonic stem cell proliferation, cell cycle dynamics, and in vitro differentiation. *Stem Cells*. 2008;26(4):850-863.
38. Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(3):167-179.
39. Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*. 2002;2(4):257-265.
40. Drukker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9864-9869.
41. Solomon LM, Brockman-Lee SA. Embryonic stem cells in science and medicine, part II: Law, ethics, and the continuing need for dialogue. *Genet Med*. 2008;5(1):3-9.
42. Green RM. Can we develop ethically universal embryonic stem-cell lines? *Nat Rev Genet*. 2007;8(6):480-485.
43. Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, Gimble JM. Differentiation of adipose stem cells. *Methods Mol Biol*. 2008;456:155-171.
44. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-1446.

45. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25(11):2739-2749.
46. Tonti GA, Mannello F. From bone marrow to therapeutic applications: different behaviour and genetic/epigenetic stability during mesenchymal stem cell expansion in autologous and foetal bovine sera? *Int J Dev Biol*. 2008;52(8):1023-1032.
47. Salgado AJ, Oliveira JT, Pedro AJ, Reis RL. Adult stem cells in bone and cartilage tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1(3):345-364.
48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
49. Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2006;1(3):365-369.
50. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-4295.
51. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res*. 2004;94(2):223-229.
52. Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229(7):623-631.
53. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-705.
54. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Yacoub MH. Selective cell dissemination into the heart by retrograde intracoronary infusion in the rat. *Transplantation*. 2004;77(5):757-759.
55. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, Xie JS, Cattaneo S, Durand DJ, Fitton T, Kuang JQ, Stewart G, Lehrke S, Baumgartner WW, Martin BJ, Heldman AW, Hare JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(32):11474-11479.
56. Barandon L, Couffinhal T, Dufourcq P, Alzieu P, Daret D, Deville C, Duplaa C. Repair of myocardial infarction by epicardial deposition of bone-marrow-cell-coated muscle patch in a murine model. *Ann Thorac Surg*. 2004;78(4):1409-1417.
57. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2003;108(18):2212-2218.
58. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K, Kitamura S. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction

- through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287(6):H2670-2676.
59. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, Matsui K, Yamamoto K, Terao K, Shimada K, Ikeda U, Ozawa K, Hanazono Y. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells*. 2005;23(3):355-364.
  60. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-668.
  61. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-228.
  62. Fujimura J, Ogawa R, Mizuno H, Fukunaga Y, Suzuki H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;333(1):116-121.
  63. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol*. 2004;187(2):319-328.
  64. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25(4):818-827.
  65. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003;89(2-3):267-270.
  66. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-109.
  67. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;265(1):134-139.
  68. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001;189(1):54-63.
  69. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998;176(1):57-66.
  70. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73-82.
  71. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ. The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*. 1994;84(12):4164-4173.
  72. Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S. Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res*. 1994;389:271-280.

73. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):311-324.
74. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-141.
75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
76. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breitmayer JP, Groux H, Ailhaud G, Dani C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med*. 2005;201(9):1397-1405.
77. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697-705.
78. Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC, Sim E. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):481-488.
79. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Begyui R, Maclellan WR, Hedrick MH, Fraser JK. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy*. 2005;7(3):282-291.
80. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Rosenthal ER, Dalemans W, Fukayama M, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet L, et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*. 1992;68(1):143-155.
81. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*. 1999;283(5402):682-686.
82. Ohashi M, Yoshida K, Kushida M, Miura Y, Ohnami S, Ikarashi Y, Kitade Y, Yoshida T, Aoki K. Adenovirus-mediated interferon alpha gene transfer induces regional direct cytotoxicity and possible systemic immunity against pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(4):441-449.
83. Wilson JM. Adeno-associated virus and lentivirus pseudotypes for lung-directed gene therapy. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(4):309-314.
84. Farson D, Witt R, McGuinness R, Dull T, Kelly M, Song J, Radeke R, Bukovsky A, Consiglio A, Naldini L. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2001;12(8):981-997.
85. Park F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*. 2007;31(2):159-173.
86. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(19):10319-10323.



87. Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol.* 1998;9(5):457-463.
88. Reiser J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther.* 2000;7(11):910-913.
89. Reiser J, Harmison G, Kluepfel-Stahl S, Brady RO, Karlsson S, Schubert M. Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15266-15271.
90. Reiser J, Lai Z, Zhang XY, Brady RO. Development of multigene and regulated lentivirus vectors. *J Virol.* 2000;74(22):10589-10599.
91. Mochizuki H, Schwartz JP, Tanaka K, Brady RO, Reiser J. High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector systems for gene delivery into nondividing cells. *J Virol.* 1998;72(11):8873-8883.
92. Chen CY, Schwartz RJ. Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *J Biol Chem.* 1995;270(26):15628-15633.
93. Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):8145-8149.
94. Kasahara H, Bartunkova S, Schinke M, Tanaka M, Izumo S. Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2.5 homeodomain protein. *Circ Res.* 1998;82(9):936-946.
95. Ueyama T, Kasahara H, Ishiwata T, Nie Q, Izumo S. Myocardin expression is regulated by Nkx2.5, and its function is required for cardiomyogenesis. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9222-9232.
96. Akazawa H, Komuro I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther.* 2005;107(2):252-268.
97. Thomas PS, Kasahara H, Edmonson AM, Izumo S, Yacoub MH, Barton PJ, Gourdie RG. Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells. *Anat Rec.* 2001;263(3):307-313.
98. Theodosiou NA, Tabin CJ. Sox9 and Nkx2.5 determine the pyloric sphincter epithelium under the control of BMP signaling. *Dev Biol.* 2005;279(2):481-490.
99. Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, Zou Y, Hayashi D, Yamazaki T, Nagai R, Komuro I. Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;298(4):493-500.
100. Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S. The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development.* 1999;126(6):1269-1280.
101. Durocher D, Chen CY, Ardati A, Schwartz RJ, Nemer M. The atrial natriuretic factor promoter is a downstream target for Nkx-2.5 in the myocardium. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4648-4655.
102. Takebayashi-Suzuki K, Pauliks LB, Eltsefon Y, Mikawa T. Purkinje fibers of the avian heart express a myogenic transcription factor program distinct from cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol.* 2001;234(2):390-401.
103. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell.* 2001;104(4):557-567.
104. Buck SH, Konyn PJ, Palermo J, Robbins J, Moss RL. Altered kinetics of contraction of mouse atrial myocytes expressing ventricular myosin regulatory light chain. *Am J Physiol.* 1999;276(4 Pt 2):H1167-1171.

105. Torres F, Anguita M, Tejero I, Gimenez D, Franco M, Zayas R, Gallardo A, Ciudad M, Ruiz M, Suarez de Lezo J, et al. [Acute myocarditis with severe cardiac dysfunction in the pediatric population. The evolution and differential characteristics with respect to adult myocarditis]. *Rev Esp Cardiol*. 1995;48(10):660-665.
106. Lyons I, Parsons LM, Hartley L, Li R, Andrews JE, Robb L, Harvey RP. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*. 1995;9(13):1654-1666.
107. Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*. 1999;73(4):2886-2892.
108. Smith JR, Pochampally R, Perry A, Hsu SC, Prockop DJ. Isolation of a highly clonogenic and multipotential subfraction of adult stem cells from bone marrow stroma. *Stem Cells*. 2004;22(5):823-831.
109. Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells. *Cytotherapy*. 2001;3(5):393-396.
110. Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):334-344.
111. Fukuda K. Application of mesenchymal stem cells for the regeneration of cardiomyocyte and its use for cell transplantation therapy. *Hum Cell*. 2003;16(3):83-94.
112. Kadivar M, Khatami S, Mortazavi Y, Shokrgozar MA, Taghikhani M, Soleimani M. In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(2):639-647.
113. Burlacu A. Can 5-azacytidine convert the adult stem cells into cardiomyocytes? A brief overview. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112(4):260-264.
114. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs*. 2001;25(3):187-193.
115. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):420-427.
116. Kawai T, Takahashi T, Esaki M, Ushikoshi H, Nagano S, Fujiwara H, Kosai K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ J*. 2004;68(7):691-702.
117. Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):7096-7105.
118. Shi Y, Katsev S, Cai C, Evans S. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Dev Biol*. 2000;224(2):226-237.

119. Durocher D, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *Embo J*. 1997;16(18):5687-5696.
120. Jay PY, Harris BS, Maguire CT, Buerger A, Wakimoto H, Tanaka M, Kupersmidt S, Roden DM, Schultheiss TM, O'Brien TX, Gourdie RG, Berul CI, Izumo S. Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J Clin Invest*. 2004;113(8):1130-1137.
121. Jamali M, Rogerson PJ, Wilton S, Skerjanc IS. Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J Biol Chem*. 2001;276(45):42252-42258.
122. Hirayama-Yamada K, Kamisago M, Akimoto K, Aotsuka H, Nakamura Y, Tomita H, Furutani M, Imamura S, Takao A, Nakazawa M, Matsuoka R. Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet A*. 2005;135(1):47-52.
123. Sarkozy A, Conti E, Neri C, D'Agostino R, Digilio MC, Esposito G, Toscano A, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *J Med Genet*. 2005;42(2):e16.
124. Lien CL, Wu C, Mercer B, Webb R, Richardson JA, Olson EN. Control of early cardiac-specific transcription of Nkx2-5 by a GATA-dependent enhancer. *Development*. 1999;126(1):75-84.
125. Small EM, Krieg PA. Transgenic analysis of the atrialnatriuretic factor (ANF) promoter: Nkx2-5 and GATA-4 binding sites are required for atrial specific expression of ANF. *Dev Biol*. 2003;261(1):116-131.
126. Balana B, Nicoletti C, Zahanich I, Graf EM, Christ T, Boxberger S, Ravens U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *Cell Res*. 2006;16(12):949-960.
127. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003;75(3):775-779.
128. Orlic D. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;996:152-157.
129. Orlic D. The strength of plasticity: stem cells for cardiac repair. *Int J Cardiol*. 2004;95 Suppl 1:S16-19.
130. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10344-10349.
131. Dzau VJ, Gneocchi M, Pachori AS, Morello F, Melo LG. Therapeutic potential of endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *Hypertension*. 2005;46(1):7-18.
132. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103(5):634-637.
133. Fraser JK, Schreiber RE, Zuk PA, Hedrick MH. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):658-666.
134. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3(5):705-713.
135. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary

- mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. 2002;106(15):1913-1918.
136. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
  137. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93-98.
  138. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001;7(4):430-436.
  139. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*. 2007;25(3):750-760.
  140. Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006;12(4):459-465.
  141. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharrague P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prosper F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(5):454-462.
  142. Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, Le Jemtel TH, Alt E. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2007;28(21):2667-2677.
  143. Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(2):208-216.
  144. Gneocchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661-669.
  145. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210-1221.
  146. Mays RW, van't Hof W, Ting AE, Perry R, Deans R. Development of adult pluripotent stem cell therapies for ischemic injury and disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7(2):173-184.
  147. Flores I, Benetti R, Blasco MA. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(3):254-260.

## 10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungspotential von humanen ADSCs.	11
Abbildung 2: Die drei Plasmidkomponenten des verwendeten HIV-1 Vektorsystems.	13
Abbildung 3: Effekt von Nkx2.5 auf die Herzformierung.	15
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Komponenten eines Sarkomers.	16
Abbildung 5: Verwendete Restriktionsenzyme zur Klonierung der eingesetzten Plasmide.	19
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Einzelschritte zur Klonierung der Vektoren.	27
Abbildung 7: Auftrennung der Plasmid-DNA nach enzymatischer Spaltung.	28
Abbildung 8: XL-10 E.coli transformiert mit pNkx2.5-eGFP und expandiert auf Agarplatten.	28
Abbildung 9: Restriktionsanalyse der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-eGFP.	29
Abbildung 10: Primer zur Sequenzierung der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2.	30
Abbildung 11: Sequenzierungsdaten der Plasmide pNkx2.5-eGFP und pMLC-2v-DsRed2.	30
Abbildung 12: Sequenzierungsrohdaten in der Insertionsstelle des Plasmids MLC2v-DsRed2.	31
Abbildung 13: FACS-Analyse von HOS-Zellen 48h nach Infektion mit pMLC-2v-DsRed2.	32
Abbildung 14: Q-PCR-Analyse zur Ermittlung von Virusintegrationseinheiten.	34
Abbildung 15: Humane Fettgewebsprobe nach den ersten Waschschritten.	35
Abbildung 16: FACS-Analyse von ECs und NRCMs nach Infektion mit pCMV-eGFP.	38
Abbildung 17: FACS-Analyse von ECs und NRCMs nach Infektion mit pNkx2.5-eGFP.	39
Abbildung 18: Liste der RT-PCR Primersequenzen zur Analyse der ADSC-Fraktionen.	42
Abbildung 19: Auftrennung der Fettgewebssuspension nach enzymatischer Verdauung.	47
Abbildung 20: Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>in vitro</i> expandierten ADSCs.	48
Abbildung 21: FACS-Untersuchungen an simultan infizierten ADSC-Populationen.	49
Abbildung 22: Konfokale Lasermikroskopie-Aufnahmen von eGFP <sup>pos</sup> /DsRed2 <sup>pos</sup> -Zellen.	50
Abbildung 23: Einfluss von 5-Aza-Inkubation (24h) auf die Expression von eGFP in ADSCs.	51
Abbildung 24: RT-PCR-Ergebnisse von verschiedenen ADSC-Fraktionen.	52
Abbildung 25: Immunfluoreszenzfärbung von eGFP <sup>pos</sup> /DsRed2 <sup>pos</sup> -Zellen.	53
Abbildung 26: Zellzyklusanalyse von kultivierten ADSCs.	54
Abbildung 27: Calciummessungen in kultivierten eGFP <sup>pos</sup> /DsRed2 <sup>pos</sup> -ADSCs.	55
Abbildung 28: Calciumkonzentrationsänderungen in ADSCs nach KCl Inkubation.	56

Abbildung 29: Patch Clamp Kaliumstrombestimmung in eGFP<sup>pos</sup>/DsRed2<sup>pos</sup>-Zellen. 57

Abbildung 30: TEM-Aufnahme des Zytosols einer ADSC. 58

## 11. Abkürzungsverzeichnis

ADSC	adipose tissue derived stem cells = Stammzellen aus dem Fettgewebe
bp	base pairs = Basenpaare
CD	cluster of differentiation
DNA	desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
RNA	ribonucleic acid = Ribonukleinsäure
DsRedD2	Discosoma sp. red fluorescent protein 2 = roter Fluoreszenzfarbstoff
eGFP	enhanced green fluorescent protein = grüner Fluoreszenzfarbstoff
FACS	fluorescent activated cell sorting = Durchflusszytometrie
FBS	fetales bovines Serum
HLA	human leucocyte antigen
MSC	mesenchymal stem cells = mesenchymale Stammzellen
PBS	phosphate buffered saline = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
SMB	skeletale Myoblasten

## **12. Erklärung über die Selbstständigkeit**

„Ich, Christoph Nabzdyk, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Untersuchungen zur kardialen Plastizität von multipotenten Zellen des humanen subkutanen Fettgewebes“* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift