

Aus dem Labor für Tissue Engineering und der Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Humane Herzohren als Ausgangsgewebe für die Isolation von
Zellen für regenerative Therapien kardialer Erkrankungen

Human Atrial Appendages as Tissue Source for Isolating Cells
for Regenerative Therapies of Cardiac Diseases

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Detert

aus Schwerin

Datum der Promotion: 13. Dezember 2019

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung	4
Abstract	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	11
1.1 Herzhistologie	11
1.2 Häufige Herzerkrankungen	12
1.3 Zellbasierte Therapien	14
1.4 <i>Cardiac-derived Adherent proliferating (CardAP)</i> -Zellen	16
1.5 Fragestellung	17
2 Methodik	18
2.1 Experimentdesign	18
2.2 Materialien	18
2.3 Gewebefärbungen	23
2.4 Bildanalyse gefärbter Herzohrschnitte	24
2.5 Zellisolation und Kultivierung	25
2.6 Bestimmung von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie	27
2.7 Untersuchung von Oberflächenmarkern an kryokonservierten Herzohrzellen	27
2.8 Immunfluoreszenzfärbung von Herzohrzellen	28
2.9 Enzym-Immunoassay	28
2.10 RNA-Isolation und Mikroarray-Analyse	29
2.11 Wachstumskinetik und Berechnung theoretischer Zellzahlen	30
2.12 Statistische Methoden und graphische Aufbereitung	31
3 Ergebnisse	33
3.1 Isolation und Charakterisierung von Herzohrzellen	33
3.2 Zusammenhang zwischen Geweberegion und CD90-Expression	37
3.3 Pro-angiogene Eigenschaften sortierter Herzohrzellen	40
3.4 Theoretische Zellmengen für ein allogenes Zellprodukt	42
4 Diskussion	43
4.1 Ergebnisbewertung	43
4.2 Limitationen	48
4.3 Schlussfolgerung	50
4.4 Ausblick und weitere Forschung	51
5 Literaturverzeichnis	52
Eidesstattliche Versicherung	61
Anteilerklärung an der erfolgten Publikation	62

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)	63
Druckexemplar der ausgewählten Publikation	64
Lebenslauf	79
Publikationsliste.....	79
Danksagung.....	81

Kurzzusammenfassung

Hintergrund: Herzerkrankungen wie die Herzinsuffizienz und die koronare Herzerkrankung gehören zu den größten Herausforderungen des öffentlichen Gesundheitssystems in den Industrienationen. In den letzten Jahren wurden zellbasierte Therapieoptionen entwickelt, die zur Regeneration des geschädigten Herzgewebes beitragen sollen. Zu den Zelltypen, die ihre Wirkung über parakrine Mechanismen ausüben, gehören die *Cardiac-derived adherent proliferating (CardAP)*-Zellen. Sie sind Non-Stammzellen, die aus endomyokardialen Biopsien isoliert werden. Ein weiteres mögliches Gewebe zur Isolation dieser Zellen stellt das rechte Herzohr dar. Es bietet eine größere Gewebemasse und könnte zur Herstellung von *CardAP*-Zellen für allogene regenerative Therapien dienen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich *CardAP*-Zellen aus dem humanen Herzohr isolieren lassen und welche histologische Region des Herzohrs dafür am besten geeignet ist. Das Gewebe sollte näher charakterisiert und die Zellen auf ihr Oberflächenmarkerprofil, ihr pro-angiogenes Potenzial und ihre Eignung als mögliches allogenes Zellprodukt untersucht werden.

Methoden: Das Herzohrgewebe wurde mittels Hämatoxylin-Eosin und Masson-Goldner-Trichrom und auf den Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation (CD)90* gefärbt. Die Zellisolation erfolgte aus Gewebefragmenten mittels Auswachskultur. Nach der Zellernte wurde eine magnetische Zellsortierung durchgeführt, um eine CD90-negative Zellpopulation zu erhalten. Die sortierten Herzohrzellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihr Oberflächenmarkerprofil und mittels Mikroarray auf ihr Genexpressionsprofil untersucht. Ein Enzym-gekoppeltes ImmunoSorbent-Assay (ELISA) diente dem Nachweis der Sekretion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und Interleukin-8 (IL-8). Auf Basis einer Wachstumskinetik wurden Berechnungen zu möglichen Zellzahlen für eine spätere allogene Therapie angestellt.

Ergebnisse: Aus einem Herzohr lassen sich Zelldosen für über 250 Patienten herstellen. Idealerweise sollten myo- und endomyokardiale Areale des Herzohrgewebes für die Auswachskultur verwendet werden. Fibrosierte und epikardiale Bereiche sollten nicht verwendet werden. Im Vergleich zu *CardAP*-Zellen weisen sortierte Herzohrzellen das gleiche Profil hinsichtlich der Marker CD29 (positiv), CD44 (positiv), CD45 (negativ), CD73 (positiv), CD105 (positiv) und CD166 (positiv) auf, jedoch enthalten sie noch eine geringe Fraktion CD90-positiver Zellen. Sie sekretieren die pro-angiogenen Faktoren VEGF und IL-8, die sie auch auf RNA-Ebene exprimieren sowie weitere Schlüsselgene der Angiogenese.

Schlussfolgerung: Die Isolation von Herzohrzellen mit *CardAP*-Eigenschaften ist möglich, jedoch sollte das Zellsortierungsverfahren optimiert werden. Das pro-angiogene Potenzial muss an *in-vivo*-Tiermodellen bestätigt werden. Weitere Untersuchungen zur Immunogenität der Zellen und ihrer Lagerbarkeit in einem Zellbanksystem sollten folgen.

Abstract

Background: Heart diseases like heart failure and coronary artery disease are a major burden for the public health system in developed countries. In recent years, cell-based therapies were developed for the regeneration of damaged heart tissue. Cardiac-derived adherent proliferating (CardAP) cells belong to the generation of cells which act upon paracrine mechanisms. They are non-stem cells, which can be isolated from endomyocardial biopsies. Another source for the isolation of these cells could be the right atrial appendage (AA). It offers greater tissue mass and could be used in order to produce CardAP cells for allogenic regenerative therapies. The aim of this thesis was to elucidate if CardAP cells could be isolated from human AAs and which histological area would be the most suitable to this end. The tissue was further characterized, and isolated cells were further examined for their surface marker profile, their pro-angiogenic potential and their suitability as allogenic cell product.

Methods: Tissues were stained with hematoxylin and eosin, Masson-Goldner trichrome and for CD90. Cell isolation was conducted using outgrowth cultures. After harvesting, cells were sorted using magnetic beads to obtain a cluster of differentiation (CD)90-negative cell population. Sorted AA cells were examined for their surface marker profile using flow cytometry and for their gene profile using a microarray. An Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) was used to detect the secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8). Growth kinetics served as basis for estimating theoretical cell numbers for future allogenic therapies.

Results: Cell dosages for the treatment of more than 250 patients can be obtained from one AA. Ideally, myo- and endomyocardial areas should be used for outgrowth cultures; fibrotic and epicardial areas should be discarded. In comparison to CardAP cells, sorted AA cells show the same expression regarding the surface markers CD29 (positive), CD44 (positive), CD45 (negative), CD73 (positive), CD105 (positive) and CD166 (positive), but they contain a small fraction of CD90-positive cells. They secrete the pro-angiogenic factors VEGF and IL-8, which are also expressed on RNA level as well as other key genes of angiogenesis.

Conclusion: It is possible to isolate AA cells with CardAP characteristics; however, cell sorting should be optimized. The pro-angiogenic potential has to be confirmed *in-vivo* using animal models. Further experiments regarding immunogenicity and storage capabilities in a cell bank system should follow.

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (<i>angiotensine converting enzyme</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATMP	<i>Advanced Therapy Medicinal Product</i>
AutoMACS	Automatisiertes <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
BM-MSC	Mesenchymale Knochenmark-Stammzelle (<i>bone marrow mesenchymal stem cell</i>)
BMMNC	Mononukleäre Zelle des Knochenmarks (<i>bone marrow mononuclear cell</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CardAP	<i>Cardiac-derived Adherent Proliferating</i>
CCL11	<i>Chemokine ligand 11</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Cardiosphere-derived cell</i>
cGMP	Cyklisches Guanosinmonophosphat
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CXCL	Chemokin-Ligand
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DBP	<i>Donkey-Blocking-Puffer</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISA	Enzym-Immunoassay (<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>European Medicines Agency</i>)
EMB	Endomyokardiale Biopsie
EPC	Endotheliale Progenitorzelle (<i>endothelial progenitor cell</i>)
ESC	Europäische Herzgesellschaft (<i>European Society of Cardiology</i>)
F3	<i>Coagulation factor III</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FDA	US-Amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel (<i>Food and Drug Administration</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGF1	<i>Fibroblast growth factor 1</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLT1	<i>Fms-related tyrosine kinase</i>
g	Gramm
GENESIS	<i>Gene Expression Similarity Investigation Suite</i>
GIMP	<i>GNU Image Manipulation Program</i>
GMP	<i>Good Manufacturing Practice</i>
GO	Genontologie (<i>gene ontology</i>)
h	Stunde

HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IDH	Isocove-Dulbecco-Ham
I _f	Funny-Ionenkanal
IL-8	Interleukin-8
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Liter
LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
ln	natürlicher Logarithmus
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MACS	<i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i>
MDK	<i>Midkine</i>
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MSC	Mesenchymale Stammzelle (<i>mesenchymal stem cell</i>)
ng	Nanogramm
NHDF	Normaler Humaner Dermaler Fibroblast
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin

pg	Pikogramm
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
ROI	<i>Region of Interest</i>
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDF-1 α	<i>Stromal cell-derived factor 1 alpha</i>
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
TGFA	<i>Transforming growth factor alpha</i>
TIE1	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1</i>
TM	Handelsmarke (<i>trademark</i>)
TRI	Trizol
U	Einheit (<i>unit</i>)
u.a.	unter anderem
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vgl.	vergleiche
Wt1	<i>Wilm's tumor 1</i>
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter

1 Einleitung

1.1 Herzhistologie

Das Herz ist das zentrale Kreislauforgan des Menschen. Geschützt vom Thorax liegt es im Mediastinum in seiner eigenen serösen Höhle und ist außen von Perikard umgeben. Die Herzwand besteht aus drei Schichten: Epikard, Myokard und Endokard. Das außen liegende Epikard entspricht der Lamina visceralis des Perikards. Das Epikard setzt sich aus Tunica serosa und Tela subserosa zusammen. Letztere ist eine adipozytenreiche Schicht, in der Nerven und Blutgefäße verlaufen. Das Myokard ist die Muskelschicht, die aus Kardiomyozyten besteht. Sie liegt zwischen Endo- und Epikard. Unterschieden wird prinzipiell zwischen der Muskulatur des Reizleitungssystems und dem Arbeitsmyokard, das die physikalische Pumpleistung erbringt. Im Bereich der Atrien ist das Myokard zweischichtig, im Bereich der Ventrikel dreischichtig, wobei eine mittlere Ringschicht von einer inneren und einer äußeren Längsschicht umgeben wird. Die Wand des linken Ventrikels ist mit 8-12 mm mindestens doppelt so dick wie die des rechten Ventrikels, was auf den erhöhten Druck im Körperkreislauf zurückgeht. Endothel und Bindegewebe formen das Endokard, die innerste Schicht der Herzwand.

Entsprechend diesem Aufbau lassen sich unterschiedliche Zelltypen im Herzen finden. Zu den häufigsten Zellen zählen Kardiomyozyten, die volumenmäßig den größten Anteil ausmachen, und darüber hinaus Fibroblasten, Endothelzellen und perivaskuläre Zellen [1].

Jahrzehntlang wurde postuliert, das Säugetierherz (genau wie das Gehirn) besäße keine Stammzellen und sei demnach nicht regenerationsfähig. Stammzellen sind dadurch definiert, dass sie pluripotent sind, Selbsterneuerungspotenzial haben und sich klonal vermehren. Diese Eigenschaften müssen sie sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* aufweisen [2]. Regeneration findet statt, wenn aus Stammzellen differenzierte Zellen werden und sie sich vermehren, sodass geschädigtes Gewebe durch funktionelles Gewebe ersetzt wird. Dieses Paradigma, das Herz sei ein postmitotisches Organ, wurde in den 2000er-Jahren durch unterschiedliche Entdeckungen aufgeweicht, u.a. das Vorhandensein Y-Chromosom-positiver Kardiomyozyten in weiblichen Spenderherzen herztransplantierten männlicher Patienten [3], die Entdeckung c-kit-positiver adulter kardialer Stammzellen in Rattenherzen im Jahr 2003 [4], und Hinweise auf eine kardiale Erneuerung anhand von Untersuchungen mit Kohlenstoff-Isotopen [5]. In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen schließlich postuliert, dass das menschliche Herz selbst Stammzellen besitzt [6-8] und somit die Hoffnungen auf zukünftige Therapien zur Regeneration des Herzens geweckt.

Nachdem sich einige der Ergebnisse durch andere Forschungsgruppen nicht replizieren ließen [9-11], kamen erste Zweifel an der Belastbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse

dieser Publikationen auf. Mittlerweile weiß man, dass ein Teil davon u.a. aufgrund von Manipulationen nicht reliabel ist [12-14].

1.2 Häufige Herzerkrankungen

1.2.1 Überblick

Herzerkrankungen sind die häufigste Todesursache in Deutschland und den USA, noch vor Krebs, Infektionen oder Schlaganfall [15, 16]. Am häufigsten sterben die Patienten in der Folge einer koronaren Herzkrankheit (KHK) oder einer Herzinsuffizienz [16].

Die Herzinsuffizienz kann durch vielfältige Ursachen entstehen. Hauptrisikofaktoren sind KHK, Diabetes mellitus und Bluthochdruck [15]. Die KHK führt zu einer Minderversorgung des Herzmuskels mit Blut. Im Rahmen beider Erkrankungen kommt es letztendlich zu einem Funktionsverlust des Herzmuskelgewebes.

1.2.2 Koronare Herzkrankheit

Die KHK hat einen erheblichen Anteil an den Herzerkrankungen und dementsprechend an den kardiovaskulären Todesfällen. Im Jahr 2015 starben in Deutschland 128.230 Menschen an den Folgen ihrer KHK [16].

Das Myokard kann auf unterschiedliche Arten geschädigt werden. Dazu zählen Stenosen der Koronararterien, mikrovaskuläre Dysfunktion, Koronarspasmen oder eine Kombination aus diesen [17].

Beim akuten Myokardinfarkt kommt es zu einer Nekrose des Herzmuskelgewebes, aufgrund einer länger währenden Ischämie. Am häufigsten liegt dieser Ischämie eine rupturierte oder erodierte atherosklerotische Plaque zugrunde [18].

Zur Therapie der KHK gehört ein Lebenswandel hin zu einer gesunden, ausgewogenen Ernährung und regelmäßige körperliche Aktivität. In der Pharmakotherapie kommen Nitrate, Betarezeptoren-Blocker, Kalziumantagonisten, der Funny-Ionen(I_f)-Kanalblocker Ivabradin und Nicorandil, ein Stimulator des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP), zum Einsatz. Zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse hat sich der Plättchenhemmer Acetylsalicylsäure etabliert. Oftmals sind auch Statine indiziert, um den *Low-Density-Lipoprotein* (LDL)-Spiegel zu senken. Weitere Verschreibungen hängen vom Risikoprofil und den Begleiterkrankungen des Patienten ab [17].

Eine Revaskularisierung, in der Regel mit Stenteinlage, ist bei höhergradigen Stenosen, insbesondere auch beim akuten Koronarsyndrom indiziert [17, 19].

Ein Herzinfarkt hinterlässt eine Narbe im Herzgewebe, die sich auf die Physiologie des gesamten Organs auswirkt. Bisherige Therapien zielen vor allem auf die Prävention von kardialen Ereignissen ab. Nach so einem Ereignis können sie lediglich zur Ökonomisierung der Herzarbeit beitragen, jedoch nicht die strukturellen Defekte

beseitigen. Solche Defekte gehen einher mit einer verminderten Pumpleistung und bergen das Risiko weiterer Schädigungen. Neuere, zellbasierte Therapien setzen dort an. Sie haben die Regeneration des Gewebes zum Ziel.

1.2.3 Herzinsuffizienz

Wenn das Herz nicht mehr seiner physiologischen Funktion nachkommen kann, das periphere Gewebe durch seine Pumpleistung mit sauerstoffreichem Blut zu versorgen, spricht man von einer Herzinsuffizienz. Man unterscheidet zwischen einer akuten und einer chronischen Herzinsuffizienz. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die chronische Form der Herzinsuffizienz.

Die Herzinsuffizienz ist eines der großen medizinischen und finanziellen Probleme des öffentlichen Gesundheitssystems. Weltweit ist sie die kardiovaskuläre Krankheit, deren Inzidenz am schnellsten zunimmt. Ihre Prävalenz wird auf > 37,7 Millionen Patienten geschätzt [20]. In einer immer älter werdenden Gesellschaft ist es wahrscheinlich, dass die Zahl der Erkrankten weiter zunehmen wird.

In Deutschland gibt es ca. 1,8 Millionen Herzinsuffizienzpatienten. Die Inzidenz liegt bei 300.000 Neuerkrankungen pro Jahr [21] und führt zu über 455.000 vollstationären Krankenhausaufenthalten jedes Jahr [16].

Die Leitlinie der Europäischen Herzgesellschaft (ESC) unterscheidet zwischen drei Typen der Herzinsuffizienz, die durch die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) definiert werden: Herzinsuffizienz mit erhaltener LVEF, das heißt $\geq 50\%$, *mid-range* Herzinsuffizienz, das heißt LVEF 40-49 %, und Herzinsuffizienz mit reduzierter LVEF, dementsprechend $< 40\%$ [22].

Typischerweise liegt der Herzinsuffizienz eine myokardiale Veränderung zugrunde, die zu einer links- und/oder rechtsventrikulären Dysfunktion führt. Prinzipiell kann jedoch jedwede Veränderung an kardialen Strukturen eine Herzinsuffizienz auslösen [22].

Zu den häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz zählen in den Industrienationen die KHK und/oder die arterielle Hypertonie. Auf sie lassen sich über zwei Drittel aller Fälle zurückführen. In Entwicklungsländern dagegen sind Herzklappenerkrankungen und Mangelernährung häufiger die Ursache für eine Herzinsuffizienz [23].

Seltenere Ursachen der Herzinsuffizienz sind nicht-ischämische Kardiomyopathien, Arrhythmien, angeborene Herzerkrankungen, Perikarderkrankungen und *High Output Failure*, wozu u.a. Anämien, Thyreotoxikosen und arteriovenöse Fisteln zählen. Auch Alkohol und Arzneimittel können eine Herzinsuffizienz auslösen [24].

Je nach Ausprägungsgrad der Symptome ist das Leben der Patienten mit Herzinsuffizienz eingeschränkt. Die Therapie zielt darauf ab, die Lebensqualität dieser Patienten zu verbessern, ihre Symptome zu lindern und Hospitalisierungen vorzubeugen. Aus epidemiologischer Sicht geht es darum, Morbidität und Mortalität der Erkrankung zu senken.

Die medikamentöse Therapie der Herzinsuffizienz orientiert sich an der Klassifikation der *New York Heart Association* (NYHA). Zu den Medikamenten, die das Überleben bei Patienten mit reduzierter Ejektionsfraktion verbessern, gehören Hemmer des Angiotensin-Konversionsenzyms (ACE), Mineralkortikoidrezeptor-Antagonisten, Betarezeptoren-Blocker und Angiotensinrezeptor/Nepriylsin-Hemmer. Weiterhin können Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten und Ivabradin indiziert sein. Bei Stauungssymptomen werden zusätzlich Diuretika eingesetzt [22].

Die nicht-medikamentöse Therapie beinhaltet regelmäßiges aerobes Training, den Einsatz implantierbarer Kardioverter/Defibrillatoren und die kardiale Resynchronisationstherapie. Weitere Therapieoptionen hängen vom Typ der Herzinsuffizienz und der zugrundeliegenden Ursache ab [22].

Als letzte Option bleibt die Herztransplantation, die zum einen durch das Fehlen von Spenderherzen limitiert ist und zum anderen die Operabilität des oft multimorbiden Patienten voraussetzt.

Für Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz – jenem Stadium, in dem die Herzleistung gerade noch ausreicht, um den Organismus am Leben zu erhalten, Belastungen aber nicht mehr kompensiert werden können – sind die etablierten Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft. Ihnen stehen im Rahmen von Studien neue Therapieoptionen zur Verfügung, die jedoch noch nicht vollständig evaluiert und somit nicht in den Leitlinien verankert sind. Zu diesen Optionen gehören beispielsweise die therapeutische Apherese, Unterstützungsnetze wie das CorCap™ oder zellbasierte Therapien, die in der Regel auf Stammzellen beruhen [24].

1.3 Zellbasierte Therapien

Nach einem Herzinfarkt ist der Herzmuskel erheblich geschädigt, was mit einem massiven Verlust von Myozyten einhergeht. Auch die Herzinsuffizienz ist mit Myokardschäden verbunden. Anders als die bisherigen medikamentösen Therapien zielen zellbasierte Therapien darauf ab, das geschädigte Herz wieder zu regenerieren [25].

Die ersten Versuche begannen in den 1990er-Jahren mit der Transplantation von autologen Myoblasten, also Satellitenzellen des Skelettmuskels, die dessen Regeneration steuern [26-28].

Die ersten erfolgsversprechenden Studien an Patienten wurden mit mesenchymalen Knochenmark-Stammzellen (BM-MSK) durchgeführt und zeigten eine Verbesserung der Herzfunktion bei relativ kurzem *Follow-Up* [29-32].

Wie die transplantierten Zellen die Herzfunktion verbessern, ist weiterhin Gegenstand der Forschung. Zunächst ging man davon aus, Stammzellen würden sich in Kardiomyozyten differenzieren und so abgestorbenes Gewebe ersetzen [33]. Spätere Untersuchungen an erkrankten Herzen zeigten jedoch, dass nur ein geringer Teil der transplantierten Zellen

tatsächlich im Herzgewebe bleibt und die positiven Effekte daher wahrscheinlich nicht auf Differenzierungsprozessen [9], sondern auf parakrinen Mechanismen beruhen [34-36]. Zu den parakrinen Mediatoren gehören Zytokine und Wachstumsfaktoren. Mittlerweile hat sich die *Paracrine Hypothesis* durchgesetzt, die für die Haupteffekte der kardialen Regenerierung durch zellbasierte Therapien verantwortlich ist, mit eventuellen Ausnahmen für Zellen der zweiten Generation [37].

Diese Zellen der zweiten Generation sind *cardiosphere-derived cells* (CDCs), modifizierte mesenchymale Stammzellen (MSC), induzierte pluripotente Stammzellen und embryonale Stammzellen, die neben ihrer parakrinen Aktivität noch die theoretische Möglichkeit besitzen, sich in Kardiomyozyten zu differenzieren und so zum *Remodeling* des erkrankten Herzgewebes beizutragen. Zu den Zellen der ersten Generation gehören entsprechend diejenigen, die hauptsächlich durch die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wirken. Neben Stamm-, Progenitor- und Stromazellen beschäftigt sich die regenerative Forschung in den letzten Jahren zudem zunehmend mit zellfreien Produkten wie Mikrovesikeln und Exosomen, Wachstumsfaktoren, nicht-kodierenden Ribonukleinsäuren (RNAs), Gentherapien, *Tissue-Engineering*-Produkten bis hin zur Neo-Organogenese [38].

Zellbasierte Therapien erscheinen neben diesen neuen Strategien fast schon als etabliert, doch sie sind weiterhin ein relativ neues Forschungsfeld, weshalb es auf dem Weg zur idealen Therapie noch viele ungeklärte Fragen gibt. Zwar konnten diverse Untersuchungen die Durchführbarkeit und Sicherheit von zellbasierten Therapien belegen, ein von den Fachgesellschaften empfohlenes und von den Krankenkassen finanziertes Zellprodukt existiert aber noch nicht. So ist man immer noch auf der Suche nach dem idealen Zelltyp vom idealen Donor für den passenden Patienten. Dazu kommen Hürden bei der Zellapplikation, ihrer Retention im Zielgewebe, der Suche nach der adäquaten Dosis, und das Fehlen von standardisierten Protokollen für die objektive Evaluierung ihrer Effekte. Die *Transnational Alliance for Regenerative Therapies in Cardiovascular Syndromes*, kurz TACTICS, ein Verbund aus Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern aus dem Feld der Regenerationsmedizin, hat in ihrem Positionspapier von 2017 einen wichtigen Schritt auf dem Weg zu einer solchen Standardisierung gemacht [38].

Bislang fehlt es noch an großen, methodisch gut konzipierten Phase-III-Studien zu den Effekten zellbasierter Therapien in Post-Infarkt-Patienten oder Patienten mit Herzinsuffizienz [39]. Die bisherigen Studien betrachten bis dato nur Surrogatparameter als *Outcome* und konnten noch nicht beweisen, dass die zellbasierten Therapien besser als die Standardtherapie sind. Bislang sind zellbasierte Therapie für diese Erkrankungen daher weder in den USA von der US-Amerikanischen Behörde für Lebens- und Arzneimittel (FDA) noch in Deutschland von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen und werden in keiner aktuellen Leitlinie empfohlen.

1.4 *Cardiac-derived Adherent proliferating (CardAP)-Zellen*

Wie oben beschrieben, ist die Suche nach dem idealen Zelltyp noch nicht abgeschlossen und es ist nicht unwahrscheinlich, dass unterschiedliche Patientenkohorten unterschiedliche Zellarten benötigen werden, sofern sich zellbasierte Therapien zur kardialen Regeneration durchsetzen werden.

Haag et al. haben im Jahr 2010 einen Zelltyp beschrieben, der aus endomyokardialen Biopsien (EMBs) isoliert wird und keine Stammzeleigenschaften aufweist. Diese sogenannten *CardAP*-Zellen exprimieren die Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation* (CD)29, CD44, CD73, CD105 und CD166 und sind negativ für CD45 und CD90 [40].

CardAP-Zellen zeigten in den bisherigen Untersuchungen pro-angiogene Eigenschaften, die sie über parakrine Effekte vermitteln [41, 42] und lassen sich daher als Erst-Generation-Zellen klassifizieren. Sie wirken antifibrotisch und antihypertrophisch [43] und weisen eine geringe Immunogenität auf [44, 45].

Für die *CardAP*-Zellen liegt bereits eine Herstellungserlaubnis vor. Die vorklinischen Studien sind abgeschlossen und eine erste klinische Studie ist in Planung. Diese wird zeigen, ob eine Zelltherapie mit Non-Stammzellen als Alternative zu Stammzell-basierten Therapien in naher Zukunft für Patienten mit chronischen Herzerkrankungen zur Verfügung stehen wird.

Die Zellmengen, die aus EMBs isoliert und expandiert werden können, sind aufgrund der geringen Gewebemenge der Biopsate limitiert. Diese Zellen sollen daher für eine autologe Therapie eingesetzt werden. Das heißt, dass herzkranken Patienten, in diesem Fall Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, mittels Herzkatheter biopsiert werden und später ihre eigenen Zellen erhalten. Mehr Ausgangsgewebe als EMBs bietet dagegen das humane Herzohr und könnte somit die Basis für eine allogene Therapie von Herzerkrankungen darstellen, bei der aus dem Biomaterial von einem Spender Zellen für hunderte Patienten generiert werden sollen.

Herzohren sind nicht essentiell für die Funktionalität des Herzens. In einigen Arrhythmiepatienten wird das linke Herzohr verschlossen oder exzidiert, da sich in ihm Thromben bilden können. Das rechte Herzohr (oder Teile von ihm) wird teilweise während der Koronararterien-*Bypass*-Chirurgie entfernt. Zudem besteht die Möglichkeit, Biopsien vom Herzohr während offener Herzoperationen zu entnehmen.

Vom Herzohr isolierte Stammzellen wurden bereits früh im Rahmen von Studien zur Therapie von KHK-Patienten eingesetzt [46] und stellen heute eines der standardmäßig verwendeten Gewebe für die Isolation von Zellen für regenerative Therapien bei Herzerkrankungen dar.

Vorversuche der Arbeitsgruppe am Labor für *Tissue Engineering* haben bereits zeigen können, dass sich CD90-negative Zellen aus humanem Herzohrgewebe isolieren lassen

[47]. Eine weitere Charakterisierung dieser Zellen und die Untersuchung ihrer Effekte für eine spätere regenerative Therapie standen bis dato jedoch noch aus.

1.5 Fragestellung

Die Forschung zu zellbasierten Therapien zur Behandlung von Herzerkrankungen hat in den letzten Jahren einen regelrechten Boom erlebt. Jedoch beschränken sich die gewonnenen Erkenntnisse fast ausschließlich auf Experimente und klinische Studien mit Stammzellen. Non-Stammzellen zur Herzregeneration stellen weiterhin eine Nische dar, dabei hat sich in den letzten Jahren die Erkenntnis durchgesetzt, dass die positiven Eigenschaften von Stammzellen nicht auf ihrem Differenzierungspotenzial beruhen, sondern vor allem auf den parakrinen Effekten, die sie vermitteln. Non-Stammzellen wie die *CardAP*-Zellen wirken ebenfalls über parakrine Mechanismen und könnten daher eine leicht zu isolierende Alternative oder Ergänzung zur Stammzelltherapie darstellen.

Eine allogene Zelltherapie, wie sie für das Herzohr-Projekt angestrebt wird, verlangt zunächst ein unkompliziert zu beziehendes Ausgangsgewebe, eine einfache Handhabbarkeit bei der Isolation der Zellen, größtmögliche Reinheit der Zellpopulation, nachweisbare und reproduzierbare Effekte, eine niedrige Immunogenität des Zellproduktes und große Zellchargen für die gleichzeitige Versorgung mehrerer Patienten.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob *CardAP*-Zellen oder Zellen mit *CardAP*-Eigenschaften aus humanem Herzohrgewebe isoliert werden können. Diese Zellen sollten sowohl hinsichtlich ihres Expressionsprofils als auch möglicher parakriner Effekte untersucht werden. Eine zusätzliche Charakterisierung des Herzohrgewebes sollte dazu beitragen, die Zellisolation zu optimieren.

Folgende Hypothesen wurden aufgestellt:

1. *CardAP*-Zellen lassen sich aus Herzohrgewebe isolieren.
2. Der Erfolg der Zellisolation hängt von der histologischen Region des Herzohrgewebes ab.
3. Aus dem Herzohr isolierte Zellen können leicht expandiert werden und stellen ausreichende Mengen für einen allogenen Therapieansatz bereit.
4. Aus dem Herzohr isolierte Zellen haben pro-angiogene Eigenschaften.

2 Methodik¹

2.1 Experimentdesign

Zur Beantwortung der Forschungsfragen wurde ein experimentell-exploratives Forschungsdesign gewählt. Die verwendeten humanen Herzohren stammen von Patienten des Deutschen Herzzentrum Berlin und wurden im Rahmen von medizinisch indizierten chirurgischen Eingriffen von den Spendern gewonnen. Sowohl die Entnahme der Herzohren durch das Team am Herzzentrum als auch die Verwendung für Forschungszwecke am Labor für *Tissue Engineering* sind im Rahmen des bewilligten Ethikantrags EA4/028/12 der Charité – Universitätsmedizin Berlin und mit schriftlichem Einverständnis der Spender erfolgt.

Insgesamt wurden 10 verschiedene Herzohren verwendet, Vorversuche nicht eingeschlossen. Zunächst ging es darum, das Herzohrgewebe morpho-histologisch zu charakterisieren. Dazu wurden Gewebeschnitte und -färbungen angefertigt. Zur Zellisolation wurden Fragmente aus den Herzohren geschnitten und für Auswachskulturen verwendet. Dabei wurde zwischen verschiedenen Regionen unterschieden. Sortierte, vom Herzohr isolierte Zellen wurden für Untersuchungen zur Wachstumskinetik, für eine Mikroarrayuntersuchung, für Zellfärbungen und einen *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) verwendet.

2.2 Materialien

2.2.1 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Donkey-Anti-Mouse-Sekundärantikörper, Alexa Fluor 555-konjugiert (Zellfärbung)	ThermoFisher
Mouse-Anti-Human-CD105-Antikörper, Fluorescein-Isocyanat(FITC)-konjugiert (Durchflusszytometrie)	Acris
Mouse-Anti-Human-CD166-Antikörper, Phycoerythrin(PE)-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen

¹ ein Teil der hier dargestellten Methodik ist in modifizierter Form und in englischer Sprache bereits erschienen in: Detert, S., Stamm, C., Beez, C., Diedrichs, F., Ringe, J., Van Linthout, S., Seifert, M., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Haag, M., *The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(3): S. e1404-e1417.

Mouse-Anti-Human-CD29-Antikörper, PE-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen
Mouse-Anti-Human-CD44-Antikörper, FITC-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen
Mouse-Anti-Human-CD45-Antikörper, FITC-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen
Mouse-Anti-Human-CD73-Antikörper, PE-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen
Mouse-Anti-Human-CD90-Antikörper, Clone5E10 (Gewebefärbung)	BioLegend
Mouse-Anti-Human-CD90-Antikörper, FITC-konjugiert (Durchflusszytometrie)	BD Pharmingen
Mouse-Anti-Human-CD90-Primärantikörper, Clone5E1D (Zellfärbung)	BioLegend

2.2.2 Assays und Arrays

Bezeichnung	Hersteller
Human Chemokin-Ligand (CXCL)8/Interleukin (IL)-8 Quantikine SixPak (ELISA)	R&D Systems
Human <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) Quantikine SixPak (ELISA)	R&D Systems
Mikroarray HG-133 plus 2 GeneChips	Affymetrix

2.2.3 Biomaterial

Gewebe	Experimente
Herzohr 1	Gewebefärbung, Auswachskultur nach Herzohrregionen, Durchflusszytometrie
Herzohr 2	Gewebefärbung, Auswachskultur nach Herzohrregionen, Durchflusszytometrie

Herzohr 3	Gewebefärbung, Auswachskultur nach Herzohrregionen, Durchflusszytometrie
Herzohr 4	Auswachskultur, <i>Magnetic-Activated Cell Sorting</i> (MACS), Durchflusszytometrie, Kryokonservierung, Wachstumskinetik, Mikroarray, ELISA
Herzohr 5	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Kryokonservierung, Wachstumskinetik, Mikroarray, ELISA
Herzohr 6	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Kryokonservierung, Wachstumskinetik, Mikroarray, Zellfärbung, ELISA
Herzohr 7	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Kryokonservierung, Wachstumskinetik, Zellfärbung, ELISA
Herzohr 8	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Zählung Herzohrfragmente, Theoretische Zellzahlberechnung, Vergleich MACS/Automatisiertes MACS (AutoMACS)
Herzohr 9	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Zählung Herzohrfragmente, Wachstumskinetik, Theoretische Zellzahlberechnung, Vergleich MACS/AutoMACS
Herzohr 10	Auswachskultur, MACS, Durchflusszytometrie, Zählung Herzohrfragmente, Theoretische Zellzahlberechnung, Vergleich MACS/AutoMACS
Normale Humane Dermale Fibroblasten (NHDFs)	Technische Universität Berlin

2.2.4 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
AutoMACS	Miltenyi Biotec
AxioObserver-Mikroskop	Zeiss
FACSCalibur-Zytometer	Becton Dickinson
NanoDrop-Spektrophotometer	Agilent

Photometrischer Mikroplattenleser	Tecan
Progress Speed XT core5-Kamera	Jenoptik
Thermomixer	Eppendorf
Zeiss Lab A1 Axio-Mikroskop	Zeiss

2.2.5 Medien, Seren und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Bisbenzimid/Bovines Serumalbumin (BSA)-Lösung	Hoechst
1-Brom-3-chlorpropan	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
komplementiertes Isocove-Dulbecco-Ham (ciDH)-Medium, bestehend aus Isocove-Dulbecco-Ham (IDH); angereichert mit Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) 100ng/mL und epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) 100 ng/mL	Eigenherstellung
komplementiertes <i>Isocove's Modified Dulbecco's</i> Medium (ciMDM), bestehend aus <i>Isocove's Modified Dulbecco's</i> Medium (IMDM); angereichert mit 10 % humanem Serum und 1 % Penicillin/Streptomycin	Eigenherstellung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
<i>Donkey-Blocking-Puffer</i> (DBP), bestehend aus phosphatgepufferter Salzlösung (PBS); angereichert mit Eselserum (5 %) und BSA (1 %)	Eigenherstellung
<i>Dulbecco's Modified Eagle</i> Medium (DMEM), mit 1,0 g/L D-Glucose)	Biochrom
Eselserum	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom
<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (FACS)-Puffer, bestehend aus PBS/0,5 % BSA, pH 7,4	Eigenherstellung

Formalin (4 %)	Herbeta
Ham's F12	Biochrom
Hämatoxylin-Eosin	Dako (Hämatoxylin), Roth (Eosin)
Humanes Serum, aus Vollblutkonserven des Deutschen Roten Kreuz (DRK)	Eigenherstellung
IDH-Medium, bestehend aus 1/3 IMDM, 1/3 DMEM, 1/3 Ham's F12; angereichert mit humanem Serum (5 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %)	Eigenherstellung
IMDM	Biochrom
Kryomedium A, bestehend aus humanem Serum (80 %) und DMSO (20 %)	Eigenherstellung
Kryomedium B, bestehend aus humanem Serum (80 %) und IDH (20 %)	Eigenherstellung
MACS-Puffer, bestehend aus PBS mit BSA (0,5 %) und EDTA (0,4 %)	Eigenherstellung
Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit	Roth
Paraffin	Merck
PBS	Biochrom
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich
Rotihistol	Roth
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich

2.2.6 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Platten	BD Falcon
Chamberslides, Lab-Tek	Beckton Dickinson

<i>Compound-Medium</i>	TissueTek
Einmal-Kanüle	Braun
Einmal-Spritze, 10 mL	BD Plastipak
<i>Falcon-Tube</i> , konisches Reaktionsgefäß, 15 mL, 50 mL	BD Falcon
<i>Kryomold</i>	TissueTek
Kryoröhrchen, Nunc	Thermo Scientific
Steriles Skalpell, Feather Disposable Scalpel No. 21	Pfm Medical
Trizol (TRI)-Reagent	Sigma-Aldrich
Zellkulturflaschen	BD Falcon

2.2.7 Wachstumsfaktoren, Enzyme und Antibiotika

Bezeichnung	Hersteller
EGF Einwaage: 100 µg Konzentration Stammlösung: 20 ng/µL	PeptoTech
FGF Einwaage: 50 µg Konzentration Stammlösung: 100 ng/µL	PeptoTech
Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/mL	Biochrom
Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %)	Biochrom

2.3 Gewebefärbungen

Histologische und Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten an Herzohrschnitten der Donoren 1-3. Aus jedem Herzohr wurden zwei ca. 3 mm breite Schnitte entnommen, so dass alle Schichten des Herzohrs quer geschnitten waren. Einer der Gewebeschnitte wurde in einer Einbettkassette entsprechend Tabelle 1 entwässert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin am Einbettautomaten.

Für die histologischen Färbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Herzohren geschnitten und mittels 1) Hämatoxylin-Eosin und 2) Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit

gefärbt. Die anschließende Observation und das Anfertigen von Photographien erfolgten an einem Axio-Mikroskop.

Der zweite jeweils 3 mm breite Schnitt eines jeden Herzohrs wurde in ein *Kryomold* gelegt, dieses komplett mit *Compound*-Medium bedeckt und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die kryokonservierten Herzohren geschnitten und mittels Anti-Human-CD90-Antikörpern gefärbt. Die anschließende Observation und das Anfertigen von Photographien erfolgten ebenfalls an einem Axio-Mikroskop.

Tabelle 1: Ablauf der Entwässerung von Herzohrgewebe für die Einbettung in Paraffin

Flüssigkeit	Dauer
Formalin	über Nacht
Leitungswasser	3 h
Ethanol, 50 %	1 h
Ethanol, 50 %	über Nacht
Ethanol, 70 %	1,5 h
Ethanol, 96 %	2 h
Ethanol, 96 %	2 h
Ethanol, 100 %	2 h
Ethanol, 100 %	2 h
Rotihistol	über Nacht
Rotihistol	1,5 h

2.4 Bildanalyse gefärbter Herzohrschnitte

Einzelne Aufnahmen der Masson-Goldner-Trichrom-gefärbten Herzohrschnitte wurden mit Hilfe des *Stitching Plugins* [48] für Fiji 1.0 für Image J [49] zusammengefügt, sodass die Herzohrschnitte als Ganzes dargestellt werden konnten. Die zusammengefügt Bilder wurden mit dem *GNU Image Manipulation Program* (GIMP) Version 2.8.18 auf einen weißen Hintergrund transformiert, anschließend wurde ein Weißabgleich durchgeführt.

Für eine quantitative Bestimmung der gefärbten Bereiche in den Schnitten wurden die zusammengefügt Aufnahmen mit Fiji 1.0 für Image J prozessiert (Abbildung 1). Der Abbildungsmaßstab wurde auf Pixel eingestellt. Das Herzgewebe wurde mit dem *Color Threshold Tool* als *Region of Interest* (ROI) ausgewählt, sodass der weiße Hintergrund exkludiert wurde [50]. In dieser ROI wurde erneut mit Hilfe des *Color Threshold Tools* eine ROI ausgewählt, diesmal Nicht-Muskelgewebe. Dafür wurden nur Farbtöne von 15-200 selektiert, die das rote Farbspektrum des Muskelgewebes ausschließen. Der so markierte Bereich wurde daraufhin in Pixel ausgemessen. Der Bereich des Nicht-Muskelgewebes ergab sich als Kalkulation des Anteils an der gesamten ROI.



Abbildung 1: Selektionsprozess der Region of Interest zur quantitativen Bestimmung von Muskel- und Nicht-Muskelgewebeanteilen mit Fiji 1.0 für Image J

Die einzelnen Mikroskopaufnahmen des Masson-Goldner-Trichrom-gefärbten Herzohrschnittes wurden mit dem *Stitching Plugin* für Fiji 1.0 für Image J zu einem Bild zusammengefügt und auf einen weißen Hintergrund übertragen. Das Gewebe wurde als Region of Interest (ROI) festgelegt (schwarz markierter Bereich in Schritt 2). In dieser ROI wurde mittels Farbauswahl Nicht-Muskelgewebe selektiert (schwarz markierter Bereich in Schritt 3) und anschließend die Fläche in Pixeln berechnet.

2.5 Zellisolation und Kultivierung

2.5.1 Auswachskultur

Die Isolation der Herzohrzellen erfolgte entsprechend der Arbeitsanweisung des Labors für *Tissue Engineering*. Die Herzohren wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines sterilen Skalpell in $\sim 1 \text{ mm}^3$ große Fragmente zerteilt.

Bei den drei Herzohren, die auch für die Gewebefärbungen verwendet wurden, erfolgte zusätzlich die Unterscheidung zwischen Fragmenten aus dem Epikard, dem Myokard und dem Endomyokard (proximaler Übergang von Myokard in Endokard). Für alle anderen Herzohren wurde eine Isolation aus dem Myokard durchgeführt.

Mittels eines sterilen Skalpell und einer Einmal-Kanüle wurden die Fragmente auf dem Boden von 6-Well-Platten befestigt. Als Medium für die Auswachskultur diente cMDM. Die Zellen wuchsen unter Standardkulturbedingungen aus, das heißt bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 \% CO_2 . Das Medium wurde alle 2-3 Tage partiell gewechselt. Wenn die Auswachskulturen 80 \% Konfluenz erreichten, meist am 13. Tag, erfolgte die Zellernte. Sie wurden mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA trypsiniert. Für die weiteren Untersuchungen wurde zwischen sortierten und unsortierten Herzohrzellen unterschieden.

2.5.2 Magnetische Zellsortierung

Um CD90-positive Zellen zu exkludieren und Verunreinigungen durch Fibroblasten und andere Zellen zu minimieren, wurden die geernteten Zellen mit magnetischen *Beads* sortiert. Dafür kam das *MACS-human-CD90-MicroBeads*-Kit zum Einsatz. Nach der

Zellernte erfolgte die Zählung der Herzohrzellen. Pro 5×10^6 Zellen wurden 320 μl MACS-Puffer und 80 μl Anti-CD90-*Microbeads* hinzugegeben und für eine Stunde im Dunkeln bei 4 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 2 mL MACS-Puffer gewaschen und für 10 min bei 326 g-Kraft zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 600 μl MACS-Puffer resuspendiert und in drei Schritten mit jeweils 200 μl Zellsuspension und 1 mL MACS-Puffer durch eine LS-MACS-Säule mit Präseparationsfilter gegeben. Die Säule wurde anschließend dreimal mit 3 mL MACS-Puffer gewaschen. Durch Hinzugabe von 5 mL MACS-Puffer zur Säule und Verwendung des Kolbens konnte die CD90-positive Zellpopulation extrahiert werden.

Das Eluat mit der CD90-negativen Zellpopulation wurde erneut zentrifugiert und mit 500 μl MACS-Puffer resuspendiert. Eine erneute Filtration erfolgte mit einer LD-MACS-Säule in zwei Schritten mit jeweils 250 μl Zellsuspension und 1 mL MACS-Puffer. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 1 mL MACS-Puffer gewaschen. Das Eluat wurde erneut zentrifugiert, mit cIDH-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Der Anteil der CD90-negativen Zellen konnte indirekt über die durchflusszytometrische Messung von CD90-positiven Zellen ermittelt werden. Das Eluat mit der CD90-negativen-Zellpopulation (sortierte Herzohrzellen) wurde für die weiteren Versuche verwendet.

2.5.3 Vergleich manuelles MACS-Verfahren mit AutoMACS

In einem Vorversuch sollte das AutoMACS-Verfahren mit der manuellen MACS-Sortierung (siehe oben) verglichen werden. Ziel war, aus den Ergebnissen Hypothesen für eine spätere Entscheidung für eines der beiden Sortierungsverfahren zu generieren. Das AutoMACS-Verfahren wird dabei aufgrund der einfacheren Handhabung und dem potenziell geringeren Kontaminationsrisiko präferiert.

Für den Versuch wurden Herzohrzellen von 3 Donoren isoliert und nach der Zellernte in Passage 0 sortiert. Das manuelle MACS-Verfahren wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Für das automatisierte Verfahren kam der AutoMACS zum Einsatz. Pro 5×10^6 Zellen wurden 320 μl MACS-Puffer und 80 μl CD90-*Microbeads* verwendet. Die Inkubationszeit betrug 60 min. Es wurde das Programm *depleteS* verwendet.

2.5.4 Zellvermehrung in Zellkultur

Die Aussaat der sortierten Herzohrzellen in Zellkulturflaschen erfolgte mit einer Dichte von 6.000 Zellen/ cm^2 . Als Medium wurde cIDH verwendet. Die Zellen wuchsen unter Standardkulturbedingungen aus, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

Das Passagieren erfolgte nach Erreichen von 80 % Konfluenz. Das Medium wurde abpipettiert, die Zellen mit der dem jeweiligen Kulturgefäß entsprechenden Menge PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt. Nach 3- bis 5-minütiger Inkubation im Brutschrank wurde die Trypsinierungsreaktion mit IDH-Medium gestoppt. Die

Zellsuspension wurde in einem *Falcon-Tube* bei 325 g-Kraft für 5 min zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde mit cIDH-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die Neuaussaat erfolgte, wenn nicht anders vorgegeben, mit 6.000 Zellen/cm². Die Zellzählung erfolgte dabei nach der Trypanblau-Methode.

2.6 Bestimmung von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde an einem FACSCalibur-Zytometer durchgeführt. Sortierte und unsortierte Zellen wurden direkt nach der MACS-Prozedur mit FITC-konjugierten murinen Anti-Human-CD90- und Anti-Human-CD105-Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurden sortierte Zellen in Passage 4 mit diesen beiden Antikörpern und murinen Anti-Human-CD44, -CD45-Antikörpern (auch FITC-konjugiert), und mit PE-konjugierten, murinen Anti-Human-CD29, -CD73 und -CD166-Antikörpern gefärbt. Direkt an die Zellsortierung schloss sich die Zellzählung und Färbung an; Zellen aus den Zellkulturflaschen wurden trypsiniert, anschließend erfolgte die Inkubation von $2,5 \times 10^5$ Zellen mit den Antikörpern auf Eis im Dunkeln für 15 min. Vor der zytometrischen Analyse erfolgte noch eine Waschung. Eine zusätzliche Färbung mit Propidiumjodid wurde unmittelbar vor der Durchflusszytometrie durchgeführt, um apoptotische Zellen und Zelldebris zu exkludieren. Ungefärbte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Daten wurden mittels Becton Dickinson CellQuest-Software erhoben und ausgewertet.

Bei Herzohren von 3 Donoren wurden Fragmente aus unterschiedlichen Geweberegionen entnommen: jeweils 6 aus dem Epikard, 12 aus dem Myokard und 6 aus dem Endomyokard. Aus diesen wurden Herzohrzellen isoliert, geerntet und in Passage 2 (bzw. 5 Messungen in Passage 3) mittels Durchflusszytometrie auf die Expression der Oberflächenmarker CD90 und CD105 untersucht.

2.7 Untersuchung von Oberflächenmarkern an kryokonservierten Herzohrzellen

Für den Einsatz in Form eines späteren Zellproduktes müssen die sortierten Herzohrzellen in einer Zellbank gelagert werden können. In einem ersten Versuch sollte evaluiert werden, ob die Zellen nach Kryokonversierung die gleiche Morphologie und das gleiche Oberflächenmarkerprofil aufweisen wie vor dem Einfrieren.

Passage-1-Zellen von 4 Donoren wurden für den Versuch verwendet. Das Kryomedium B wurde auf 4 °C gekühlt. Die Kryoröhrchen enthielten jeweils 0,5 mL Kryomedium A und wurden auf Eis vorgekühlt. Die Zellen wurden passagiert und gezählt. Pro Kryoröhrchen wurden $\sim 2 \times 10^6$ Zellen mit 0,5 mL Kryomedium B gemischt. Das Gemisch wurde anschließend in die Kryoröhrchen mit dem vorgelagerten Kryomedium A gegeben und mittels Einfrierhilfe über Nacht bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in einen Stickstofftank überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte jeweils nach 45 Tagen. Dazu wurde die Zellsuspension in einem Wasserbad bei 37 °C angetaut und der Inhalt aus jedem Röhrchen in jeweils 10 mL cIDH-Medium gegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 350 g-Kraft für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in cIDH-Medium aufgenommen. Die Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen erfolgte wie oben beschrieben. Sie wurden weiterkultiviert, bis sie Passage 4 erreichten. Dann erfolgte die Messung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie (siehe oben).

2.8 Immunfluoreszenzfärbung von Herzohrzellen

Die Kultivierung der Herzohrzellen erfolgte wie oben beschrieben. Nach der Zellernte schloss sich die Sortierung mittels *Microbeads* an. Die CD90-negative Population wurde weiterkultiviert und zwischen Passage 3 und 6 in die Kammern von *Chamberslides* eingesät. Für die Färbung wurden die Zellen mit einer Formalinlösung für 10 min fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Blocken von unspezifischen Bindungen erfolgte mit DBP für 1 h. Der CD90-Primärantikörper wurde mit 1:100 in DBP diluiert und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Waschen der Zellen mit DBP und anschließend die Färbung mit einem Alexa555-gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörper in einer 1:50-Dilution mit DBP. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden mit Bisbenzimid/BSA-Lösung 1:400 in PBS diluiert für 15 min gefärbt. Nach erneutem Waschen erfolgte das Mikroskopieren und Anfertigen von Lichtbildaufnahmen am AxioObserver-Mikroskop. NHDFs dienten als Positivkontrolle. Zur Kontrolle auf unspezifische Bindungen wurde bei ausgewählten Zellen die Inkubation mit dem Primärantikörper ausgelassen. Die Anpassung des Kontrasts erfolgte in allen Aufnahmen gleichermaßen mit der Zeiss AxioVision-Software.

2.9 Enzym-Immunoassay

In den Passagen 3, 4 und 5 wurden sortierte Herzohrzellen mit einer Dichte von 6.000 Zellen/cm² in Zellkulturflaschen eingesät. 24 h später wurden die Überstände abgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden geerntet und gezählt, um später die Menge an sekretiertem IL-8 und VEGF pro Zellzahl zu bestimmen. Die Überstände von 4 Donoren wurden aufgetaut und entsprechend dem herstellereigenen Protokoll in einem ELISA verwendet. Die Konzentrationen von IL-8 und VEGF ließen sich anschließend über die Stärke des Farbumschlags mit einem photometrischen Mikroplattenleser bestimmen. Zur Vergleichbarkeit der Werte erfolgte die Bestimmung der Konzentration der Faktoren pro 1 x 10⁵ Zellen.

2.10 RNA-Isolation und Mikroarray-Analyse

2.10.1 RNA-Isolation

Sortierte Herzohrzellen von 3 Donoren wurden in Passage 4 mit dem TRI-Reagent lysiert und jeweils 1 mL des Lysats wurde bei -80 °C gelagert. Die gefrorenen Lysate aller drei Donoren wurden aufgetaut und mit 133 µL 1-Brom-3-chlorpropan gemischt, gefolgt von 15 min bei 10 g-Kraft in einem Thermomixer und anschließend 60 min Zentrifugation bei 16.000 g-Kraft. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 70 % Ethanol die Präzipitation der RNA hervorgerufen. Die weitere Aufreinigung der Lysate erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Für die Analyse der Integrität und Reinheit der Proben kamen der Agilent-Bioanalyser und das NanoDrop-Spektrophotometer zum Einsatz.

2.10.2 Mikroarray-Analyse

Um die Genexpression auf RNA-Ebene zu bestimmen, wurden *HG-133 plus 2 GeneChips* verwendet. Es wurden 250 ng RNA benutzt, um Biotin-markierte komplementäre RNA zu synthetisieren. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung von 10 µg der fragmentierten komplementären RNA für 16 h bei 45 °C auf die *GeneChips*. Das Affymetrix-Set wurde für das Waschen, Färben und Scannen des Materials benutzt. Die Datenanalyse erfolgte entsprechend den Herstellerempfehlungen. Die Rohdaten wurden mit der Affymetrix GeneChip Operating Software 1.4 prozessiert und normalisiert.

Die Expressionsdaten der drei Donoren wurden ausgewertet und mit bereits publizierten Daten von EMB-isolierten *CardAP*-Zellen von ebenfalls 3 Donoren verglichen [40].

Der Fokus der Auswertung lag auf der Bestätigung der Durchflusszytometrieergebnisse und der Expression von Genen, die in die Prozesse Angiogenese und Vaskulogenese involviert sind. Der Vergleich der sortierten Herzohrzellen mit den EMB-isolierten *CardAP*-Zellen erfolgte, da von starken Ähnlichkeiten auf der Genexpressionsebene ausgegangen wurde.

In der erstellten Datenbank wurde nach den Genen der *CardAP*-Zell-definierenden Oberflächenmarker CD29⁺, CD44⁺, CD45⁻, CD73⁺, CD90⁻, CD105⁺ und CD166⁺ gesucht und festgestellt, ob sie auf RNA-Ebene exprimiert werden. Anschließend wurde untersucht, ob die sortierten Herzohrzellen pro-angiogenes Potenzial auf Genexpressionsebene zeigen. Es erfolgte daher eine Sichtung der Datensätze auf die 84 Schlüsselgene, die üblicherweise in Angiogenese-Polymerasekettenreaktion (PCR)-Arrays verwendet werden [51, 52]. Eingeschlossen wurden die Gene, deren Expression als mindestens 1 *Probe Set ID* als vorhanden ($p < 0,05$) in allen drei Donoren detektiert wurde. Das gleiche Vorgehen wurde für die bereits bestehenden Mikroarray-Daten der EMB-isolierten *CardAP*-Zellen angewendet.

In einem weiteren Schritt wurden die Gene untersucht, deren Expression signifikant ($p < 0,05$) hoch- oder herunterreguliert waren. Dafür wurde jeder der 3 *GeneChips* der EMB-isolierten *CardAP*-Zellen mit jedem der 3 *GeneChips* der sortierten Herzohrzellen verglichen. Eine differentielle Expression wurde bei einem *Fold Change* von ≤ -2 oder ≥ 2 angenommen, wenn dieser bei ≥ 80 % der 9 Vergleiche auftrat.

Die so ausgewählten Gene wurde in die *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) 6.7 [53] eingespeist und auf ihre Beteiligung an den biologischen Prozessen Angiogenese und Blutgefäß- und Herzentwicklung untersucht. Die Annotationen von DAVID beruhten auf drei Genontologie (GO)-Datenbanken, die nach biologischen Prozessen (GOTERM-BP-FAT), zellulären Komponenten (GOTERM-CC-FAT) und molekularen Funktionen (GOTERM_MF-FAT) klassifiziert sind.

Aufgrund des gleichen Isolationsprotokolls und der Herkunft aus Herzgewebe bestand die Annahme, dass sortierten Herzohrzellen, in Bezug auf funktionelle Kategorien, die mit Geweberegeneration in Verbindung stehen, ähnliche Cluster formen würden wie EMB-isolierte *CardAP*-Zellen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden zwei Gruppen gebildet: Gruppe 1 enthielt alle Gene, die mit dem GO-Term Angiogenese („*angiogenesis*“) annotiert sind und Gruppe 2 alle Gene, die mit den GO-Terms Blutgefäßentwicklung („*blood vessel development*“ und „*vasculature development*“) und Blutgefäßmorphogenese („*blood vessel morphogenesis*“) annotiert waren. Nur Gene, die zu 100 % detektiert wurden ($p < 0,05$), kamen in die Auswahl. Wenn mehrere Varianten eines Genes vorhanden waren, wurden alle bis auf eine eliminiert.

Die Gene wurden mit der *Gene Expression Similarity Investigation Suite* (GENESIS)-Software 1.7.7 [54] hierarchisch geclustert. Die Expressionswerte aller 6 Donoren in jeder Gruppe wurden \log_2 -transformiert. Die Experimente wurden normalisiert. Das Clustern erfolgte als *complete linkage* für Experimente und Gene.

2.11 Wachstumskinetik und Berechnung theoretischer Zellzahlen

2.11.1 Wachstumskinetik

Herzohrzellen von 5 Donoren wurden wie oben beschrieben isoliert und in Passage 2 mit einer Dichte von 6.000 Zellen/cm² in je drei T25-Zellkulturflaschen pro Donor ausgesät. Nach 5-6 Tagen wurden sie trypsiniert und gezählt und mit der initialen Dichte von 6.000 Zellen/cm² neu ausgesät. Lag die geerntete Zellzahl unter $1,5 \times 10^5$, wurde die Kultivierung beendet.

Für die Wachstumskinetik wurden aus den ermittelten Werten pro Donor und Passage Mittelwerte gebildet. Diese dienten als Grundlage zur Berechnung der Verdopplungszeit t_D und der spezifischen Wachstumsrate μ :

$$t_D = t * \ln(2) / \ln(N_1/N_0) \quad \text{und} \quad \mu = \ln(2) / t_D$$

- t_D = Verdopplungszeit in h
- t = Kultivierungszeit in h
- N_1 = Zellzahl nach dem Passagieren
- N_0 = Zellzahl nach dem Einsäen (standardmäßig $1,5 \times 10^5$ Zellen)
- μ = Wachstumsrate in h^{-1}

2.11.2 Berechnung theoretischer Zellzahlen

Die Berechnung der theoretischen Zellzahl ist wichtig, um in Erfahrung zu bringen, wie viele Zellen aus einem Herzohr für die spätere klinische Anwendung am Patienten zur Verfügung stehen werden. Herzohren von 3 Donoren wurden verwendet, um die durchschnittliche Anzahl an Fragmenten zu ermitteln, die sich aus einem Herzohr gewinnen lassen. Dafür wurden die verwendeten Herzohren vermessen und gewogen. Anschließend wurde das Epikard entfernt. Aus dem Myokard wurden ca. 1 mm^3 große Fragmente mittels Pinzette und Skalpell geschnitten, wie sie auch für die Auswachskultur verwendet werden. Die Fragmente wurden gezählt. 126 Fragmente pro Donor wurden für Auswachskulturen verwendet, wobei 3 Fragmente jeweils in einen *Well* einer *6-Well*-Platte platziert wurden. Zellernte, Pooling und Zellsortierung mittels magnetischer *Beads* erfolgte nach 13 Tagen.

Die Ergebnisse der Zellzählung wurden zusammen mit denen der Wachstumskinetik verwendet, um die theoretische Zellzahl von sortierten Herzohrzellen in den Passagen 3 und 4 zu berechnen. Dafür wurde folgende Gleichung verwendet:

$$N = N_0 * e^{\mu * t}$$

- N = theoretische Zellzahl
- N_0 = Anzahl der eingesäten Zellen
- μ = Wachstumsrate in h^{-1}
- t = Kultivierungszeit in h

2.12 Statistische Methoden und graphische Aufbereitung

Die statistische Auswertung und die Graphiken für die Publikation (Detert et al., 2018) und für diese Arbeit wurden mit dem Programm GraphPad Prism 7.0a durchgeführt und werden an entsprechender Stelle beschrieben. Ergänzende statistische Tests für diese Arbeit wurden mit dem Programm RStudio Version 1.1.419 basierend auf R 3.4.3 durchgeführt. Abbildungen von histologischen Schnitten wurden mittels GIMP Version 2.8.18 zusammengestellt. Wenn nicht anders angegeben, werden Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

Ergänzende statistische Tests dieser Arbeit:

1. Zusammenhang zwischen Geweberegion und CD90-Expression:

Es wurden Daten von 3 Donoren für jeweils 3 Herzohrregionen generiert. Die einzelnen Daten wurden mit einem Histogramm dargestellt und zeigten keine parametrische Verteilung. Zur Berechnung, ob signifikante Unterschiede in der CD90-Expression zwischen den drei Herzohrregionen bestehen, wurden die Mediane aus den Ergebnissen pro Region und Herzohr berechnet. Für die statistische Berechnung wurde das „LD F1 Model“ aus dem Paket *npard* für RStudio verwendet [55]. Als statistischer Test diente eine Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA). *npard* ist ein Paket zur Durchführung non-parametrischer Tests für longitudinale Designs.

2. Pro-angiogene Eigenschaften sortierter Herzohrzellen

Es wurden jeweils für die VEGF- und die IL-8-Sekretion Daten von 4 Donoren erhoben, jeweils in drei unterschiedlichen Passagen. Zur Berechnung, ob signifikante Unterschiede zwischen den Passagen bestehen, wurde das „LD F1 Model“ aus dem Paket *npard* für RStudio verwendet (siehe oben). Als statistischer Test diente eine ANOVA.

3 Ergebnisse²

3.1 Isolation und Charakterisierung von Herzzellen

3.1.1 Zellmorphologie

Auswachskulturen aus myokardialen Herzzellfragmenten wurden nach dem Protokoll des Labors für *Tissue Engineering* durchgeführt, das bereits zur Isolation von *CardAP*-Zellen etabliert ist. Nach 6-8 Tagen wuchsen fibroblastenartige Zellen an den Rändern der Herzzellfragmente aus (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 2a). Die Zellernte erfolgte nach Bildung eines konfluenten Zellrings am 12.-14. Tag. Die geernteten Zellen wurden anschließend per MACS sortiert und die CD90-Negativfraktion weiterkultiviert. Die Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

3.1.2 Oberflächenmarker

Es wurde der Oberflächenmarker CD90 bei Herzzellen von 7 Donoren vor und nach der MACS-Sortierung bestimmt. Die durchschnittliche CD90-Expression wurde durch das Verfahren von 68,66 % \pm 11,72 % SD auf 18,51 % \pm 14,67 % SD gesenkt (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 3a).

Die sortierten Herzzellen wurden weiterkultiviert. In Passage 4 wurde die Expression der Oberflächenmarker CD29, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 und CD166 bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Zellpopulation positiv für CD29, CD44, CD73 und CD166 war und negativ für CD45. Die CD90-Expression lag bei durchschnittlich 17,69 % \pm 5,09 % SD, was im Vergleich zu den unsortierten Zellen als *low* klassifiziert wurde (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 3b).

3.1.3 Oberflächenmarker nach Kryokonservierung

Zellen von 4 Donoren wurden in Passage 1 kryokonserviert, nach 45 Tagen aufgetaut und anschließend bis Passage 4 weiterkultiviert. Morphologisch und wachstumskinetisch zeigten sie keine Unterschiede zu nicht zuvor kryokonservierten Zellen. In Passage 4 wurden die *CardAP*-Zell-definierenden Oberflächenmarker per Durchflusszytometrie bestimmt. Der Vergleich der Werte mit denen von nicht-kryokonservierten Zellen der gleichen Donoren zeigt, dass sie nahezu identisch sind (siehe Tabelle 2).

² Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde bereits in modifizierter Form und in englischer Sprache veröffentlicht in: Detert, S., Stamm, C., Beez, C., Diedrichs, F., Ringe, J., Van Linthout, S., Seifert, M., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Haag, M., *The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(3): S. e1404-e1417.

Tabelle 2: Expressionswerte nach Durchflusszytometrie von Passage-4-Herzohrzellen mit und ohne vorhergehender Kryokonservierung

Marker	Herzohr 4		Herzohr 5		Herzohr 6		Herzohr 7	
	KK-	KK+	KK-	KK+	KK-	KK+	KK-	KK+
CD29	99,82 %	100,00 %	99,98 %	99,97 %	99,98 %	99,89 %	99,95 %	99,94 %
CD44	99,98 %	99,87 %	99,88 %	99,89 %	99,89 %	98,76 %	99,54 %	99,45 %
CD45	0,01 %	0,05 %	0,02 %	0,00 %	0,03 %	0,05 %	0,00 %	0,00 %
CD73	100,00 %	99,76 %	99,51 %	99,56 %	99,81 %	99,70 %	94,38 %	99,87 %
CD90	19,31 %	22,73 %	9,53 %	10,33 %	20,29 %	21,63 %	20,69 %	17,09 %
CD105	64,31 %	97,67 %	99,13 %	98,94 %	97,09 %	98,11 %	97,82 %	96,68 %
CD166	99,25 %	97,09 %	99,46 %	98,75 %	98,88 %	99,44 %	95,87 %	98,74 %

CD = *Cluster of Differentiation*; KK- = Zellen ohne vorherige Kryokonservierung;
 KK+ = Zellen nach vorheriger Kryokonservierung

3.1.4 Vergleich manuelles MACS-Verfahren mit AutoMACS

In einem Vorversuch sollte mit Zellen von 3 Donoren herausgefunden werden, ob eine Umstellung der manuellen Zellsortierung auf das AutoMACS-Verfahren zu einer reineren, also CD90-negativen, Zellpopulation führt und ob die Ergebnisse akzeptabel in Bezug auf den Zellverlust sind. Die Ergebnisse des AutoMACS-Verfahrens sind in Tabelle 3 dargestellt, die des manuellen MACS-Verfahrens in Tabelle 4. Es zeigt sich, dass die CD90-Expression in der Negativfraktion nach Zellsortierung umso niedriger ist, je geringer die CD90-Expression vor der Zellsortierung war. Im Gegensatz zum AutoMACS-Verfahren ist das Verhältnis beim manuellen MACS-Verfahren deutlich zur Negativfraktion verschoben. Auch die Expressionswerte nach der Zellsortierung sind dreifach niedriger als beim automatisierten Verfahren.

Tabelle 3: Ergebnisse der Zellsortierung mit dem AutoMACS-Verfahren

Herz- ohr	Eingesetzte Zellzahl	Zellzahl CD90- Positivfraktion	Zellzahl CD90- Negativfraktion	CD90- Expression vor MACS	CD90- Expression in Negativfraktion
8	31,55 x 10 ⁵	7,45 x 10 ⁵	8,85 x 10 ⁵	56,36 %	15,60 %
9	36,75 x 10 ⁵	6,55 x 10 ⁵	7,85 x 10 ⁵	74,07 %	31,00 %
10	57,88 x 10 ⁵	15,10 x 10 ⁵	13,20 x 10 ⁵	72,75 %	18,62 %

AutoMACS = Automatisiertes *Magnetic-Activated Cell Sorting*; CD = *Cluster of Differentiation*

Tabelle 4: Ergebnisse der Zellsortierung mit dem manuellen MACS-Verfahren

Herz- ohr	Eingesetzte Zellzahl	Zellzahl CD90- Positivfraktion	Zellzahl CD90- Negativfraktion	CD90- Expression vor MACS	CD90- Expression in Negativfraktion
8	31,55 x 10 ⁵	7,45 x 10 ⁵	13,00 x 10 ⁵	56,36 %	4,22 %
9	36,75 x 10 ⁵	6,55 x 10 ⁵	14,00 x 10 ⁵	74,07 %	10,90 %
10	57,88 x 10 ⁵	15,10 x 10 ⁵	23,76 x 10 ⁵	72,75 %	4,21 %

MACS = *Magnetic-Activated Cell Sorting*; CD = *Cluster of Differentiation*

3.1.5 Zellfärbung

Um die gemessenen CD90-Expressionswerte lichtbildmikroskopisch zu bestätigen, wurden sortierte Herzohrzellen auf *Chamberslides* aufgebracht und auf den Marker CD90 gefärbt. NHDFs dienten als Positivkontrolle und morphologischer Vergleich. Es ließ sich nur ein geringer Teil der sortierten Herzohrzellen anfärben, zudem ist die Intensität des Farbstoffs in diesen Zellen schwächer verglichen mit den Fibroblasten der Positivkontrolle (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 2b).

3.1.6 Mikroarray

Um herauszufinden, ob die sortierten Herzohrzellen ein ähnliches Expressionsprofil wie *CardAP*-Zellen aufweisen, wurde ein Gen-Clustering durchgeführt. Die RNA von sortierten Herzohrzellen 3 verschiedener Donoren wurde zunächst auf *GeneChips* aufgebracht. Die Daten wurden mit bereits existierenden Daten von *CardAP*-Mikroarrays von ebenfalls 3 Donoren verglichen. Dazu wurde jeder Herzohr-*GeneChip* mit jedem

CardAP-GeneChip verglichen, insgesamt also 9 Vergleiche. Signifikante Unterschiede wurden definiert als *fold change* ≤ -2 oder ≥ 2 , der in $\geq 80\%$ aller verglichenen *GeneChips* auftrat.

Als Resultat ergaben sich 1031 differentiell exprimierte *Probe Sets*, die 811 Gene repräsentieren, die in den Herzohrzellen höher exprimiert sind als in den *CardAP*-Zellen und 592 differentiell exprimierte *Probe Sets*, die 398 Gene repräsentieren, die in den Herzohrzellen weniger exprimiert sind.

Um herauszufinden, in welche biologischen Prozesse diese Gene eingebunden sind, wurden die *Probe Sets* in die DAVID [53] geladen und funktionell geclustert. Die Cluster wurden auf Prozesse untersucht, die mit Angiogenese in Verbindung stehen. Dafür wurden die *GO-Terms* „*angiogenesis*“, „*blood vessel development*“, „*blood vessel morphogenesis*“, „*cardiac muscle tissue development*“, „*cardiac muscle cell differentiation*“ und „*vasculature development*“ verwendet. Insgesamt fanden sich 27 Gene mit höherer Expression in den Herzohrzellen und 11 Gene mit höherer Expression in den *CardAP*-Zellen (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Tabellen 2 und 3).

In einem weiteren Schritt wurden zwei Gruppen gebildet, um Herzohr- mit *CardAP*-Zellen hinsichtlich ihres Angiogeneseprofiles miteinander zu vergleichen: a) Angiogenese und b) Gefäßentwicklung. Es wurden alle *Gene-IDs* eingeschlossen, die mit den zugehörigen *GO-Terms* „*angiogenesis*“, „*vasculature development*“, „*blood vessel development*“ und „*blood vessel morphology*“ annotiert waren. Die Vergleiche wurden mittels hierarchischen Clustern mit Hilfe von GENESIS 1.7.7 [54] graphisch dargestellt (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 5a und b). Sortierte Herzohrzellen und *CardAP*-Zellen bildeten jeweils eigene Cluster, wenn nach *experiments* geordnet, die einzelnen Gene (geordnet nach *genes*) formten dagegen relativ homogene Cluster.

Um die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenmarker zu bestätigen, wurden deren Gene in Mikroarray-Datensätzen der Herzohrzellen und zusätzlich in den bereits vorhandenen Datensätzen der *CardAP*-Zellen gesucht. Die Vergleiche der Arrays von sortierten Herzohrzellen und *CardAP*-Zellen (siehe Tabelle 5) zeigen, dass sich die Expressionsprofile nur hinsichtlich des Markers CD90 unterscheiden, ansonsten entsprechen sie dem durchflusszytometrisch ermittelten Profil von *CardAP*-Zellen. Im Gegensatz zu den *CardAP*-Zellen konnte bei den sortierten Herzohrzellen in zwei Datensätzen CD90 detektiert werden. Auch in den Durchflusszytometrieuntersuchungen waren die sortierten Herzohrzellen im Gegensatz zu den *CardAP*-Zellen [40] nicht CD90-negativ.

Tabelle 5: Mikroarray-Vergleich von sortierten Herzohrzellen mit CardAP-Zellen von jeweils 3 Donoren hinsichtlich der CardAP-Zell-definierenden Oberflächenmarker

Marker / Gene Symbol	Sortierte Herzohrzellen			CardAP-Zellen		
	Herzohr 4	Herzohr 5	Herzohr 6	EMB x	EMB y	EMB z
CD29 / ITGB1	+	+	+	+	+	+
CD44 / CD44	+	+	+	+	+	+
CD45 / PTPRC	-	-	-	-	-	-
CD73 / NT5E	+	+	+	+	+	+
CD90 / THY1	+	-	+	-	-	-
CD105 / ENG	+	+	+	+	+	+
CD166 / ALCAM	+	+	+	+	+	+

ALCAM = Aktiviertes Leukozyten-Zelladhäsions-Molekül; CD = *Cluster of Differentiation*; EMB = endomyokardiale Biopsie; ENG = Endoglin; ITGB1 = Integrin-Beta 1; NT5E = 5'-Nukleotidase; PTPRC = Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor-Typ C; THY1 = Thymus-Zell-Antigen

+ = Marker wird exprimiert; - = Marker wird nicht exprimiert

3.2 Zusammenhang zwischen Geweberegion und CD90-Expression

Bei Herzohren von 3 Donoren wurden Fragmente den Regionen Epikard, Myokard und Endomyokard entnommen. Daraus isolierte Zellen (unsortiert, ohne MACS) wurden auf die Expression der Oberflächenmarker CD90 und CD105 untersucht.

Die mittlere CD105-Expression lag bei > 95 %, die CD90-Expression variierte zwischen den Geweberegionen. Der höchste Einzelwert der CD90-Expression zeigte sich bei Zellen aus einem epikardialen Fragment (Donor 3) mit 99,52 %, der niedrigste gemessene Wert ebenfalls bei Zellen aus einem epikardialen Fragment (Donor 1) mit 33,78 %. Im Mittel lagen die Werte bei den Zellen aus epikardialen Fragmenten jedoch

am höchsten (siehe Abbildung 2). Es wurde ein gemischtes Modell verwendet, um herauszufinden, ob die Expressionsunterschiede zwischen den drei Herzohrregionen signifikant waren. Aufgrund der ungleichen Streuung der Werte wurde in dem Modell mit den Medianwerten gearbeitet, da davon ausgegangen wurde, dass diese die Daten besser repräsentieren als das arithmetische Mittel. Die Verteilung der Messwerte des Epikards war signifikant höher als die von Myo- und Endomyokard. Der relative Effekt der Region „Epikard“ lag bei 0,796 ($p = 0,000063$). Das heißt, dass, bezogen auf diese Stichprobe, eine Messung im Epikard höher ausfällt als eine zufällige Messung aus der gemeinsamen Verteilung aller drei Regionen.

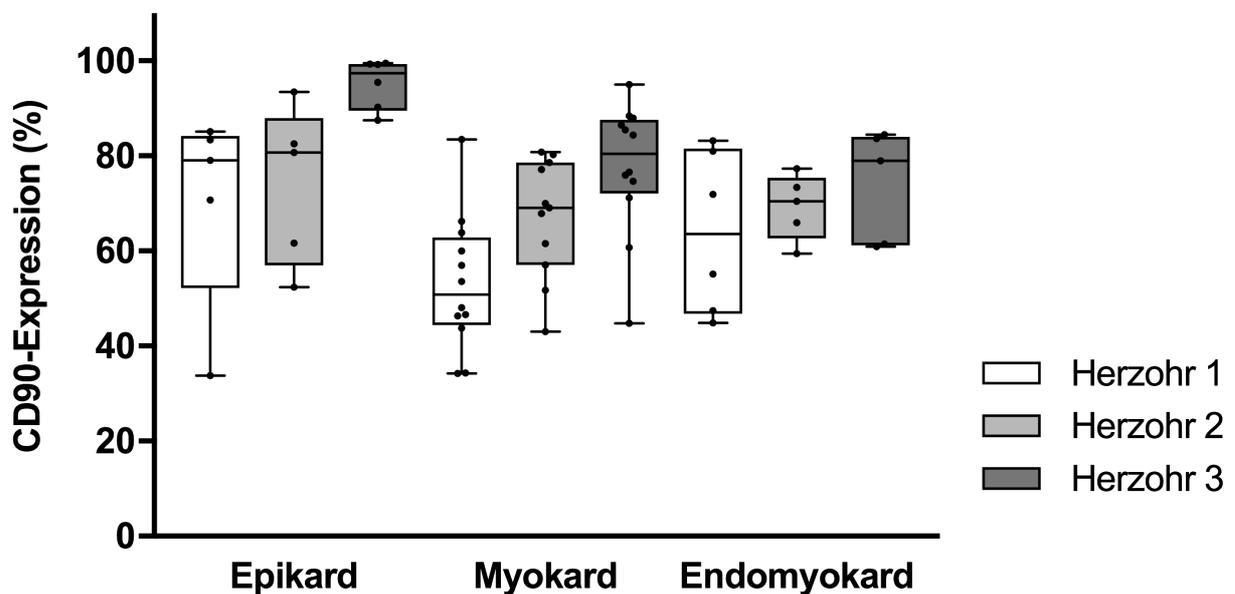


Abbildung 2: CD90-Expression von unsortierten Herzohrzellen nach Geweberegionen

Es wurden jeweils 6 Fragmente aus den Herzohrregionen Epikard und Endomyokard und 12 Fragmente aus dem Myokard geschnitten und eine Auswachskultur durchgeführt. Nach der Zellernte wurde die CD90-Expression bestimmt. Die Werte sind nach Herzohr (Donor 1-3) und Region in Form von Boxplots dargestellt. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen, die horizontale Linie zeigt den Median. Die Box wird durch das obere und untere Quartil begrenzt, die Länge entspricht dem Interquartilsabstand. Die *Whiskers* zeigen Minimum und Maximum der Werte an. Die einzelnen Messwerte sind als Punkte dargestellt. Die Mediane von links nach rechts lauten wie folgt: 79,02 %; 80,70 %; 97,35 % (Epikard), 50,83 %; 69,05 %; 80,46 % (Myokard), 63,54 %; 70,47 %; 79,01 % (Endomyokard). Die CD90-Expression war im Epikard signifikant höher als im Myo- und Endomyokard ($p = 0,000063$).

CD = *Cluster of Differentiation*

Um die Werte den histologischen Aspekten der 3 Donoren zuzuordnen, wurden Herzohrschnitte angefertigt und nach Hämatoxylin-Eosin, Masson-Goldner-Trichrom und

CD90 gefärbt (Abbildung 3). Insgesamt weist Donor 3 optisch mehr Bindegewebe, Fibrose und Adipozyten auf.

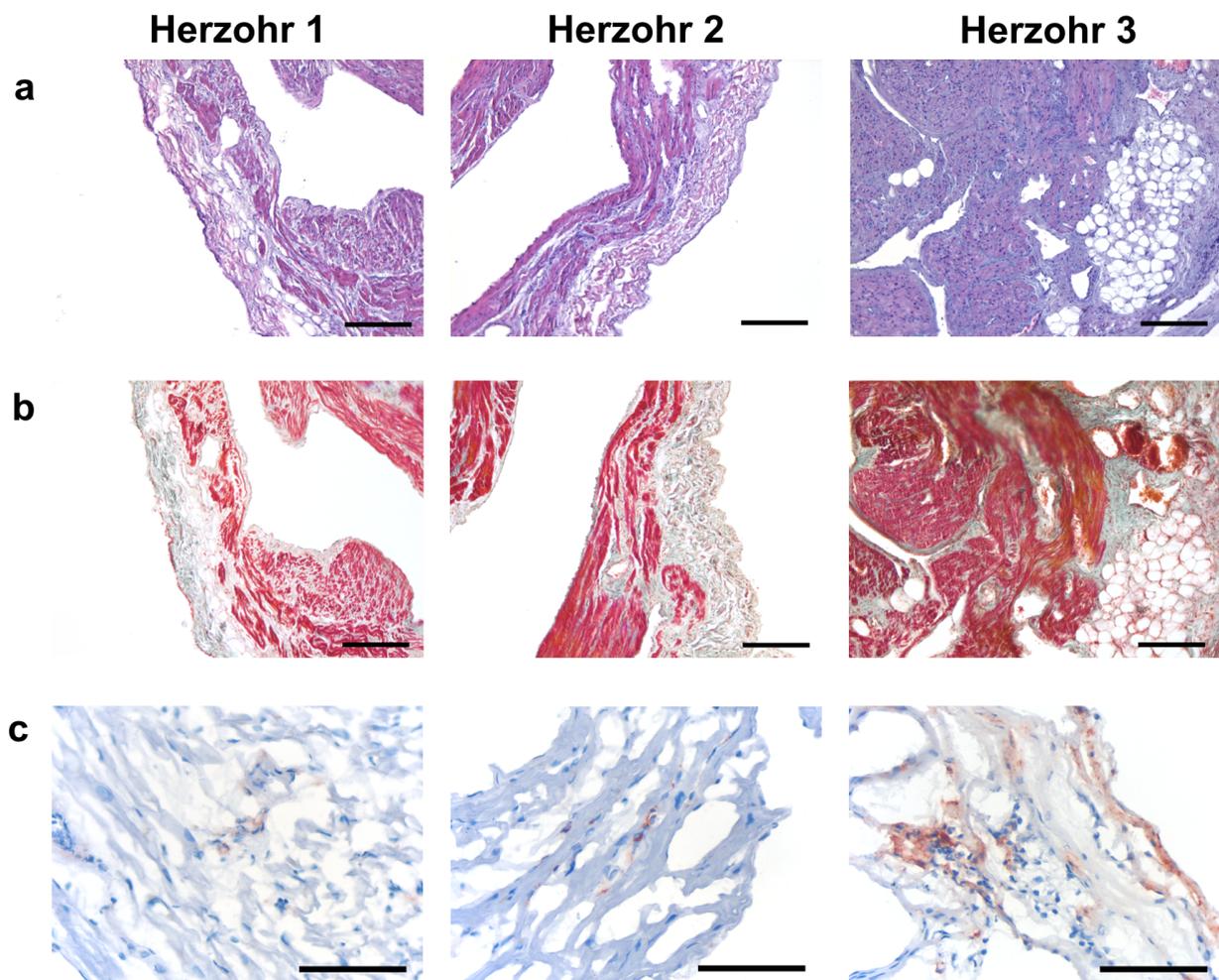


Abbildung 3: Gewebefärbungen von Herzohrschnitten der Donoren 1-3.

a: Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Donor 1 und 2 zeigen eine ähnliche Morphologie. Donor 3 weist dichteres Muskelgewebe auf sowie Adipozytenester und große fibrosierte Areale. Messbalken entsprechen 250 μm .

b: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung. Muskelgewebe stellt sich rot dar, Bindegewebe grün/grau. Das Epikard kann in allen drei Abbildungen als breiter Bindegewebsstreifen ohne Myozyten erkannt werden. Bei Donor 3 lassen sich große fibrosierte Anteile im Myokard erkennen. Messbalken entsprechen 250 μm .

c: CD90-Immunhistochemiefärbung. CD90-positive Areale (braune Färbung) treten bei Donor 1 und 2 nur vereinzelt auf. Donor 3 zeigt eine großflächigere Expression, besonders im Epikard (rechts im Bild). Messbalken entsprechen 100 μm .

In den Masson-Goldner-Trichrom-gefärbten Schnitten wurde die Fläche von Muskelgewebe und Nicht-Muskelgewebe, hauptsächlich Bindegewebe, mithilfe von Graphiksoftware annäherungsweise bestimmt. Wiederum zeigten Donor 1 und 2 ähnliche Relationen von Muskel- zu Nicht-Muskelgewebe, bei Donor 3 macht dagegen das Nicht-

Muskelgewebe fast zwei Drittel der vermessenen Fläche aus (Abbildung 4). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD90-Expression höher ist, desto mehr Bindegewebe das Gewebe aufweist.



Abbildung 4: Masson-Goldner-Trichrom-Färbung von Herzohrschnitten der Donoren 1-3

Donor 1 und 2 zeigen vergleichbare Ratios von Muskelgewebe (MG) zu Bindegewebe (BGW), während bei Donor 3 die Fläche des Bindegewebes überwiegt. Dort lassen sich Bindegewebssepten im Myokard, eine verbreiterte Epikardschicht (grau-grüne Färbung rechts im Bild) und Adipozytennester erkennen.

3.3 Pro-angiogene Eigenschaften sortierter Herzohrzellen

3.3.1 Enzym-Immunoassay

Sortierte Herzohrzellen in Passage 3, 4 und 5 von 4 Donoren wurden ausgesät und kultiviert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und später mittels ELISA auf den Gehalt der pro-angiogenen Faktoren VEGF und IL-8 untersucht.

Die VEGF-Werte reichten von 47,14 bis 385,54 pg/10⁵ Zellen, die IL-8-Werte von 39,56 bis 172,72 ng/10⁵ Zellen (siehe Abbildung 5). Es wurde ein gemischtes Modell verwendet, um herauszufinden, ob es zwischen den Passagen signifikante Unterschiede gibt. Die ANOVA ergab einen p-Wert von 0,65 für VEGF und 0,21 für IL-8, somit in beiden Fällen keine signifikanten Unterschiede.

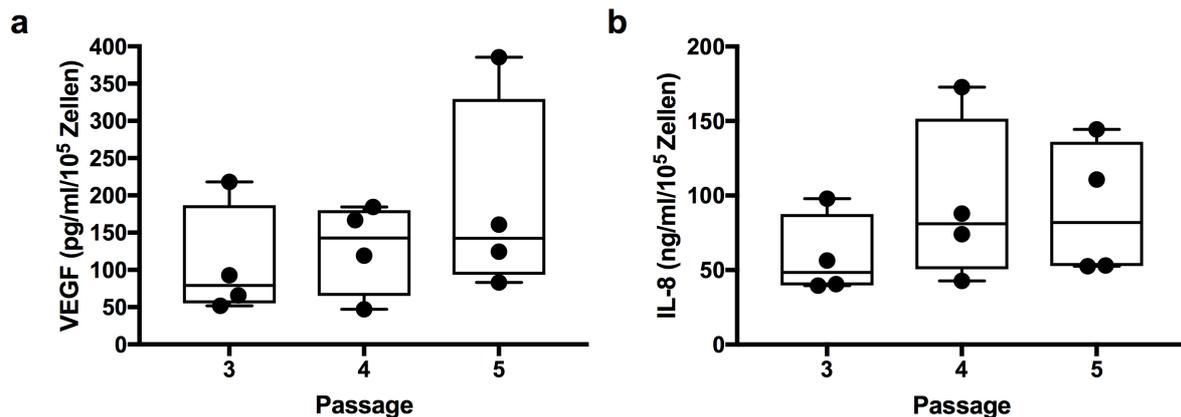


Abbildung 5: VEGF- und IL-8-Sekretionswerte im Enzym-Immunoassay

Überstände von sortierten Herzohrzellen aus Passage 3, 4 und 5 von 4 Donoren wurden mittels ELISA auf die enthaltene Menge VEGF (a) bzw. IL-8 (b) pro 10^5 Zellen untersucht. Die Werte sind nach Passagen geordnet als Boxplots dargestellt. Die Box entspricht dem Bereich, in dem die mittleren 50 % der Daten liegen, die horizontale Linie zeigt den Median. Die Mediane von links nach rechts (Passage 3 bis 5) lauten wie folgt: 79,31; 143,00, 142,60 (VEGF in $\text{pg/ml}/10^5$ Zellen) und 48,48; 81,01; 81,91 (IL-8 in $\text{ng/ml}/10^5$ Zellen). Die Box wird durch das obere und untere Quartil begrenzt, die Länge entspricht dem Interquartilsabstand. Die *Whiskers* zeigen Minimum und Maximum der Werte an. Die einzelnen Messwerte sind als Punkte dargestellt. Zwischen den Passagen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

ELISA = *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; VEGF = Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; IL-8 = Interleukin-8

3.3.2 Mikroarray

Um der Hypothese nachzugehen, sortierte Herzohrzellen würden Gene exprimieren, die in Angiogeneseprozessen involviert sind, wurden die Mikroarrays von Herzohrzellen dreier Donoren untersucht. Als Referenz dienten 84 Schlüsselgene, die auch in Angiogenese-Assays verwendet werden. 60 der 84 Gene waren in allen drei Datensätzen als mindestens eine *Probe Set ID* präsent (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Tabelle 1), darunter auch VEGF und IL-8 sowie weitere Gene des VEGF-Pathways wie *kinase insert domain receptor* (KDR), *sphingosine kinase 1* (SPHK1) und *V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1* (AKT1). Dasselbe Vorgehen wurde für die bereits existierenden Datensätze von *CardAP*-Mikroarrays dreier Donoren gewählt. Hier wurden ebenfalls 60 Gene als präsent detektiert, jedoch nicht in allen Fällen dieselben.

Die Expression folgender Gene unterschied sich zwischen *CardAP*-Mikroarrays und Herzohr-Mikroarrays: *chemokine ligand 11* (CCL11), *coagulation factor III* (F3), *fibroblast growth factor 1* (FGF1), *fms-related tyrosine kinase 1* (FLT1), *hepatocyte growth factor* (HGF), *midkine* (MDK), *transforming growth factor alpha* (TGFA) und *Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1* (TIE1). Dabei waren FLT1, HGF, MDK, und TIE1 in Herzohr-Mikroarrays präsent, jedoch nicht in *CardAP*-Mikroarrays, und

CCL11, F3, FGF1 und TGFA waren in den *CardAP*-Mikroarrays präsent, jedoch nicht in den Herzohr-Mikroarrays (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Tabelle 1).

3.4 Theoretische Zellmengen für ein allogenes Zellprodukt

Um herauszufinden, wie viele Zellen durchschnittlich aus einem Gewebefragment gewonnen werden können, wurde zunächst eine Wachstumskinetik erstellt. Sortierte Herzohrzellen von 5 Donoren wurden in Passage 2 mit einer Dichte von 6.000 Zellen/cm² ausgesät, für 5-6 Tage kultiviert, gezählt und anschließend wieder neu eingesät, bis ihre Zahl kleiner war als die benötigten 6.000 Zellen/cm². Die maximale Passagezahl variierte dabei zwischen 7 (Donor 1) und 10 (Donor 2). In den Passagen 2 bis 5 zeigte sich ein relativ ähnliches Wachstumsverhalten bei allen 5 Donoren (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 6a). Die durchschnittliche Verdopplungszeit betrug 37,94 h und die durchschnittliche Wachstumsrate μ 0,01827 h⁻¹.

In einem zweiten Schritt wurde ermittelt, wie viele myokardiale Fragmente durchschnittlich aus einem Herzohr gewonnen werden können. Herzohren von 3 Donoren wurden dafür in ~1 mm³ große Fragmente seziiert. Dabei entstanden jeweils 243, 234 und 277 Fragmente. Von jedem Donor wurden 126 Fragmente für Auswachskulturen verwendet mit jeweils drei Fragmenten pro *Well* einer 6-*Well*-Platte. Nach 13 Tagen wurden die Zellen geerntet, gepoolt, via MACS sortiert und anschließend gezählt (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Tabelle 4). Diese Werte wurden verwendet, um zu errechnen, wie viele sortierte Zellen von einem Herzohr durchschnittlich in Passage 1 ausgesät werden können.

Zusammen mit der Wachstumsrate (siehe oben) wurde errechnet, dass aus einem Herzohr $2,72 \times 10^9$ bis $3,42 \times 10^9$ sortierte Zellen in Passage 3 und in $2,57 \times 10^{10}$ bis $3,23 \times 10^{10}$ sortierte Zellen in Passage 4 gewonnen werden können. Angenommen man appliziert einmalig 100×10^6 Zellen, können ca. 286 Patienten mit den Zellen eines Herzohrs versorgt werden (vgl. Publikation Detert et al., 2018, Abbildung 6b).

4 Diskussion³

4.1 Ergebnisbewertung

4.1.1 Zellisolation und Charakterisierung

Die Zellisolation mittels Auswachskulturen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Bestimmung der Oberflächenmarker wurde sich am *CardAP*-Zellprofil orientiert. Die sortierten Herzohrzellen stimmen hinsichtlich der Expression der Marker CD29, CD44, CD45, CD73, CD105 und CD166 mit den *CardAP*-Zellen aus EMBs überein. Auch Zellen, die zuvor kryokonserviert und anschließend wieder kultiviert wurden, behielten dieses Markerprofil bei. Damit bleiben die Zellen auch nach Lagerung stabil. Der Mikroarray bestätigte die Durchflusszytometrieergebnisse ebenfalls.

Die CD90-Expression lag bei den sortierten Herzohrzellen bei durchschnittlich $17,69 \% \pm 5,09 \% \text{ SD}$ in Passage 4 und war somit nicht negativ, wie es für die *CardAP*-Zellen beschrieben wurde [40]. *CardAP*-Zellen sind jedoch nicht alleinig durch die fehlende Expression von CD90 definiert. Für die Verwendung zu Studienzwecken wurde ein CD90-Grenzwert von $< 40 \%$ festgelegt. Unter diesem befinden sich auch die Werte der sortierten Herzohrzellen. Eine zu hohe Expression von CD90 könnte sich auf das Regenerierungspotenzial der Zellen auswirken. In einer retrospektiven Analyse von Patienten, die CDCs erhalten haben, wurde untersucht, welche Rolle die Marker CD90 und c-kit für das Outcome von Herzinfarktpatienten haben. Eine hohe CD90-Expression war dabei mit weniger Narbenreduktion assoziiert. In einer prospektiven Studie an einem Herzinfarkt-Mausmodell war das *Outcome* ebenfalls besser, wenn die CD90-Expression niedrig war. Zudem stellt die Untersuchung infrage, ob c-kit-Positivität (ein möglicherweise Stammzell-definierender Marker) einen therapeutischen Nutzen hat [56]. Die Rolle von CD90 (auch Thy-1) ist noch nicht vollständig verstanden. Bisher weiß man, dass es sich dabei um ein Glykosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein der Zelloberfläche handelt und es in Prozesse wie Zelladhäsion und Zellkommunikation involviert ist [57]. Seine Funktion variiert je nach Zelltyp [58], in Fibroblasten reguliert es die Adhäsion der Zellen, die Organisation des Zytoskeletts und die Zellmigration [59]. Das Oberflächenmarkerprofil der *CardAP*- und sortierten Herzohrzellen ähnelt dem von kardialen Fibroblasten und MSCs, sodass man annehmen kann, dass CD90 hier ähnliche Funktionen erfüllt.

MSCs unterscheiden sich von *CardAP*- und sortierten Herzohrzellen dadurch, dass sie Progenitorzellen sind, die sich *in-vitro* in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten

³ Teile dieser Diskussion erschienen bereits in modifizierter Form und in englischer Sprache in: Detert, S., Stamm, C., Beez, C., Diedrichs, F., Ringe, J., Van Linthout, S., Seifert, M., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Haag, M., *The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018. **12**(3): S. e1404-e1417.

differenzieren können. Sie sind weiterhin definiert durch die Expression von CD105, CD73 und CD90 und die fehlende Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und *Human Leukocyte Antigen-DR-Oberflächenmoleküle* [60]. Gemein mit den *CardAP*- und sortierten Herzzellen haben sie die Eigenschaft, plastikadhärent zu wachsen. Zudem teilen sie einige Oberflächenmarker. *CardAP*-Zellen haben dagegen kein Differenzierungspotenzial [40, 61].

Kardiale Fibroblasten auf der anderen Seite sind weniger klar definiert. Es ist unklar, wie groß der Anteil an Fibroblasten im Herzen ist, vor allem, weil es bislang keine verlässlichen Marker für diesen Zelltyp gibt [1]. So wurden beispielsweise CD90-positive als auch CD90-negative kardiale Fibroblasten beschrieben [62, 63]. Der Fibroblast ist eine spindelförmige Zelle mesenchymalen Ursprungs, die keine Basalmembran besitzt und Extrazellulärmatrix, Wachstumsfaktoren und Proteasen sekretiert [64]. Kardiale Fibroblasten kommen in unterschiedlichen Herzkompartmenten vor und erfüllen diverse Aufgaben während der Herzentwicklung sowie im gesunden und geschädigten Herzen. Viele der gängigen Fibroblastenmarker sind entweder nicht spezifisch oder erfassen nur Subpopulationen von Fibroblasten, darunter *smooth muscle actin*, Vimentin, Kollagen, *discoidin domain-containing receptor 2*, *fibroblast-specific protein 1* und eben auch CD90, das auf Leukozyten, Endothelzellen und andere Zelltypen vorhanden ist [65].

Eine Unterscheidung zwischen MSCs und Fibroblasten ist ein theoretisches Konzept, an dem sich aufgrund phänotypischer Eigenschaften zweifeln lässt [66]. Es wird auch diskutiert, ob es sich bei beiden Zellen um denselben Zelltyp handelt [67]. Ob eine Zuordnung von *CardAP*- und sortierten Herzzellen zu Fibroblasten oder MSCs daher möglich und überhaupt sinnvoll ist, bleibt fraglich. Eine weitere Charakterisierung von aus dem Herzen isolierten Zellen sollte aber in jedem Fall angestrebt werden.

Der Mikroarray, beschränkt auf Angiogenese-Gene, zeigte, dass *CardAP*- und Herzzellen zwei unterschiedliche Gruppen bilden, die, nach Genen geclustert, sehr ähnlich zueinander sind. Im direkten Vergleich von *CardAP*-Zellen mit sortierten Herzzellen zeigte sich, dass unter den 27 Genen mit signifikant höheren Expressionswerten bei den Herzzellen *stromal cell-derived factor 1 alpha* (SDF-1 α) und *Wilm's tumor 1* (Wt1) waren.

SDF-1 α ist involviert in das Stammzellen-*Homing* und die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen (EPCs). Seine Expression ist nach Herzinfarkten hochreguliert. Es wird angenommen, dass SDF-1 α eine entscheidende Rolle in der Gefäßregeneration spielt [68, 69]. Wt1 zeigt ebenfalls eine hohe Expression nach Infarkten und ist an der Revaskularisierung beteiligt [70].

Ob diese erhöhte Expression über die *messenger* RNA-Ebene hinausgeht und ob dies praktische Relevanz hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen, eventuell auch mit Mikroarrays (oder Proteomik-Verfahren) von sortierten Herzzellen, die keine CD90-positiven Zellen aufweisen. Neben klassischen Herzzellmarkern wie Desmin, kardialem Myosin, Troponin T oder Connexin 43 sollten auch neuere Fibrozytenmarker wie die

Transkriptionsfaktoren Tbx20 und Gata4 [71] untersucht werden, um den Zelltyp der sortierten Herzohrzellen weiter zu definieren.

Bezogen auf die anfänglich aufgestellte Hypothese, *CardAP*-Zellen ließen sich aus Herzohrgewebe isolieren, lässt sich nach diesen Ergebnissen sagen, dass die isolierte Zellpopulation *CardAP*-Eigenschaften aufweist und der Studiendefinition der *CardAP*-Zellen entspricht. Eine weitere Charakterisierung – nach Optimierung des Zellsortierungsverfahrens – ist empfehlenswert.

4.1.2 Zusammenhang zwischen Geweberegion und Zellausbeute CD90-negativer Zellen

Für eine zellbasierte Therapie ist es wichtig, das Biomaterial Herzohr so zu verarbeiten, dass möglichst viele Zellen isoliert werden, die die *CardAP*-Kriterien erfüllen. Entsprechend den Observationen zur Zellausbeute CD90-negativer Zellen und der Geweberegion zeigte sich, dass die CD90-Expression umso höher ist, desto mehr Bindegewebe in der Region des Herzohrfragments vorhanden ist. Im Epikard war die CD90-Konzentration der isolierten Zellen am höchsten. Das könnte damit zusammenhängen, dass die einzelnen Fragmente, die aus diesen Regionen gewonnen wurden, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Bindegewebe statt Muskelgewebe enthielten und sich CD90-positive kardiale Fibroblasten dort vermehrt haben. Die immunhistochemische Färbung mit dem CD90-Antikörper bestätigte das Vorhandensein von CD90-positiven Zellen in den Bindegewebsarealen.

Es fehlt an Studien zur Verteilung von Myozyten und Nicht-Myozyten im humanen Herzen. In adulten Mausherzen ist das Verhältnis von Myozyten:Nicht-Myozyten ca. 55:45 %, bei adulten Ratten sind es ca. 30:70 % [72].

Nimmt man diese Ergebnisse mit den Vorexperimenten an EMBs zusammen, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass CD90-negative Herzohrzellen sich besser aus dem Myo- und Endomyokard isolieren lassen und dass Gewebe mit nur geringer Fibrosierung ein besseres Ausgangsmaterial zur Zellisolation darstellt. Makroskopisch ist es schwierig, den Fibrosierungsgrad eines Herzohres sicher auszumachen. Zudem liegt es in der Natur der *Bypass*-Patienten, dass sie in der Regel nicht jung und gesund sind, sodass – hält man an dem Herzohr als Ausgangsgewebe für die Zellisolation fest – der Fokus in Zukunft wahrscheinlich eher auf der Optimierung der Zellsortierung und eventuell des Auswachsmediums liegen sollte. Bisher wurde ein manuelles MACS-Verfahren zur Sortierung verwendet. In einem Vergleich mit dem AutoMACS-System schnitt das manuelle Verfahren besser ab. Jedoch war die Stichprobe zu klein, um definitive Aussagen über die jeweiligen Verfahren zu treffen. Zwar generierte das manuelle Verfahren weniger Zellverlust und reinere Zellpopulationen, das automatisierte Verfahren bietet jedoch einen zeitlichen und wirtschaftlichen Vorteil. Man könnte beispielsweise im Rahmen einer Nicht-Inferioritäts-Studie testen, ob man das AutoMACS-System unter bestimmten Voraussetzungen trotz der genannten Nachteile verwenden möchte.

Mit den durchgeführten Untersuchungen konnte schon bei einer kleinen Stichprobe gezeigt werden, dass der Erfolg der Zellisolation von der histologischen Region abhängt. Die Kombination von histologischen Eigenschaften und Durchflusszytometriemessungen untermauert somit Hypothese 2.

4.1.3 Theoretische Zellmengen für ein allogenes Zellprodukt

Nach den angefertigten Berechnungen lassen sich aus einem Herzohr $2,72 \times 10^9$ bis $3,42 \times 10^9$ sortierte Zellen in Passage 3 und $2,57 \times 10^{10}$ bis $3,23 \times 10^{10}$ sortierte Zellen in Passage 4 gewinnen. Eventuell ließen sich noch mehr Zellen generieren, wenn die Fragmente einzeln und nicht zu dritt in die *Wells* platziert würden. Bislang steht noch nicht fest, wie groß die ideale Zellzahl für die Applikation im Patienten ist. Dies hängt sicherlich vom Zelltyp, der Applikationsform und der Patientenpopulation ab und muss durch klinische Studien herausgefunden werden. Für eine klinische Phase I/II-Studie mit autologen *CardAP*-Zellen ist die Applikation von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/kgKG für die intravenöse Applikation und $26-113 \times 10^6$ Zellen für die intramyokardiale Applikation geplant. Diese Zahlen sind vergleichbar mit denen aus großen Patientenstudien, wie der *LATE TIME*-Studie, bei der autologe mononukleäre Zellen des Knochenmarks (BMMNC) verwendet wurden. Dabei wurden 80-90 mL Knochenmark aspiriert, aus denen letztendlich $150-200 \times 10^6$ Zellen geerntet werden konnten. Es wurde sich dafür entschieden, den Post-Infarkt-Patienten 150×10^6 Zellen zu applizieren [73]. In der *TOPCARE-DCM*-Studie wurden den Patienten jeweils $259 \pm 135 \times 10^6$ BMMNC appliziert [74], in der *CADUCEUS*-Studie waren es lediglich $12,5-25 \times 10^6$ Zellen [75].

In Hinblick auf die sortierten Herzohrzellen würde es sich anbieten, Passage-4-Zellen zu verwenden, da zwischen Passage 2 und 5 das Wachstum zwischen den Herzohrzellen der unterschiedlichen Donoren relativ gleichmäßig war und sie in dieser Passage die geforderten Zelleigenschaften aufweisen, pro-angiogene Faktoren sekretieren und eine große Zellausbeute versprechen. Nach den Berechnungen könnten 286 Patienten mit Passage-4-Zellen (gegenüber 30 Patienten bei Verwendung von Passage-3-Zellen) versorgt werden. Vergleichbare Zahlen zeigten schon Vorversuche, ebenfalls mit Herzohrzellen [47]. Demnach lässt sich Hypothese 3 bestätigen: Aus dem Herzohr isolierte Zellen können leicht expandiert werden und stellen ausreichende Mengen für einen allogenen Therapieversuch bereit.

4.1.4 Pro-angiogene Eigenschaften sortierter Herzohrzellen

Eines der wichtigsten Kriterien für eine erfolgreiche Zelltherapie ist die Wirkung über parakrine Mechanismen. Mit dem ELISA wurde gezeigt, dass sortierte Herzohrzellen die pro-angiogenen Faktoren VEGF und IL-8 sekretieren. VEGF induziert Angiogenese und fördert die Neovaskularisation [76]. Beide Faktoren wurden als Induktoren für die

Stammzellmobilisierung beschrieben [77, 78]. In welchen Mengen diese Faktoren sekretiert werden müssen, um regenerativ zu wirken, ist in der Literatur nicht beschrieben.

Hinsichtlich der IL-8-Sekretion gleichen die sortierten Herzohrzellen mit durchschnittlichen Werten von $94,35 \pm 55,57$ SD ng/ 10^5 Zellen in Passage 4 denen von *CardAP*-Zellen in Passage 5 mit $98,62 \pm 29,75$ SD ng/ 10^5 Zellen [42]. Die durchschnittlichen VEGF-Sekretionswerte der sortierten Herzohrzellen sind mit $188,47 \pm 135,17$ SD pg/ 10^5 Zellen in Passage 5 dagegen dreimal niedriger verglichen mit $641,24 \pm 347,62$ SD pg/ 10^5 Zellen bei *CardAP*-Zellen in Passage 6 [42]. Hierbei ist zum einen zu beachten, dass auf Grundlage der Daten nur Zellen aus unterschiedlichen Passagen miteinander verglichen werden konnten, zum anderen kommt es darauf an, die Wirkung über *Potency*-Assays nachzuweisen. Nur so lässt sich eruieren, ob eine niedrige Sekretion von VEGF tatsächlich einen Einfluss auf die Prozesse Angiogenese und Neovaskularisation hat.

Zum Vergleich: in einer Studie mit EPCs wurden IL-8-Werte von $33,3 \pm 5,8$ SEM ng/ 10^5 Zellen und VEGF von $53 \pm 10,3$ SEM pg/ 10^5 Zellen gemessen. Die Applikation der Zellen führte zur Neovaskulogenese in einem *in-vivo*-Mausmodell [79]. In einer anderen Studie wurden BM-MSCs mit 200 pg/mL VEGF (~2 ng VEGF/kgKG) angereichert. Nach Applikation dieses Zellproduktes kam es zur kardialen Reparatur in einem Herzinsuffizienz-Hamstermodell [80]. Die sortierten Herzohrzellen zeigten bereits in einem *in-vitro*-Matrigel-basierten *Tube-Formation*-Assay ihre pro-angiogene Wirkung [61].

Auch der Mikroarray zeigte, dass *CardAP*- und sortierte Herzohrzellen jeweils 60 von 84 typischen Angiogenese-Genen exprimieren, darunter FLT1, das für den VEGF-Rezeptor kodiert, welcher wiederum an der Endothelzellproliferation und Angiogenese beteiligt ist [81]. Zudem sind die sortierten Herzohrzellen positiv für HGF, ein Wachstumsfaktor, der nach Herzinfarkten hochreguliert ist [82]. Es wird angenommen, dass seine Applikation die Infarktgröße reduzieren und kardiale Stammzellen anlocken kann [83]. Ob die Expression auf RNA-Ebene tatsächlich auch auf der Protein-Ebene stattfindet, wurde mit dieser Untersuchung nicht geklärt. Zudem gab es innerhalb der 60 untersuchten Gene Unterschiede.

Ob und wie sich diese Unterschiede und die Expressionsbefunde auf die Angiogenese auswirken, muss anhand von *Potency*-Assays gezeigt werden. Erste vielversprechende Ergebnisse *in-vitro* konnten sowohl für *CardAP*-Zellen [41, 42] als auch für sortierte Herzohrzellen [61] gezeigt werden, sodass Hypothese 4 untermauert werden kann: sortierte Herzohrzellen haben pro-angiogene Eigenschaften.

4.2 Limitationen

4.2.1 Methoden

4.2.1.1 Auswachskultur

Auswachskulturen gehören neben dem enzymatischen Verdau und der Dichtegradientenzentrifugation zu den Standardmethoden der Zellisolation aus Gewebe und wurden bereits für EMB-CardAP-Zellen etabliert [40]. Als Bestandteil des Kulturmediums kommt derzeit noch humanes Serum zum Einsatz, das im Labor aus Vollblutkonserven gewonnen wird. Für die spätere Herstellung eines *Good Manufacturing Practice* (GMP)-konformen *Off-the-Shelf*-Produktes böte es sich an, das Serum aus Eigenherstellung durch ein bereits GMP-zertifiziertes Industrieprodukt zu ersetzen. Als Alternative kommt beispielsweise humanes Plättchenlysat in Frage, das bereits an sortierten Herzohrzellen getestet wurde [84].

4.2.1.2 MACS-Zellsortierung

In vorherigen Versuchen wurde bereits das Sortierungsprotokoll des MACS verbessert [85]. Dieser Optimierungsprozess muss weiter fortgesetzt werden, um am Ende eine CD90-negative Zellpopulation zu erhalten. Zudem wird es für die GMP-konforme Herstellung von Zellprodukten wichtig sein, ein Sortierungsverfahren zu verwenden, das für die Herstellung von *Advanced Therapy Medicinal Products* (ATMPs) zugelassen ist. ATMPs sind solche Medizinprodukte, die auf Methoden der somatischen Zelltherapie, Gentherapie oder *Tissue Engineering* beruhen. Hier könnte das CliniMACS-System eine Alternative zum manuellen MACS-System in puncto Geschwindigkeit und zum AutoMACS-System in puncto GMP-Konformität darstellen. Ein Sicherheitsaspekt, der bei der Verwendung von magnetischen *Microbeads* bleiben wird, ist die Exposition der Zellen gegenüber murinen IgG-Antikörpern [86]. Eine andere Möglichkeit der Zellsortierung wäre die Durchflusszytometrie, die jedoch in vergangenen Versuchen keine erfolgsversprechenden Ergebnisse gezeigt hat [85].

4.2.1.3 Zellfärbung

Als Positivkontrolle für die Zellfärbung wurden NHDFs verwendet, die CD90-positiv sind. Eine bessere Vergleichszellpopulation wäre eine CD90-positive Subpopulation kardialer Fibroblasten.

4.2.1.4 Mikroarray

Der Mikroarray zeigt, welche Gene auf RNA-Ebene gerade zum Zeitpunkt der Messung in den betrachteten Zellen exprimiert wurden. Im vorliegenden Fall wurden jeweils 3 Donoren pro Zelltyp betrachtet. Da die sortierten Herzohrzellen nicht CD90-negativ waren, sollte der Versuch nach Optimierung der Zellsortierung wiederholt werden. Zudem sollte die biologische Relevanz der Ergebnisse mittels quantitativer PCR oder Proteomik-Verfahren validiert werden. Die hier durchgeführten Untersuchungen dienen lediglich als Übersicht und sind nicht mit komplexen statistischen und bioinformatischen Analysen gleichzusetzen.

4.2.1.5 Gewebefärbungen und Durchflusszytometrie

Für die Suche nach der optimalen Region zur Zellisolation wurden nicht-sortierte Zellen von drei Donoren untersucht und mit histologischen Gewebeschnitten in Relation gesetzt. Größere Fallzahlen sind notwendig, um die daraus entwickelte Hypothese zu untermauern. Zudem kann die Vermessung des Muskel- und Bindegewebsareals mittels graphischer Software nur eine Annäherung an den tatsächlichen Wert sein. Da für jeden Schnitt die gleiche Vorgehensweise gewählt wurde, sollten die Relationen zwischen den Werten der einzelnen Schnitte aber vergleichbar sein.

4.2.1.6 Enzym-Immunoassay

Die Ergebnisse des ELISA als *in-vitro*-Messungen stützen die Hypothese, dass sortierte Herzohrzellen die Angiogenese fördern. Im nächsten Schritt müssen diese Ergebnisse *in-vivo* bestätigt werden.

4.2.1.7 Berechnung theoretischer Zellzahlen

Die Berechnung der theoretisch verwendbaren Zellmengen für eine spätere allogene Therapie beruht auf Messdaten weniger Donoren. Erste Zellbankversuche werden diese Daten untermauern müssen.

4.2.2 Ergebnisse

Die vorliegenden Ergebnisse sind als Grundlagenforschung zu sortierten Herzohrzellen zu verstehen. Hierbei sollte vorklinisch und *in-vitro* herausgefunden werden, welche Eigenschaften diese Zellen besitzen und ob sie über ein pro-angiogenes Potenzial verfügen. Direkte Schlussfolgerungen auf den späteren Einsatz im Patienten lassen sich daraus noch nicht ziehen.

Die Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen von Herzohren 10 verschiedener Donoren, wenn man die Vorexperimente ausnimmt. Die geringe Fallzahl legt eine Überprüfung der Ergebnisse nahe, jedoch wurde pro Donor ein Vielfaches von Herzohrfragmenten für die Zellisolation verwendet. Das heißt, dass die Unterschiede zwischen den Donoren, die letztendlich feingewebliche Unterschiede waren (bspw. verschiedene Anteile von Myozyten, Fibroblasten und Adipozyten in jedem Fragment), sich auch trotz kleiner Fallzahl in den Ergebnissen widerspiegelt haben. Die Ergebnisse der Zellcharakterisierung und die Erfassung der Wachstumseigenschaften sowie die Messung pro-angiogener Faktoren lassen sich daher mit großer Wahrscheinlichkeit auf sortierte Herzohrzellen allgemein anwenden. Für zukünftige Untersuchungen hinsichtlich der Immunogenität der sortierten Herzohrzellen wird es dagegen nicht auf eine große Zahl von Herzohrfragmenten ankommen, sondern auf Untersuchungen an möglichst vielen Donoren, da immunologische Eigenschaften intrageweblich weitestgehend gleich sind, sie sich jedoch zwischen jedem Individuum unterscheiden können.

Diese Arbeit versteht sich als explorative Grundlagenforschung. Die Ergebnisse, insbesondere die der statistischen Tests, lassen sich zuvorderst auf die untersuchten Proben anwenden. Für allgemeingültige Aussagen sollte für die Planung der zukünftigen Versuche unbedingt eine Fallzahlberechnung angestrebt werden.

4.3 Schlussfolgerung

Herzohrzellen für regenerative Therapien lassen sich leicht aus Herzohrgewebe isolieren. Das Ausgangsgewebe generiert Zellmengen, die für eine spätere Verwendung als allogenes Zellprodukt ausreichend sind. Die optimale Entnahmeregion von Herzohrfragmenten stellen das Myo- und Endomyokard dar. Bindegewebsreiche, fibrosierte Herzohren sowie das Epikard sind eher ungeeignet für die Zellisolation. Sortierte Herzohrzellen haben ähnliche Eigenschaften wie *CardAP*-Zellen aus EMBs. Sie weisen das gleiche Expressionsmuster hinsichtlich der Oberflächenmarker CD29 (positiv), CD44 (positiv), CD45 (negativ), CD73 (positiv), CD105 (positiv) und CD166 (positiv) auf, wobei die Zellpopulation der sortierten Herzohrzellen noch eine Fraktion CD90-positiver Zellen enthält, was zukünftig eine optimierte Zellsortierung erforderlich macht. Zudem sekretieren sie die pro-angiogenen Faktoren VEGF und IL-8, jedoch in geringerem Ausmaß. *In-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen werden zeigen, ob sich dies auf die Gefäß- und Geweberegeneration auswirkt. Auf RNA-Ebene exprimieren sortierte Herzohrzellen – wie auch *CardAP*-Zellen – einen Großteil der Schlüsselgene der Angiogenese, wenn auch mit Unterschieden zwischen den beiden Zelltypen.

4.4 Ausblick und weitere Forschung

Die ersten Untersuchungen sind vielversprechend; für die Verwendung der sortierten Herzohrzellen als regenerative, zell-basierte Therapie müssen jedoch zahlreiche Voraussetzungen erfüllt sein. In einem nächsten Schritt sollten die Ergebnisse von *in-vitro-Potency*-Assays mittels krankheitsbezogener Tiermodelle *in-vivo* überprüft werden, zunächst als *Proof-of-Concept* an kleinen Tieren wie Nagern, anschließend an großen Säugetieren wie z.B. Schweinen. Die letzte Phase stellt die klinische Studie mit ihrem mehrphasigen Modell dar.

Zellen zur kardialen Regeneration sind als ATMPs zu klassifizieren. Für den späteren Einsatz der Zellen in Patienten ist es wichtig, sich an der EMA-Richtlinie für diese Produkte zu orientieren [87]. Diese beinhaltet eine Risikoanalyse, bei der u.a. zu klären ist, ob die Zellen proliferieren und/oder sich differenzieren, ob sie eine Immunreaktion hervorrufen und wie sie appliziert werden. Der Herstellungsprozess muss GMP-konform sein. Im Fall der sortierten Herzohrzellen, die per Zellkultur vermehrt werden, muss ein Zellbanksystem etabliert werden. Bei allogenen Zellen müssen Immunreaktionen und mögliche übertragbare Krankheiten in Betracht gezogen werden. Eine bakterielle Kontamination muss durch ein mikrobielles Screening ausgeschlossen werden. Die Risikoanalyse schließt auch alle verwendeten Materialien und Zusatzstoffe wie Faktoren und Seren mit ein.

Neben diesen Schritten zur Entwicklung eines Zellprodukts sollten weitere Experimente durchgeführt werden, die die Optimierung der Isolation und Sortierung der Herzohrzellen zum Ziel haben. Anschließend sollte die Charakterisierung und Einordnung des Zelltyps weiter fortgesetzt werden, denn, ob die isolierten und sortierten Herzohrzellen einen eigenständigen Zelltyp darstellen, konnte mit diesen Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. Beispielsweise könnten weitere Oberflächenmarker untersucht werden und neue Mikroarrays sowie quantitative PCRs von Markergenen durchgeführt werden. Weiterhin ist die Entwicklung im Feld der zell-basierten Therapien im Auge zu behalten. Bereits jetzt wird an Zell-Zell- und Zell-Faktorenkombinationen sowie zellfreien Produkte aus extrazellulären Vesikeln experimentiert, auch im Rahmen des *CardAP*-Zell-Projekts. Und gerade die Ergebnisse dieser Untersuchungen können wichtige Informationen für die allogene Therapie mit sortierten Herzohrzellen bereitstellen.

5 Literaturverzeichnis

1. Zhou, P. und Pu, W.T., *Recounting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): S. 368-70.
2. Leri, A., Kajstura, J., und Anversa, P., *Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology*. Circ Res, 2011. **109**(8): S. 941-61.
3. Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A.P., Finato, N., Beltrami, C.A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., und Anversa, P., *Chimerism of the Transplanted Heart*. New England Journal of Medicine, 2002. **346**(1): S. 5-15.
4. Beltrami, A.P., 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., und Anversa, P., *Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): S. 763-776.
5. Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovinge, S., und Frisén, J., *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans*. Science (New York, N.Y.), 2009. **324**(5923): S. 98-102.
6. Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W., LeCapitaine, N., Cascapera, S., Beltrami, A.P., Alessandro, D.A., Zias, E., Quaini, F., Urbanek, K., Michler, R.E., Bolli, R., Kajstura, J., Leri, A., und Anversa, P., *Human cardiac stem cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(35): S. 14068.
7. Urbanek, K., Torella, D., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, C.A., Bussani, R., Beltrami, A.P., Quaini, F., Bolli, R., Leri, A., Kajstura, J., und Anversa, P., *Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): S. 8692-7.
8. Itzhaki-Alfia, A., Leor, J., Raanani, E., Sternik, L., Spiegelstein, D., Netser, S., Holbova, R., Pevsner-Fischer, M., Lavee, J., und Barbash, I.M., *Patient characteristics and cell source determine the number of isolated human cardiac progenitor cells*. Circulation, 2009. **120**(25): S. 2559-66.
9. Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J.D., Williams, D.A., und Field, L.J., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004. **428**(6983): S. 664-8.
10. Balsam, L.B., Wagers, A.J., Christensen, J.L., Kofidis, T., Weissman, I.L., und Robbins, R.C., *Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium*. Nature, 2004. **428**(6983): S. 668-73.

11. Nygren, J.M., Jovinge, S., Breitbach, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B.K., und Jacobsen, S.E., *Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation*. *Nat Med*, 2004. **10**(5): S. 494-501.
12. Drazen, J.M., *Expression of Concern: Beltrami AP et al. Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. N Engl J Med 2001;344:1750-7 and Quaini F et al. Chimerism of the Transplanted Heart. N Engl J Med 2002;346:5-15*. *New England Journal of Medicine*, 2018. **379**(19): S. 1870-1870.
13. *Notice of Retraction*. *Circulation*, 2014. **129**(16): S. e466-e466.
14. The Lancet, E., *Expression of concern: the SCIPIO trial*. *The Lancet*, 2014. **383**(9925): S. 1279.
15. Benjamin, E.J., Virani, S.S., Callaway, C.W., Chamberlain, A.M., Chang, A.R., Cheng, S., Chiuve, S.E., Cushman, M., Delling, F.N., Deo, R., de Ferranti, S.D., Ferguson, J.F., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C.R., Jimenez, M.C., Jordan, L.C., Judd, S.E., Lackland, D., Lichtman, J.H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C.T., Lutsey, P.L., Mackey, J.S., Matchar, D.B., Matsushita, K., Mussolino, M.E., Nasir, K., O'Flaherty, M., Palaniappan, L.P., Pandey, A., Pandey, D.K., Reeves, M.J., Ritchey, M.D., Rodriguez, C.J., Roth, G.A., Rosamond, W.D., Sampson, U.K.A., Satou, G.M., Shah, S.H., Spartano, N.L., Tirschwell, D.L., Tsao, C.W., Voeks, J.H., Willey, J.Z., Wilkins, J.T., Wu, J.H., Alger, H.M., Wong, S.S., Muntner, P., American Heart Association Council on, E., Prevention Statistics, C., und Stroke Statistics, S., *Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association*. *Circulation*, 2018. **137**(12): S. e67-e492.
16. Deutsche Herzstiftung e.V., *Deutscher Herzbericht 2017*. 2017: Frankfurt am Main.
17. Task Force, M., Montalescot, G., Sechtem, U., Achenbach, S., Andreotti, F., Arden, C., Budaj, A., Bugiardini, R., Crea, F., Cuisset, T., Di Mario, C., Ferreira, J.R., Gersh, B.J., Gitt, A.K., Hulot, J.-S., Marx, N., Opie, L.H., Pfisterer, M., Prescott, E., Ruschitzka, F., Sabaté, M., Senior, R., Taggart, D.P., van der Wall, E.E., Vrints, C.J.M., Guidelines, E.S.C.C.f.P., Zamorano, J.L., Achenbach, S., Baumgartner, H., Bax, J.J., Bueno, H., Dean, V., Deaton, C., Erol, C., Fagard, R., Ferrari, R., Hasdai, D., Hoes, A.W., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., Lancellotti, P., Linhart, A., Nihoyannopoulos, P., Piepoli, M.F., Ponikowski, P., Sirnes, P.A., Tamargo, J.L., Tendra, M., Torbicki, A., Wijns, W., Windecker, S., Document, R., Knuuti, J., Valgimigli, M., Bueno, H., Claeys, M.J., Donner-Banzhoff, N., Erol, C., Frank, H., Funck-Brentano, C., Gaemperli, O., Gonzalez-Juanatey, J.R., Hämäläinen, M., Hasdai, D., Husted, S., James, S.K., Kervinen, K., Kolh, P., Kristensen, S.D., Lancellotti, P., Maggioni, A.P., Piepoli, M.F., Pries, A.R., Romeo, F., Rydén, L., Simoons-Schot, M.L., Sirnes, P.A., Steg, P.G., Timmis, A., Wijns, W., Windecker, S., Yildirir, A., und Zamorano, J.L., *2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease**The Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology*. *European Heart Journal*, 2013. **34**(38): S. 2949-3003.

18. Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., Thygesen, K., Alpert, J.S., White, H.D., Jaffe, A.S., Katus, H.A., Apple, F.S., Lindahl, B., Morrow, D.A., Chaitman, B.R., Clemmensen, P.M., Johanson, P., Hod, H., Underwood, R., Bax, J.J., Bonow, R.O., Pinto, F., Gibbons, R.J., Fox, K.A., Atar, D., Newby, L.K., Galvani, M., Hamm, C.W., Uretsky, B.F., Steg, P.G., Wijns, W., Bassand, J.-P., Menasche, P., Ravkilde, J., Ohman, E.M., Antman, E.M., Wallentin, L.C., Armstrong, P.W., Simoons, M.L., Januzzi, J.L., Nieminen, M.S., Gheorghiade, M., Filippatos, G., Luepker, R.V., Fortmann, S.P., Rosamond, W.D., Levy, D., Wood, D., Smith, S.C., Hu, D., Lopez-Sendon, J.-L., Robertson, R.M., Weaver, D., Tendera, M., Bove, A.A., Parkhomenko, A.N., Vasilieva, E.J., und Mendis, S., *Third Universal Definition of Myocardial Infarction*. Journal of the American College of Cardiology, 2012. **60**(16): S. 1581-1598.
19. Ibanez, B., James, S., Agewall, S., Antunes, M.J., Bucciarelli-Ducci, C., Bueno, H., Caforio, A.L.P., Crea, F., Goudevenos, J.A., Halvorsen, S., Hindricks, G., Kastrati, A., Lenzen, M.J., Prescott, E., Roffi, M., Valgimigli, M., Varenhorst, C., Vranckx, P., Widimský, P., und Group, E.S.C.S.D., *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation*The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). European Heart Journal, 2018. **39**(2): S. 119-177.
20. Ziaeian, B. und Fonarow, G.C., *Epidemiology and aetiology of heart failure*. Nature Reviews Cardiology, 2016. **13**: S. 368.
21. Zugck, C., Müller, A., Helms, T.M., Wildau, H.J., Becks, T., Hacker, J., Haag, S., Goldhagen, K., und Schwab, J.O., *Gesundheitsökonomische Bedeutung der Herzinsuffizienz: Analyse bundesweiter Daten*. Dtsch med Wochenschr, 2010. **135**(13): S. 633-638.
22. Ponikowski, P., Voors, A.A., Anker, S.D., Bueno, H., Cleland, J.G.F., Coats, A.J.S., Falk, V., González-Juanatey, J.R., Harjola, V.-P., Jankowska, E.A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J.T., Pieske, B., Riley, J.P., Rosano, G.M.C., Ruilope, L.M., Ruschitzka, F., Rutten, F.H., van der Meer, P., und Group, E.S.C.S.D., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure*The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. European Heart Journal, 2016. **37**(27): S. 2129-2200.
23. Lip, G.Y.H., Gibbs, C.R., und Beevers, D.G., *Aetiology*. BMJ, 2000. **320**(7227): S. 104-107.
24. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). *Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische Herzinsuffizienz – Langfassung*. 2017 [Zugriff 2018 8. August]; 2. Auflage. Version 3:[]
25. Laflamme, M.A. und Murry, C.E., *Regenerating the heart*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(7): S. 845-56.

26. Marelli, D., Desrosiers, C., el-Alfy, M., Kao, R.L., und Chiu, R.C., *Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach*. Cell Transplant, 1992. **1**(6): S. 383-90.
27. Chiu, R.C., Zibaitis, A., und Kao, R.L., *Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(1): S. 12-8.
28. Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H., und Field, L.J., *Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart*. J Clin Invest, 1993. **92**(3): S. 1548-54.
29. Chen, S.L., Fang, W.W., Qian, J., Ye, F., Liu, Y.H., Shan, S.J., Zhang, J.J., Lin, S., Liao, L.M., und Zhao, R.C., *Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction*. Chin Med J (Engl), 2004. **117**(10): S. 1443-8.
30. Hare, J.M., DiFede, D.L., Rieger, A.C., Florea, V., Landin, A.M., El-Khorazaty, J., Khan, A., Mushtaq, M., Lowery, M.H., Byrnes, J.J., Hendel, R.C., Cohen, M.G., Alfonso, C.E., Valasaki, K., Pujol, M.V., Golpanian, S., Ghersin, E., Fishman, J.E., Pattany, P., Gomes, S.A., Delgado, C., Miki, R., Abuzeid, F., Vidro-Casiano, M., Premer, C., Medina, A., Porras, V., Hatzistergos, K.E., Anderson, E., Mendizabal, A., Mitrani, R., und Heldman, A.W., *Randomized Comparison of Allogeneic Versus Autologous Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Dilated Cardiomyopathy: POSEIDON-DCM Trial*. J Am Coll Cardiol, 2017. **69**(5): S. 526-537.
31. Hare, J.M., Fishman, J.E., Gerstenblith, G., DiFede Velazquez, D.L., Zambrano, J.P., Suncion, V.Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P.V., Brinker, J.A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schulman, I.H., Byrnes, J., Mendizabal, A.M., Lowery, M.H., Rouy, D., Altman, P., Wong Po Foo, C., Ruiz, P., Amador, A., Da Silva, J., McNiece, I.K., Heldman, A.W., George, R., und Lardo, A., *Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial*. Jama, 2012. **308**(22): S. 2369-79.
32. Mathiasen, A.B., Qayyum, A.A., Jorgensen, E., Helqvist, S., Fischer-Nielsen, A., Kofoed, K.F., Haack-Sorensen, M., Ekblond, A., und Kastrup, J., *Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial)*. Eur Heart J, 2015. **36**(27): S. 1744-53.
33. Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., und Kessler, P.D., *Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart*. Circulation, 2002. **105**(1): S. 93-8.
34. Tang, X.L., Li, Q., Rokosh, G., Sanganalmath, S.K., Chen, N., Ou, Q., Stowers, H., Hunt, G., und Bolli, R., *Long-Term Outcome of Administration of c-kit(POS) Cardiac Progenitor Cells After Acute Myocardial Infarction: Transplanted Cells Do not Become Cardiomyocytes, but Structural and Functional Improvement and Proliferation of Endogenous Cells Persist for at Least One Year*. Circ Res, 2016. **118**(7): S. 1091-105.

35. Fuchs, S., Baffour, R., Zhou, Y.F., Shou, M., Pierre, A., Tio, F.O., Weissman, N.J., Leon, M.B., Epstein, S.E., und Kornowski, R., *Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(6): S. 1726-32.
36. Gneccchi, M., Zhang, Z., Ni, A., und Dzau, V.J., *Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy*. Circ Res, 2008. **103**(11): S. 1204-19.
37. Braunwald, E., *Cell-Based Therapy in Cardiac Regeneration: An Overview*. Circ Res, 2018. **123**(2): S. 132-137.
38. Fernández-Avilés, F., Sanz-Ruiz, R., Climent, A.M., Badimon, L., Bolli, R., Charron, D., Fuster, V., Janssens, S., Kastrup, J., Kim, H.-S., Lüscher, T.F., Martin, J.F., Menasché, P., Simari, R.D., Stone, G.W., Terzic, A., Willerson, J.T., Wu, J.C., the, T.W.G., Authors/Task Force Members, C., Basic Research, S., Translational Research, S., Challenges of Cardiovascular Regenerative Medicine, S., Tissue Engineering, S., Delivery, N.T., Assessment, S., Clinical Trials, S., Regulatory, und funding strategies, s., *Global position paper on cardiovascular regenerative medicine*. European Heart Journal, 2017. **38**(33): S. 2532-2546.
39. Gyongyosi, M., Haller, P.M., Blake, D.J., und Martin Rendon, E., *Meta-Analysis of Cell Therapy Studies in Heart Failure and Acute Myocardial Infarction*. Circ Res, 2018. **123**(2): S. 301-308.
40. Haag, M., Van Linthout, S., Schroder, S.E., Freymann, U., Ringe, J., Tschöpe, C., und Sittlinger, M., *Endomyocardial biopsy derived adherent proliferating cells - a potential cell source for cardiac tissue engineering*. J Cell Biochem, 2010. **109**(3): S. 564-75.
41. Dehne, T., Adam, X., Materne, E.M., Reimann, M.C., Krüger, J.P., Van Linthout, S., Tschöpe, C., Haag, M., Sittlinger, M., und Ringe, J., *A P19 and P19CL6 cell-based complementary approach to determine paracrine effects in cardiac tissue engineering*. Cells Tissues Organs, 2014. **199**(1): S. 24-36.
42. Haag, M., Ritterhoff, J., Dimura, A., Miteva, K., Van Linthout, S., Tschöpe, C., Ringe, J., und Sittlinger, M., *Pro-Angiogenic Effect of Endomyocardial Biopsy-Derived Cells for Cardiac Regeneration*. Current Tissue Engineering, 2013. **2**(2): S. 154-159.
43. Miteva, K., Van Linthout, S., Pappritz, K., Müller, I., Spillmann, F., Haag, M., Stachelscheid, H., Ringe, J., Sittlinger, M., und Tschöpe, C., *Human Endomyocardial Biopsy Specimen-Derived Stromal Cells Modulate Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling*. Stem Cells Transl Med, 2016.
44. Haag, M., Stolk, M., Ringe, J., Linthout, S.V., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Seifert, M., *Immune attributes of cardiac-derived adherent proliferating (CAP) cells in cardiac therapy*. J Tissue Eng Regen Med, 2013. **7**(5): S. 362-70.
45. Miteva, K., Haag, M., Peng, J., Savvatis, K., Becher, P.M., Seifert, M., Warstat, K., Westermann, D., Ringe, J., Sittlinger, M., Schultheiss, H.P., Tschöpe, C., und Van

- Linthout, S., *Human cardiac-derived adherent proliferating cells reduce murine acute Coxsackievirus B3-induced myocarditis*. PLoS One, 2011. **6**(12): S. e28513.
46. Bolli, R., Chugh, A.R., D'Amario, D., Loughran, J.H., Stoddard, M.F., Ikram, S., Beache, G.M., Wagner, S.G., Leri, A., Hosoda, T., Sanada, F., Elmore, J.B., Goichberg, P., Cappetta, D., Solankhi, N.K., Fahsah, I., Rokosh, D.G., Slaughter, M.S., Kajstura, J., und Anversa, P., *Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial*. Lancet, 2011. **378**(9806): S. 1847-57.
 47. Kavraz, A. (2015), 'Untersuchungen zur Isolierung und Kultivierung CD90 negativer Zellen aus humanem Herzohr für die allogene Zelltherapie zur Behandlung von Kardiomyopathien', Bachelorarbeit (Beuth Hochschule für Technik).
 48. Preibisch, S., Saalfeld, S., und Tomancak, P., *Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions*. Bioinformatics, 2009. **25**(11): S. 1463-1465.
 49. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., und Cardona, A., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): S. 676-82.
 50. Jensen, E.C., *Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ*. The Anatomical Record, 2013. **296**(3): S. 378-381.
 51. van Beem, R.T., Noort, W.A., Voermans, C., Kleijer, M., ten Brinke, A., van Ham, S.M., van der Schoot, C.E., und Zwaginga, J.J., *The presence of activated CD4(+) T cells is essential for the formation of colony-forming unit-endothelial cells by CD14(+) cells*. J Immunol, 2008. **180**(7): S. 5141-8.
 52. Wang, R., Chadalavada, K., Wilshire, J., Kowalik, U., Hovinga, K.E., Geber, A., Fligelman, B., Leversha, M., Brennan, C., und Tabar, V., *Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium*. Nature, 2010. **468**(7325): S. 829-33.
 53. Huang da, W., Sherman, B.T., und Lempicki, R.A., *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): S. 44-57.
 54. Sturn, A., Quackenbush, J., und Trajanoski, Z., *Genesis: cluster analysis of microarray data*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): S. 207-8.
 55. Noguchi, K., Gel, Y.R., Brunner, E., und Konietzschke, F., *nparLD: AnRSoftware Package for the Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments*. Journal of Statistical Software, 2012. **50**(12).
 56. Cheng, K., Ibrahim, A., Hensley, M.T., Shen, D., Sun, B., Middleton, R., Liu, W., Smith, R.R., und Marban, E., *Relative roles of CD90 and c-kit to the regenerative efficacy of cardiosphere-derived cells in humans and in a mouse model of myocardial infarction*. J Am Heart Assoc, 2014. **3**(5): S. e001260.

57. Rege, T.A. und Hagood, J.S., *Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis*. The FASEB Journal, 2006. **20**(8): S. 1045-1054.
58. Bradley, J.E., Ramirez, G., und Hagood, J.S., *Roles and regulation of Thy-1, a context-dependent modulator of cell phenotype*. BioFactors, 2009. **35**(3): S. 258-265.
59. Barker, T.H., Grenett, H.E., MacEwen, M.W., Tilden, S.G., Fuller, G.M., Settleman, J., Woods, A., Murphy-Ullrich, J., und Hagood, J.S., *Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity*. Experimental Cell Research, 2004. **295**(2): S. 488-496.
60. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., und Horwitz, E., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): S. 315-7.
61. Detert, S., Stamm, C., Beez, C., Diedrichs, F., Ringe, J., Van Linthout, S., Seifert, M., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Haag, M., *The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(3): S. e1404-e1417.
62. Pinto, A.R., Ilinykh, A., Ivey, M.J., Kuwabara, J.T., D'Antoni, M.L., Debuque, R., Chandran, A., Wang, L., Arora, K., Rosenthal, N.A., und Tallquist, M.D., *Revisiting Cardiac Cellular Composition*. Circ Res, 2016. **118**(3): S. 400-9.
63. Lajiness, J.D. und Conway, S.J., *Origin, development, and differentiation of cardiac fibroblasts*. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2014. **70**: S. 2-8.
64. Souders, C.A., Bowers, S.L., und Baudino, T.A., *Cardiac fibroblast: the renaissance cell*. Circ Res, 2009. **105**(12): S. 1164-76.
65. Krenning, G., Zeisberg, E.M., und Kalluri, R., *The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis*. Journal of Cellular Physiology, 2010. **225**(3): S. 631-637.
66. Denu, R.A., Nemcek, S., Bloom, D.D., Goodrich, A.D., Kim, J., Mosher, D.F., und Hematti, P., *Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable*. Acta Haematol, 2016. **136**(2): S. 85-97.
67. Soundararajan, M. und Kannan, S., *Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin?* J Cell Physiol, 2018. **233**(12): S. 9099-9109.
68. Yamaguchi, J., Kusano, K.F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D.W., Isner, J.M., und Asahara, T., *Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization*. Circulation, 2003. **107**(9): S. 1322-8.

69. Askari, A.T., Unzek, S., Popovic, Z.B., Goldman, C.K., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, S.G., Thomas, J.D., DiCorleto, P.E., Topol, E.J., und Penn, M.S., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet, 2003. **362**(9385): S. 697-703.
70. Zangi, L., Lui, K.O., von Gise, A., Ma, Q., Ebina, W., Ptaszek, L.M., Spater, D., Xu, H., Tabebordbar, M., Gorbатов, R., Sena, B., Nahrendorf, M., Briscoe, D.M., Li, R.A., Wagers, A.J., Rossi, D.J., Pu, W.T., und Chien, K.R., *Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(10): S. 898-907.
71. Furtado, M.B., Nim, H.T., Boyd, S.E., und Rosenthal, N.A., *View from the heart: cardiac fibroblasts in development, scarring and regeneration*. Development, 2016. **143**(3): S. 387-397.
72. Banerjee, I., Fuseler, J.W., Price, R.L., Borg, T.K., und Baudino, T.A., *Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(3): S. H1883-91.
73. Traverse, J.H., Henry, T.D., Vaughan, D.E., Ellis, S.G., Pepine, C.J., Willerson, J.T., Zhao, D.X.M., Simpson, L.M., Penn, M.S., Byrne, B.J., Perin, E.C., Gee, A.P., Hatzopoulos, A.K., McKenna, D.H., Forder, J.R., Taylor, D.A., Cogle, C.R., Baraniuk, S., Olson, R.E., Jorgenson, B.C., Sayre, S.L., Vojvodic, R.W., Gordon, D.J., Skarlatos, S.I., Moyè, L.A., Simari, R.D., und for the Cardiovascular Cell Therapy Research, N., *LateTIME: A Phase-II, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled, Pilot Trial Evaluating the Safety and Effect of Administration of Bone Marrow Mononuclear Cells 2 to 3 Weeks after Acute Myocardial Infarction*. Texas Heart Institute Journal, 2010. **37**(4): S. 412-420.
74. Fischer-Rasokat, U., Assmus, B., Seeger, F.H., Honold, J., Leistner, D., Fichtlscherer, S., Schachinger, V., Tonn, T., Martin, H., Dimmeler, S., und Zeiher, A.M., *A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy*. Circ Heart Fail, 2009. **2**(5): S. 417-23.
75. Makkar, R.R., Smith, R.R., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L.E., Berman, D., Czer, L.S., Marban, L., Mendizabal, A., Johnston, P.V., Russell, S.D., Schuleri, K.H., Lardo, A.C., Gerstenblith, G., und Marban, E., *Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial*. Lancet, 2012. **379**(9819): S. 895-904.
76. Simons, M. und Ware, J.A., *Therapeutic angiogenesis in cardiovascular disease*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(11): S. 863-71.
77. Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., Kosaki, A., Shintani, S., Murohara, T., Imaizumi, T., und Iwasaka, T., *Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side*

- supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines*. *Circulation*, 2001. **104**(9): S. 1046-52.
78. Watanabe, T., Kawano, Y., Kanamaru, S., Onishi, T., Kaneko, S., Wakata, Y., Nakagawa, R., Makimoto, A., Kuroda, Y., Takaue, Y., und Talmadge, J.E., *Endogenous interleukin-8 (IL-8) surge in granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cell mobilization*. *Blood*, 1999. **93**(4): S. 1157-63.
 79. Hur, J., Yoon, C.H., Kim, H.S., Choi, J.H., Kang, H.J., Hwang, K.K., Oh, B.H., Lee, M.M., und Park, Y.B., *Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(2): S. 288-93.
 80. Zisa, D., Shabbir, A., Suzuki, G., und Lee, T., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a key therapeutic trophic factor in bone marrow mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **390**(3): S. 834-8.
 81. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., und Claesson-Welsh, L., *Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors*. *Biochem J*, 2011. **437**(2): S. 169-83.
 82. Nakamura, T., Mizuno, S., Matsumoto, K., Sawa, Y., Matsuda, H., und Nakamura, T., *Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by endogenous and exogenous HGF*. *J Clin Invest*, 2000. **106**(12): S. 1511-9.
 83. Urbanek, K., Rota, M., Cascapera, S., Bearzi, C., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Chimenti, S., Baker, M., Limana, F., Nurzynska, D., Torella, D., Rotatori, F., Rastaldo, R., Musso, E., Quaini, F., Leri, A., Kajstura, J., und Anversa, P., *Cardiac Stem Cells Possess Growth Factor-Receptor Systems That After Activation Regenerate the Infarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-Term Survival*. *Circulation Research*, 2005. **97**(7): S. 663-673.
 84. Baer, C. (2018), 'Effect of Several Culture Medium Supplements on the Expansion of Human Heart Derived Cells', (Julian-Maximilians-Universität).
 85. Klein, U. (2008), 'Kulturoptimierung, Zellsortierung und Charakterisierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen aus Herzmuskelbiopsaten', Masterarbeit (Technische Fachhochschule Berlin).
 86. Schussler-Lenz, M., Beuneu, C., Menezes-Ferreira, M., Jekerle, V., Bartunek, J., Chamuleau, S., Celis, P., Doevendans, P., O'Donovan, M., Hill, J., Hystad, M., Jovinge, S., Kyselovic, J., Lipnik-Stangelj, M., Maciulaitis, R., Prasad, K., Samuel, A., Tenhunen, O., Tonn, T., Rosano, G., Zeiher, A., und Salmikangas, P., *Cell-based therapies for cardiac repair: a meeting report on scientific observations and European regulatory viewpoints*. *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(2): S. 133-41.
 87. EMA Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP), *Guideline on Human Cell-Based Medicinal Products*. 2008: London.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephan Detert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Humane Herzohren als Ausgangsgewebe für die Isolation von Zellen für regenerative Therapien kardialer Erkrankungen / Human Atrial Appendages as Tissue Source for Isolating Cells for Regenerative Therapies of Cardiac Diseases“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Stephan Detert hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Stephan Detert, Christof Stamm, Christien Beez, Falk Diedrichs, Jochen Ringe, Sophie Van Linthout, Martina Seifert, Carsten Tschöpe, Michael Sittinger, Marion Haag.

The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies.

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2018;12:e1404–e1417.

Versuche:

- Mitarbeit am Versuchsdesign
- Formulierung der Fragestellung
- Durchführung der in den Methoden beschriebenen Versuche inklusive Zellkultivierung, Durchflusszytometrie, RNA-Isolation und Zellfärbungen; mit Ausnahme des Tube-Formation-Assays und des Mikroarrays

Auswertung:

- Auswertung und Interpretation der erhobenen Daten
- Erstellung sämtlicher Tabellen
- Erstellung der Abbildungen 2, 3, 4a, 5 und 6

Manuskript:

- Literaturrecherche
- Verfassen des Manuskripts und finale Überarbeitung

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrer/der betreuenden Hochschullehrerinnen

Unterschrift des Doktoranden

Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of KnowledgeSM)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"CELL and TISSUE ENGINEERING"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 24 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Cell Stem Cell	23,493	23.290	0.096030
2	Bone Research	977	12.354	0.002400
3	Stem Cell Reports	4,525	6.537	0.026290
4	Journal of Tissue Engineering	439	5.789	0.001000
5	STEM CELLS	21,694	5.587	0.035680
6	Stem Cells Translational Medicine	3,860	4.929	0.012790
7	World Journal of Stem Cells	1,278	4.376	0.003490
8	Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	3,963	4.089	0.006640
9	CYTOTHERAPY	5,589	3.993	0.009020
10	Stem Cells International	3,818	3.989	0.010590
11	EUROPEAN CELLS & MATERIALS	3,115	3.667	0.004290
12	Stem Cell Reviews and Reports	2,167	3.612	0.004640
13	TISSUE ENGINEERING	21,530	3.508	0.023730
14	STEM CELLS AND DEVELOPMENT	7,589	3.315	0.016440
15	Regenerative Medicine	1,875	2.992	0.003490
16	CELL TRANSPLANTATION	5,255	2.885	0.009420
17	Cellular and Molecular Bioengineering	813	2.435	0.002230
18	Bone & Joint Research	730	2.362	0.003010
19	Current Stem Cell Research & Therapy	1,093	2.168	0.001790
20	Stem Cell Research	2,735	1.829	0.008310
21	Cellular Reprogramming	631	1.430	0.001360
22	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	433	1.216	0.000760
23	Regenerative Therapy	83	1.182	0.000200
24	Journal of Biomaterials and Tissue Engineering	496	0.781	0.000720

Copyright © 2018 Clarivate Analytics

Druckexemplar der ausgewählten Publikation⁴

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2018;12:e1404–e1417.

<https://doi.org/10.1002/term.2528>

The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies.

Detert S, Stamm C, Beez C, Diedrichs F, Ringe J, Van Linthout S, Seifert M, Tschöpe C, Sittinger M, Haag M.

⁴ Copyright © 2017 John Wiley & Sons, Ltd.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Detert, S., Stamm, C., Beez, C., Diedrichs, F., Ringe, J., Van Linthout, S., Seifert, M., Tschöpe, C., Sittlinger, M., und Haag, M., *The atrial appendage as a suitable source to generate cardiac-derived adherent proliferating cells for regenerative cell-based therapies*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(3): S. e1404-e1417.

Impact-Faktor: 3.319 (2018)

Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 2015 bis 2018 am Labor für *Tissue Engineering* der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie und dem Berlin-Brandenburger Centrum für Regenerative Therapien unter den wachsamen Augen meiner Betreuer, Prof. Dr. Michael Sittinger und Dr. Marion Haag, durchgeführt. Ihnen beiden gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, ihre kontinuierliche Unterstützung und für ihre konstruktive Kritik.

Ich danke auch allen Kolleginnen und Kollegen der beiden Labore für ihre Ratschläge und ihre Bereitschaft, sich Zeit zu nehmen für all meine Fragen und Anliegen. Insbesondere bedanke ich mich bei Stefan Stich, Ann-Kathrin Schubert, Tilo Dehne, Jochen Ringe, Meaghan Stolk und Christien Beez.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Anja Wachtel bedanken, die stellvertretend für all jene steht, ohne die wahrscheinlich kein Labor überleben könnte, die Assistentinnen und Assistenten, die jede Methode im Schlaf beherrschen, die immer ein offenes Ohr haben, die an tausenden wissenschaftlichen Projekten mitarbeiten und am Ende auf keiner Publikation erscheinen.

Ein weiterer Dank geht an das Team des Instituts für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité und dort insbesondere an Dr. Sophie Piper für die exzellente Beratung in allen statistischen Fragen.

Für ihr Interesse an meiner Arbeit und dafür, dass sie mich immer zum Weitermachen ermuntert haben, möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

Der Friedrich-Ebert-Stiftung und allen Personen, die es mir ermöglicht haben, Teil dieser Stiftung zu werden, danke ich für mein Stipendium, das mir die Freiheit gegeben hat, mich ohne finanzielle und zeitliche Sorgen mit dem Thema meiner Doktorarbeit zu beschäftigen.

Zu guter Letzt gilt mein Dank den Patientinnen und Patienten, die eingewilligt haben, ein kleines Stückchen ihres Herzens für die Forschung zur Verfügung zu stellen. Denn zwischen langen Tagen im Labor, vor Mikroskopen und Messgeräten, nach zähen Besprechungen oder teuren Kongressen am anderen Ende der Welt; in den Nächten, wenn die Deadlines wieder zu nah und die Manuskripte zu kurz sind, wenn wir unter Bergen von *Papern* begraben liegen, kurz: wenn wir – wenn auch symbolisch – unser Herz in die Forschung stecken, dann sollten wir dabei nicht an Titel, *Grants* oder *Impact*-Faktoren denken, sondern an die Menschen, deren Leben wir mit unserer Arbeit eines Tages ein Stückchen besser, leichter oder erträglicher machen.