

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie
und dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung equiner multipotenter
mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe
und Untersuchung des kardiomyogenen
Differenzierungspotentials**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hannah Julia Stage
Tierärztin aus Berlin-Halensee

Berlin 2023
Journal-Nr.: 4416

Aus der Klinik für Pferde, Allgemeine Chirurgie und Radiologie

und dem Institut für Veterinär-Physiologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe
und Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hannah Julia Stage

Tierärztin

aus Berlin-Halensee

Berlin 2023

Journal-Nr.: 4416

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

horses, stem cells, adipose tissue, cell differentiation, mesenchymal stem cells (MeSH), myocytes, cardiac (MeSH), myocardium

Tag der Promotion: 31.10.2023

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-232-9

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2024 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
2. Literatur	3
2.1. Multipotente mesenchymale Stammzellen	3
2.1.1. Definition und Einteilung von Stammzellen	3
2.1.2. Charakterisierung von MSCs	5
2.1.2.1. Spezifisches Markerprofil	5
2.1.2.2. Tripotentes Differenzierungspotential	7
2.1.2.2.1. Adipogene Differenzierung	8
2.1.2.2.2. Osteogene Differenzierung	8
2.1.2.2.3. Chondrogene Differenzierung	9
2.1.2.3. Plastikadhärenz	10
2.1.3. Isolierung und Kultivierung von MSCs aus Fettgewebe	10
2.1.3.1. Fettgewebe	10
2.1.3.2. Isolierung	10
2.1.3.3. Kultivierung	11
2.1.3.4. Heterogenität der gewonnenen MSCs	12
2.1.3.5. Proliferationspotential	13
2.2. Einsatz von multipotenten mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin	13
2.2.1. Stammzellbasierte in-vitro-Modelle	15
2.3. Kardiomyogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	15
2.3.1. Kardiomyogenese und Signaltransduktionswege <i>in vivo</i>	16
2.3.1.1. Bedeutung des TGF β -/BMP-Signalweges	18
2.3.1.2. Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges	19
2.3.2. Kardiomyogene Differenzierungsprotokolle <i>in vitro</i>	20
2.3.3. Kardiale Markergene und Strukturproteine	22
2.4. Die kardiale Elektrophysiologie des Pferdes und Notwendigkeit speziesspezifischer <i>in-vitro</i>-Modelle	24

2.5. Zusammenfassung der Literaturrecherche	25
3. Material und Methoden	27
3.1. Pferde und Probenentnahme	28
3.2. Probenaufbereitung	28
3.3. Zellkultur – Isolierung und Kultivierung equiner ASCs	29
3.3.1. Isolierung equiner ASCs	29
3.3.2. Messung des Isolierungserfolgs	29
3.3.3. Passagieren	30
3.3.4. Kryokonservierung	30
3.3.5. Messung des Proliferationspotentials	30
3.3.6. Evaluierung geeigneter Serumsupplemente für die Kultivierung equiner Präadipozyten (Serumversuch)	31
3.4. Tripotentes Differenzierungspotential equiner ASCs	32
3.4.1. Adipogene Differenzierung	32
3.4.1.1. Studiendesign	32
3.4.1.2. Messung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität	32
3.4.1.3. Adipogenese-Score	33
3.4.1.4. Messung der gebildeten intrazellulären Lipide	33
3.4.1.5. Messung der Lipid-Nuclei-Ratio	33
3.4.2. Osteogene Differenzierung	33
3.4.2.1. Studiendesign	33
3.4.2.2. Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität	33
3.4.2.3. Messung des gebildeten Kalziums	34
3.4.2.4. Messung des Index der osteogenen Differenzierung	34
3.4.3. Chondrogene Differenzierung	34
3.4.3.1. Studiendesign	34
3.4.3.2. Histologische Untersuchung	35
3.4.3.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
3.4.3.2.2. Messung der gebildeten sauren Mukopolysaccharide	35
3.4.3.2.3. Modifizierter „Bern-Score“	35
3.5. Immunologische Methoden	36
3.5.1. Vorbereitung und Fluoreszenzfärbung equiner ASCs	36
3.5.2. Durchflusszytometrische Untersuchung zur Immunphänotypisierung equiner ASCs	38
3.6. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs	38
3.6.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin	38
3.6.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1	39

3.7. Molekularbiologische Methoden	40
3.7.1. RNA-Isolierung	41
3.7.2. Messung der RNA-Konzentration	41
3.7.3. Messung der RNA-Qualität	42
3.7.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	42
3.7.5. Primer (Oligonukleotide)	42
3.7.5.1. Primerdesign und -herstellung	42
3.7.5.2. Überprüfen und Etablieren der Primer	43
3.7.5.2.1. Konventionelle PCR	43
3.7.5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese	44
3.7.5.2.3. Aufreinigung des PCR-Produktes	44
3.7.5.2.4. DNA-Sequenzierung	44
3.7.5.2.5. Verdünnungsreihen und Effizienzen	44
3.7.5.2.6. Gradientenlauf	46
3.7.5.2.7. Referenzgene	46
3.7.6. SYBR Green RT-qPCR	46
3.7.6.1. Schmelzkurvenanalyse	47
3.7.6.2. Platteninterne und plattenübergreifende RT-qPCR-Kontrollen	47
3.7.6.3. Auswertung der RT-qPCR-Daten	48
3.8. Statistische Analyse	48
4. Ergebnisse	51
4.1. Pferde und Probenentnahme	51
4.2. Isolierung und Kultivierung equiner ASCs	52
4.2.1. Isolierung equiner ASCs	52
4.2.2. Messung des Isolierungserfolgs	52
4.2.3. Messung des Proliferationspotentials	53
4.2.4. Evaluierung geeigneter Zellkultursupplemente (Serumversuch)	56
4.3. Tripotentes Differenzierungspotential equiner ASCs	58
4.3.1. Adipogene Differenzierung	58
4.3.1.1. Zellmorphologie	58
4.3.1.2. Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität	58
4.3.1.3. Messung der gebildeten intrazellulären Lipide	59
4.3.1.4. Messung der Lipid-Nuclei-Ratio	60
4.3.2. Osteogene Differenzierung	61
4.3.2.1. Zellmorphologie	61
4.3.2.2. Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität	62
4.3.2.3. Messung des Index der osteogenen Differenzierung	63
4.3.3. Chondrogene Differenzierung	64

4.3.3.1. Makroskopische Beurteilung _____	64
4.3.3.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung _____	64
4.3.3.1.2. Messung der gebildeten Mukopolysaccharide _____	65
4.3.3.1.3. Modifizierter „Bern-Score“ _____	66
4.4. Immunologische Methoden zur Immunphänotypisierung equiner ASCs _____	67
4.5. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs _____	69
4.5.1. Zellmorphologische Ergebnisse _____	69
4.5.1.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin _____	69
4.5.1.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1 _____	71
4.5.2. Molekularbiologische Ergebnisse _____	74
4.5.2.1. RNA-Isolierung _____	74
4.5.2.2. Gelelektrophorese nach kPCR _____	74
4.5.2.3. DNA-Sequenzierung _____	75
4.5.2.4. Effizienzanalyse und Gradientenlauf _____	75
4.5.2.5. Referenzgene _____	76
4.5.2.6. RT-qPCR-Kontrollen _____	76
4.5.2.7. Schmelzkurvenanalyse _____	77
4.5.2.8. SYBR Green RT-qPCR Resultate der kardiomyogenen Differenzierungsversuche _____	78
4.5.2.8.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin _____	78
4.5.2.8.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1 _____	79
4.6. Zusammenfassung der Resultate _____	82
5. Diskussion _____	83
5.1. Studienkollektiv _____	83
5.2. Fettgewebe _____	84
5.3. Isolierung und Kultivierung equiner Präadipozyten _____	86
5.4. Einfluss des Kulturmediums _____	88
5.5. Proliferationspotential _____	90
5.6. Charakterisierung equiner Präadipozyten _____	91
5.6.1. Tripotente Differenzierungsversuche _____	92
5.6.1.1. Adipogenese _____	92
5.6.1.2. Osteogenese _____	95
5.6.1.3. Chondrogenese _____	97
5.6.2. Immunphänotypische Untersuchung _____	99
5.7. Kardiomyogene Differenzierungsversuche _____	101
5.7.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin _____	105

5.7.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1	106
5.8. Schlussfolgerungen und Ausblick	108
6. Zusammenfassung	111
7. Summary	113
8. Literaturverzeichnis	115
9. Anhang	157
9.1. Materialien	157
9.2. Studienkollektiv ($n = 16$ Tiere)	168
9.3. Zusammensetzung der Medien	169
9.4. Färbeprotokolle	173
9.5. Durchflusszytometrie (FACS)	174
9.6. Molekularbiologie	175
9.7. Resultate	177
9.7.1. Messung des Proliferationspotentials	177
9.7.2. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs	178
9.7.2.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin	178
9.7.2.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1	179
9.8. Vorversuch	181
9.8.1. Material und Methoden	181
9.8.2. Ergebnisse	181
9.8.3. Schlussfolgerungen	182
9.8.4. Studienkollektiv ($n = 20$ Tiere)	184
Publikationen	186
Danksagung	187
Förderung der Promotionsarbeit	189
Erklärung Interessenskonflikt	190
Selbstständigkeitserklärung	191

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung von Stammzellen (nach Geburek und Stadler 2011; Ntege et al. 2020).	3
Abb. 2: Einflussfaktoren bei der Isolierung und Kultivierung auf die Eigenschaften multipotenter mesenchymaler Stammzellen (modifiziert nach Kocan et al. 2017; Câmara et al. 2020).	12
Abb. 3: Multilini-Differenzierungspotential am Beispiel humaner mesenchymaler Stammzellen in Bezug auf den Einsatz in der regenerativen Medizin (modifiziert nach Han et al. 2019).	14
Abb. 4: Darstellung der Kardiomyogenese (modifiziert nach Später et al. 2014; Sahara et al. 2015)..	17
Abb. 5: Schematische Darstellung der TGF β -/BMP-Signalgebung (modifiziert nach Schmierer und Hill 2007).....	18
Abb. 6: Klassischer, kanonischer Wnt/ β -Catenin-Signalweg (modifiziert nach Zhu et al. 2021).	20
Abb. 7: Differenzierungsstrategien mesenchymaler Stammzellen in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (modifiziert nach Gupta et al. 2021).	22
Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	27
Abb. 9: Versuchsdesign des 5-Azacytidin-Induktionsversuchs.....	39
Abb. 10: Versuchsdesign des kardiomyogenen Differenzierungsversuchs des ersten und zweiten Teilversuchs unter Einsatz der Induktionsfaktoren Aktivin A (Act A), knochenmorphogenetisches Protein-4 (BMP-4) und Dickkopf-1 (DKK-1).	40
Abb. 11: Altersverteilung des Studienkollektivs.	51
Abb. 12: Durchlichtmikroskopieaufnahmen equiner Präadipozyten nach einwöchiger Kultivierungszeit.	52
Abb. 13: Darstellung des Isolierungserfolgs equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe.....	53
Abb. 14: Darstellung der Zellwachstumskurven von equinen Präadipozyten der Passage 3.....	54
Abb. 15: Darstellung der Populationsverdopplungszeiten equiner Präadipozyten der Passage 3.....	55
Abb. 16: Darstellung der charakteristischen Zellmorphologie der mit verschiedenen Serumvarianten kultivierten Präadipozyten.	56
Abb. 17: Beurteilung der für die Kultivierung equiner Präadipozyten geeigneten Serumzusätze auf Grundlage eines Scoring-Systems.....	57
Abb. 18: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der adipogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.....	58
Abb. 19: Messung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH)-Aktivität.....	59
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen nach Nilrot- und DAPI-Färbung der adipogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.	60
Abb. 21: Lipid-Nuclei-Ratio adipogen induzierter equiner Präadipozyten.....	61
Abb. 22: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung equiner Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.	62
Abb. 23: Darstellung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität der osteogen induzierten equinen Präadipozyten an Tag 14.	63

Abb. 24: Darstellung der Indizes der osteogenen Differenzierung (IOD) der osteogen induzierten und nach Von Kossa angefärbten equinen Präadipozyten.	64
Abb. 25: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der chondrogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.	65
Abb. 26: Bewertung der chondrogenen Differenzierung equiner Präadipozyten mithilfe des modifizierten „Bern-Scores“ (nach Grogan et al. 2006).	66
Abb. 27: Charakterisierung equiner Präadipozyten mittels Durchflusszytometrie.	68
Abb. 28: Zellmorphologie der mit 5-Azacytidin kardiomyogen induzierten equinen Präadipozyten.	70
Abb. 29: Zellmorphologie der mithilfe von Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 induzierten equinen Präadipozyten (1. Teilversuch).	72
Abb. 30: Zellmorphologie der equinen Präadipozyten vor und nach Induktion mit den Faktoren Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 (2. Teilversuch).	73
Abb. 31: Agarose-Gelelektrophorese nach kPCR.	75
Abb. 32: Regressionsanalyse am Beispiel des Zielgens TNNI3.	76
Abb. 33: Darstellung der Schmelzkurve (Dissoziationskurve) am Beispiel des Zielgens TNNI3.	77
Abb. 34: Resultate der SYBR Green RT-qPCR der Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach Exposition mit 5-Azacytidin.	78
Abb. 35: Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach kardiomyogener Induktion mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 (1. Teilversuch).	80
Abb. 36: Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach kardiomyogener Induktion mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 (2. Teilversuch).	81
Abb. 37: Gating-Strategien zur Charakterisierung equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen und mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Durchflusszytometrie.	174
Abb. 38: Isolierungserfolg der mittels verschiedener Isolierungsmethoden von unterschiedlichen Fettgewebelokalisationen gewonnenen ASCs und DFAT-Zellen.	182

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Namen und Funktionen der für multipotente mesenchymale Stammzellen spezifischen Oberflächenantigene.	6
Tab. 2: Namen und Funktionen der von multipotenten mesenchymalen Stammzellen exprimierten pluripotenzassoziierten embryonalen Stammzellmarker.....	7
Tab. 3: Bewertungssystem zur Evaluierung geeigneter Serumzusätze.	31
Tab. 4: Punktevergabesystem zur Bewertung der chondrogenen Differenzierung equiner Präadipozyten (modifiziert nach Grogan et al. 2006).	36
Tab. 5: Auflistung der für die Immunphänotypisierung eingesetzten Antikörper.....	37
Tab. 6: Protokoll des Induktionsversuchs mit Act A, BMP-4 und DKK-1 (1. Teilversuch).	39
Tab. 7: Protokoll des Induktionsversuchs mit Act A, BMP-4 und DKK-1 (2. Teilversuch).	40
Tab. 8: Reaktionsansatz für die kPCR.	43
Tab. 9: Temperatur-Zeit-Profil der kPCR.	43
Tab. 10: Reaktionsansatz für die RT-qPCR (Verdünnungsreihe).	45
Tab. 11: Temperatur-Zeit-Profil der kPCR (Gradientenlauf).	46
Tab. 12: Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green RT-qPCR.	47
Tab. 13: Reaktionsansatz für die SYBR Green RT-qPCR.	47
Tab. 14: Geräte	157
Tab. 15: Verbrauchsmaterialien	159
Tab. 16: Zellkulturmedien und Supplemente.....	160
Tab. 17: Reagenzien und Lösungen	161
Tab. 18: Puffer.....	164
Tab. 19: Kits	164
Tab. 20: Antikörper und Isotypkontrollen (Durchflusszytometrie)	165
Tab. 21: PC-Software und Datenbanken	166
Tab. 22: Verwendete Internetquellen	166
Tab. 23: Externe Labore.....	167
Tab. 24: Auflistung der beprobten $n = 16$ Tiere.....	168
Tab. 25: Basalmedium (B-M).	169
Tab. 26: Expansionsmedium (E-M).....	169
Tab. 27: Serumversuch - Medienzusammensetzung.....	169
Tab. 28: Zusammensetzung des adipogenen Induktionsmediums (modifiziert nach Jurek et al. 2020).	169
Tab. 29: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Jurek et al. 2020).....	170
Tab. 30: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Alipour et al. 2015).....	170
Tab. 31: Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Burk et al. 2013).....	170

Tab. 32: Zusammensetzung des kardiomyogenen Differenzierungsmediums unter Einsatz des Induktionsfaktors 5-Azacytidin (5-AZA) (modifiziert nach Yang et al. 2012).....	171
Tab. 33: Zusammensetzung des modifizierten Basalmediums (MB-M).	171
Tab. 34: 1. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1).....	171
Tab. 35: 1. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1).....	171
Tab. 36: 2. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1).....	172
Tab. 37: 2. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1).....	172
Tab. 38: 2. Teilversuch, 3. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1).....	172
Tab. 39: Färbeablauf Nilrot- und DAPI-Färbung (adipogene Differenzierung).	173
Tab. 40: Färbeablauf Von Kossa-Färbung (osteogene Differenzierung).	173
Tab. 41: Färbeablauf Hämatoxylin-Eosin-Färbung (chondrogene Differenzierung).	173
Tab. 42: Färbeablauf Alcianblau-Kernechtrot-Färbung gemäß Herstellerangaben der Fa. Morphisto GmbH (chondrogene Differenzierung).	173
Tab. 43: Auflistung der für die Immunphäotypisierung eingesetzten Isotypkontrollen.....	174
Tab. 44: Auflistung der für die SYBR Green RT-qPCR eingesetzten Primer.	175
Tab. 45: Darstellung der Resultate der Effizienzanalyse und der optimalen Annealing- und Schmelztemperaturen im Rahmen der RT-qPCR-Etablierung.	176
Tab. 46: Auflistung der mithilfe des TC20™ Automated Cell Counters gemessenen Zellzahlen als Mittelwerte \pm SD.	177
Tab. 47: Auflistung der berechneten Populationsverdopplungszeiten (PDT) als Mittelwerte \pm SD.	177
Tab. 48: RT-qPCR-Resultate des 5-AZA-Induktionsversuchs.	178
Tab. 49: RT-qPCR-Resultate des kardiomyogenen Induktionsversuchs (1. Teilversuch) mit Act A, BMP-4 und DKK-1.	179
Tab. 50: SYBR Green RT-qPCR-Resultate des kardiomyogenen Induktionsversuchs (2. Teilversuch) mit Act A, BMP-4 und DKK-1.....	180
Tab. 51: Auflistung der im Vorversuch beprobten $n = 20$ Tiere (1. Teil).	184

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
5-AZA	5-Azacytidin
Abb.	Abbildung
abd	abdominal
Act	Activin
ACTB	β-Actin
AK	Antikörper
ALK	anaplastische Lymphomkinase
ALP	Alkalische Phosphatase
ASCs	adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BAT	brown adipose tissue (braunes Fettgewebe)
BLAT	brown-like adipose tissue (beiges Fettgewebe)
B-M	Basalmedium
BMI	Body-Mass-Index
BM-MSCs	bone marrow mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark)
BMP	bone morphogenetic protein (knochenmorphogenetisches Protein)
BMP-4	bone morphogenetic protein-4 (knochenmorphogenetisches Protein-4)
bp	Basenpaare
BSL	bovines Serumlipid
C	Ceiling-Kultur
CD	Cluster of Differentiation
CFU	colony forming unit (Kolonie-formende Einheit)
cGTP	Guanosintriphosphat
CHO	chinese hamster ovary (Ovar des chinesischen Hamsters)
CLCs	cardiomyocyte-like cells (Kardiomyozyten-ähnliche Zellen)
C _t	cycle threshold (Ct-Wert)
cTnC	cardiac troponin C (kardiales Troponin C)
cTnI	cardiac troponin I (kardiales Troponin I)
cTnT	cardiac troponin T (kardiales Troponin T)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCE	dead cell exclusion (Ausschluss toter Zellen)
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser

Abkürzungsverzeichnis

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFAT	dedifferentiated fat cells (dedifferenzierte Fettzellen)
DKK-1	Dickkopf-1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT3B	DNA (Zytosin-5) Methyltransferase 3b
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DPSCs	dental pulp stem cells (Stammzellen aus der Zahnpulpa)
dsDNA	double-stranded DNA (doppelsträngige DNA)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Effizienz
EAD	early after depolarisation (frühe Nachdepolarisierung)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E-M	Expansionsmedium
ESCs	embryonic stem cells (embryonale Stammzellen)
et al.	<i>et altera</i>
EXP	Explantat
EZM	extrazelluläre Matrix
Fa.	Firma
FACS	fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FGF	fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FHF	first heart field (erstes Herzfeld)
FKS	fetales Kälberserum
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
FU	Freie Universität
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GATA4	GATA Binding Protein 4
gDNA	genomische DNA
GPDH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HH	Hedgehog
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen, DR Isotyp
HS	horse serum (Pferdeserum)
HSCs	hematopoietic stem cells (hämatopoetische Stammzellen)
i.d.R.	in der Regel
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IGF	insulin-like growth factor (insulinähnlicher Wachstumsfaktor)

Abkürzungsverzeichnis

ind	induziert
ing	inguinal
IOD	Index der osteogenen Differenzierung
iPSCs	induced pluripotent stem cells (induzierte pluripotente Stammzellen)
IQR	Interquartilsbereich
IRC	Inter-Run-Calibrator
ISCT	International Society for Cellular Therapy
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
KCl	Kaliumchlorid
kPCR	konventionelle PCR
LPS	Lipopolysaccharid
M.	<i>musculus</i>
MB-M	modifiziertes Basalmedium
MC	modifizierte Ceiling-Kultur
MEF-2C	myocyte enhancer factor-2C
MEF-CM	Mouse Embryonic Fibroblast Conditioned Medium
MHC	myosin heavy chain (Myosin-Schwerkette)
MHC-II	Haupthistokompatibilitätskomplex-II
MLC	myosin light chain (Myosin-Leichtkette)
mM	Millimolar
MSCs	mesenchymal stem/stromal cells (mesenchymale Stamm-/Stromazellen)
MUP	4-Methyl-Umbelliferyl-Phosphat
MW	Mediumwechsel
MYC	MYC-Protoonkogen
MYH6/7	Myosin Heavy Chain 6/7
n	Anzahl
n.d.	nicht durchgeführt
NANOG	Nanog
NK	Negativkontrolle
NKX2-5	NK2 Homeobox 5
nM	Nanomolar
NRT	Non-Reverse-Transkriptase
NTC	no template control (Kontrolle ohne Template)
OCT4/POUF5	Octamer-Binding Protein 4/POU Class 5 Homeobox 1
OD	optische Dichte
p	Signifikanzwert
P	Passage
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

Abkürzungsverzeichnis

PB-MSCs	peripheral blood mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus dem peripheren Blut)
PDT	population doubling time (Populationsverdopplungszeit)
pH	potentia hydrogenii
PK	Positivkontrolle
pmol	Pikomol
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
r	Korrelationskoeffizient
r ²	Bestimmtheitsmaß
rb	retrobulbär
RIN	RNA integrity number
RN18S	18S ribosomale RNA
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RUNX-2	Runt-bezogener Transkriptionsfaktor 2
s	slope (Steigung)
s.o.	siehe oben
sc	subkutan
SD	Standardabweichung
SF-MSCs	synovial-fluid mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus der Synovialflüssigkeit)
SHF	second heart field (zweites Herzfeld)
SMAD	suppressor of mothers against decapentaplegic
SM-MSCs	synovial membrane-derived mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus der Synovialmembran)
sog.	sogenannte
SOX2	SRY-bezogenes HMG-Box-Gen 2
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
SSEA-4	Stadium-spezifisches embryonales Antigen-4
SVF	stromal vascular fraction (stromale Gefäßfraktion)
T0	Startzeitpunkt, Tag 0
T3	Zeitpunkt nach drei Wochen, Tag 21
T _a Opt	optimal annealing temperature (optimale Hybridisierungstemperatur)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBX5	T-Box Transkriptionsfaktor
TGF-β	transforming growth factor beta (transformierender Wachstumsfaktor beta)
T _M	melting temperature (Schmelztemperatur)
TnIc	troponin I cardiac (kardiales Troponin I)

Abkürzungsverzeichnis

TnIf	troponin I fast (schnelles Troponin I)
TnIs	troponin I slow (langsames Troponin I)
TNNI3	troponin I3, cardiac type (Troponin I3, kardialer Typ)
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethanhydrochlorid
TT-MSCs	tendon tissue mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen aus Sehngewebe)
U	unified atomic mass unit (atomare Masseneinheit)
VEGF	vascular endothelial growth factor
WAT	white adipose tissue (weißes Fettgewebe)
Wnt	wingless-related integration site
$x g$	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
α	Signifikanzniveau
α -MEM	α -Eagle's Minimum Essential Medium
μ U	Mikro-Unit

1. Einleitung

Multipotente mesenchymale Stammzellen (MSCs) wurden in den letzten Jahren ausführlich untersucht. Neben ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung weisen sie ein regeneratives Potential auf und können in verschiedene Zelltypen mesodermalen und ektodermalen Ursprungs differenzieren. Diese Eigenschaften machen MSCs zu einer vielversprechenden Zellquelle und begründen ihren Einsatz in vielen präklinischen und klinischen Studien. Neben der Fähigkeit zur Geweberegeneration *in vivo* sind auch ihr Einsatz bei der Entwicklung von Krankheitsmodellen und der Wirkstofftestung von Medikamenten von Bedeutung. Grundlage hierfür stellen die Identifizierung geeigneter Zellquellen und die Charakterisierung der Zellen *in vitro* dar. Als besonders geeignet hinsichtlich ihrer Gewebeverfügbarkeit und ihres Proliferations- und Differenzierungspotentials erweisen sich mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe.

In verschiedenen Studien wurde das Multiliniempotential dieser Zellen untersucht, wobei neben der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung unter anderem auch die Differenzierung in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen bei verschiedenen Spezies beschrieben wurde, nicht jedoch beim Pferd. Beim Pferd würde die Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials eine wichtige Grundlage für die Etablierung eines speziesspezifischen *in-vitro*-Kardiomyozytenmodells darstellen, um damit die kardiale Elektrophysiologie des Pferdes besser erforschen zu können.

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele:

1. Erstes Ziel war die Charakterisierung und der Vergleich equiner MSCs, die mittels zwei verschiedener Isolationsverfahren aus unterschiedlichen Fettgewebequellen *in vitro* isoliert und kultiviert wurden.
2. Zweites Ziel war die Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner MSCs aus Fettgewebe *in vitro*, um damit das Grundlagenwissen für die Etablierung eines pferdespezifischen *in-vitro*-Kardiomyozytenmodells zu erweitern.

Es wurden die folgenden Hypothesen aufgestellt:

Ad Ziel 1:

- 1.a. MSCs können aus abdominalem, retrobulbärem und subkutanem Fettgewebe mittels des Explantatverfahrens und nach Kollagenaseverdau beim Pferd gewonnen werden.
- 1.b. Das bei der Kultivierung der Zellen verwendete Serumsupplement hat einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen *in vitro*.
- 1.c. Die gewonnenen Zellen weisen *in vitro* typische Charakteristika als MSCs auf und können dadurch eindeutig als solche identifiziert werden.
- 1.d. Equine MSCs verhalten sich unabhängig des Isolationsverfahrens hinsichtlich ihrer *in-vitro*-Charakteristika gleichermaßen.
- 1.e. Demgegenüber unterscheiden sich equine MSCs in Abhängigkeit von ihrer Gewebequelle hinsichtlich ihrer *in-vitro*-Charakteristika.

Ad Ziel 2:

- 2.a. Equine MSCs können mithilfe verschiedener Isolationsprotokolle *in vitro* in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen differenziert werden.
- 2.b. Die kardiomyogen induzierten equinen MSCs weisen typische morphologische und molekularbiologische Charakteristika nativer Kardiomyozyten auf und stellen somit eine Grundlage für die Etablierung eines *in-vitro*-Kardiomyozytenmodells beim Pferd dar.

2. Literatur

2.1. Multipotente mesenchymale Stammzellen

2.1.1. Definition und Einteilung von Stammzellen

Adulte multipotente mesenchymale Stammzellen, auch als mesenchymale Stromazellen (engl. mesenchymal stromal/stem cells, MSCs) bezeichnet, residieren als undifferenzierte Körperzellen in Bindegeweben, die eine perivaskuläre Nische aufweisen (Shi und Gronthos 2003; Fuchs et al. 2004; Meirelles et al. 2006), und können über symmetrische Zellteilung sowohl zu gewebespezifischen Tochterzellen ausdifferenzieren als auch wiederum neue Stammzellen durch asymmetrische Teilung hervorbringen (Morrison et al. 1997; Baksh et al. 2004; Morrison und Kimble 2006). Ursprünglich wurde mit dem Begriff „undifferenzierte Stammzelle“ eine Zelle bezeichnet, die neben dem Potential, sich selbst zu erneuern und verschiedene ausdifferenzierte Körperzellen zu bilden, eine hohe Proliferationsfähigkeit aufweist (Badura-Lotter 2005). Heute werden Stammzellen allgemein anhand ihrer Differenzierungskapazität sowie Herkunft in verschiedene Zelltypen unterteilt, wie in **Abb. 1** aufgezeigt ist. Anhand ihres Differenzierungspotentials lassen sich Stammzellen in totipotente, pluripotente, multipotente und unipotente Zellen einteilen. Nach ihrer Herkunft können embryonale von somatischen Zellen unterschieden werden. Letztgenannte werden in fetale, neonatale und adulte Stammzellen untergliedert, zu denen neben hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) auch MSCs gehören (Geburek und Stadler 2011; Ntege et al. 2020).

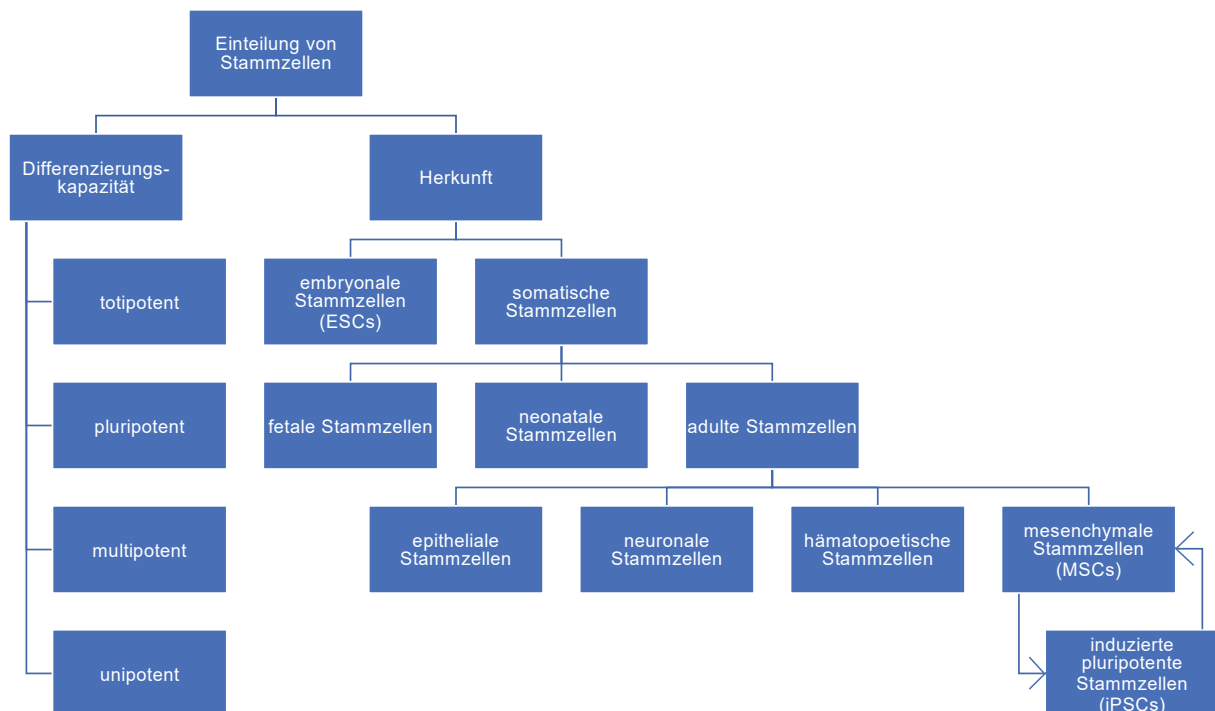


Abb. 1: Einteilung von Stammzellen (nach Geburek und Stadler 2011; Ntege et al. 2020).

Eine **totipotente Zelle** ist in der Lage einen gesamten Organismus zu entwickeln und kann sich in embryonale und extraembryonale Zelltypen differenzieren (Rossant 1987; Shen et al. 2021). Zu den totipotenten Zellen zählen Zygoten und frühe Embryonalzellen bis zum Vier-Zell-Stadium (Blastomere) (Van De Velde et al. 2008; Mitalipov und Wolf 2009; Maemura et al. 2021). **Pluripotente Zellen** können zwar keinen gesamten Organismus, aber nahezu alle Zellen der Keimblätter Entoderm, Mesoderm und Ektoderm bilden. Hierzu zählen embryonale Stammzellen (engl. embryonic stem cells, **ESCs**) nach dem Vier-Zell-Stadium, die aus der inneren Zellmasse von Blastozysten vor der Implantation gewonnen werden (Van De Velde et al. 2008; Geens et al. 2009), weshalb ihr Einsatz vor allem in der Humanmedizin ethisch umstritten ist (Robertson 2001; Lo und Parham 2009). Hinzu kommen das hohe tumorigene und immunogene Potential, das bei allogener Transplantation zu Abstoßungsreaktionen führen kann (Swijnenburg et al. 2008; Tan et al. 2014), und die begrenzte Verfügbarkeit (Engle und Puppala 2013; Avior et al. 2016). Um diese Limitationen zu umgehen, wurden 2006 durch die Arbeitsgruppe von Shinya Yamanaka et al. ESC-ähnliche Zellen aus adulten Mausfibroblasten durch *in-vitro*-Reprogrammierung entwickelt, die als „induzierte pluripotente Stammzellen“ (**iPSCs**) bezeichnet werden (Takahashi und Yamanaka 2006). Inzwischen können auch MSCs in iPSCs reprogrammiert werden (Lee et al. 2016; Pessôa et al. 2019; Bressan et al. 2020). Während bei Nagern und dem Menschen iPSCs hinsichtlich ihres Kultivierungsverhaltens und Differenzierungspotentials gut charakterisiert sind, erscheint es bei Großtiermodellen schwieriger, die Pluripotenzbedingungen *in vitro* aufrecht zu erhalten (Bressan et al. 2020) bzw. ist aufgrund einer begrenzten Studienlage bei diesen Spezies weitaus weniger über stammzellregulierende Faktoren bekannt (Donadeu 2014; Koh und Piedrahita 2014; Bressan et al. 2020). **Multipotente Zellen** können sich in verschiedene Zelltypen innerhalb eines Keimblattes differenzieren, wobei heutzutage bekannt ist, dass auch die Differenzierung über Keimblatt-Grenzen hinweg möglich ist (Jiang et al. 2002; Liu et al. 2009; Heo et al. 2013; Soltani et al. 2016). MSCs entstammen dem Mesoderm (Caplan 1991; Vodyanik et al. 2010) und können aus einer Vielzahl von Geweben gewonnen werden, wobei Knochenmark die ursprünglichste und am besten untersuchte Lokalisation darstellt (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1970). Aus Knochenmark gewonnene MSCs werden als BM-MSCs (engl. bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) bezeichnet (Klingemann et al. 2008). Weitere Lokalisationen stellen unter anderem das Sehngewebe (engl. tendon tissue mesenchymal stem cells, TT-MSCs) (Paebst et al. 2014; Hillmann et al. 2016), das periphere Blut (engl. peripheral blood mesenchymal stem cells, PB-MSCs) (Koerner et al. 2006; Dhar et al. 2012), die Synovialflüssigkeit (engl. synovial-fluid mesenchymal stem cells, SF-MSCs) (Arévalo-Turrubiarte et al. 2019), Synovialmembran (engl. synovial membrane-derived mesenchymal stem cells, SM-MSCs) (Lee et al. 2011; Gale et al. 2019), Zahnpulpa (engl. dental pulp stem cells, DPSCs) (Suchanek et al. 2009) und das

Fettgewebe dar (engl. adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, ASCs) (Zuk et al. 2002; Si et al. 2019). Neben ihrem Multiliniendifferenzierungspotential (Pittenger et al. 1999) stellen MSCs aufgrund ihrer parakrinen, immunmodulatorischen und anti-inflammatorischen Wirkungsweise eine für die regenerative Medizin vielversprechende Zellquelle dar (Chaudhary et al. 2018; Afflerbach et al. 2020) (**Kap. 2.2.**).

2.1.2. Charakterisierung von MSCs

Im Jahr 2006 wurden von der International Society for Cellular Therapy (ISCT) Minimal Kriterien zur Charakterisierung humaner MSCs festgelegt, um die von unterschiedlichen Forschungsgruppen verschiedenen Isolierungs- und Kultivierungsmethoden und Ansätze zur Charakterisierung der Zellen zu vereinheitlichen (Dominici et al. 2006). Auf Grundlage dieser Kriterien weisen MSCs *in vitro* ein definiertes spezifisches Oberflächenmarkerprofil (**Kap. 2.1.2.1**), tripotentes Differenzierungspotential (**Kap. 2.1.2.2**) und eine Fähigkeit zur Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen (**Kap. 2.1.2.3**) auf (Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2002; Dominici et al. 2006; Vidal et al. 2007; Schwarz et al. 2012; Kono et al. 2014).

2.1.2.1. Spezifisches Markerprofil

MSCs exprimieren die Oberflächenmarker (engl. cluster of differentiation, CD) CD105, CD73 und CD90 auf $\geq 95\%$ der Zellpopulation, während hingegen CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR (MHC-II) auf $\leq 2\%$ der Zellpopulation vorhanden und damit „nicht exprimiert“ sind (Dominici et al. 2006). Dies macht deutlich, dass es nicht einen einzigen MSC-Marker gibt, sondern die Expression eines ganzen Markerpanels überprüft werden muss, um MSCs eindeutig identifizieren zu können (Dominici et al. 2006; Wagner und Ho 2007; Rojewski et al. 2008; De Schauwer et al. 2011b). Hinzu kommt, dass zwischen verschiedenen Spezies und bei aus unterschiedlichen Geweben gewonnenen MSCs Unterschiede in der Expression der Oberflächenmarker bestehen (Ranera et al. 2011; Penny et al. 2012) und eine individuelle, hohe Variabilität der CD-Marker zwischen verschiedenen Donortieren beschrieben wurde (Paebst et al. 2014).

Pferde weisen (verglichen zum Menschen) ein differierendes Antigenprofil auf und erfüllen nicht alle für humane MSCs festgelegten Kriterien (Ranera et al. 2011; Burk et al. 2013; De Schauwer et al. 2014; Paebst et al. 2014). Neben der Expression von CD90 werden beim Pferd die Oberflächenmarker CD29 und CD44 stabil exprimiert (De Mattos Carvalho et al. 2009; Barberini et al. 2014; Alipour et al. 2015), während die Expression von CD105 in der Literatur als variabel beschrieben wird (De Schauwer et al. 2011b; Ranera et al. 2011; Spaas et al. 2013; Barberini et al. 2014; Paebst et al. 2014; Hillmann et al. 2016; Schröck et al. 2017; Arnhold et al. 2019). CD73 kann zumeist nicht nachgewiesen werden (Paebst et al. 2014;

Hillmann et al. 2016; Pall et al. 2016; Merlo et al. 2019). Ein Überblick der oben beschriebenen CD-Marker mit ihren jeweiligen Funktionen ist **Tab. 1** zu entnehmen.

Tab. 1: Namen und Funktionen der für multipotente mesenchymale Stammzellen spezifischen Oberflächenantigene.

(Goyert et al. 1988; Setoguchi et al. 1989; Lauener et al. 1990; Wright et al. 1990; Ziegler-Heitbrock und Ulevitch 1993; Scheuermann und Racila 1995; Ditschkowski et al. 1999; Dominici et al. 2006; Depoil et al. 2008; Penny et al. 2012; Li et al. 2013; Monteiro et al. 2018; Trachsel et al. 2022; GeneCards Database www.genecards.org)

Zelloberflächen-antigen	Alternative Bezeichnung	Funktion
Positivmarker (Expression \geq 95%)		
CD29	β 1-Integrin	Exprimiert auf hämatopoetischen Zellen; Zelloberflächenadhäsionsmolekül; aus α - und β -Untereinheiten bestehend
CD44	Hyaluronat-Rezeptor	Aufreguliert auf aktivierten T- und B-Zellen; Rezeptor für Hyaluronsäure; Interaktion mit Liganden wie Osteopontin, Matrix-Metalloproteinasen, Fibronectin, Kollagen und Laminin
CD73	Ekto-5'-Nucleotidase	Exprimiert von verschiedenen Zellen, darunter Endothelzellen, B- und T-Zellen; Umwandlung extrazellulärer Nukleotide in Nucleoside zur Erlangung der Membrangängigkeit
CD90	Thy-1	Exprimiert durch periphere T-Zellen; Beteiligung an Entwicklungsprozessen im Gehirn (Synaptogenese etc.), Zelladhäsion und -migration
CD105	Endoglin	Exprimiert auf aktivierten Makrophagen und Endothelzellen; wichtigstes im vaskulären Endothel vorhandenes Glykoprotein; Beteiligung an Endothelzell-Bindung an Integrine
Negativmarker (Expression \leq 2%)		
CD11b/ CD14	Integrin α -M/Myeloid-zellspezifisches leucinreiches Glykoprotein	Exprimiert auf Granulozyten, Blutmonozyten, B-Zellen; Zelladhäsionsmolekül/Beteiligung an angeborener Immunantwort (LPS) und Hochregulierung weiterer Zelloberflächenmoleküle
CD34	Hämatopoetisches Progenitorzellantigen	V.a. auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert; Zelladhäsionsmolekül, vermutlich an früher Hämatopoese beteiligt (unterstützt Anheftung an Extrazellulärmembran)
CD45	Proteintyrosin-Phosphatase, Rezeptortyp C	Exprimiert durch alle hämatopoetischen Zellen; verschiedene Splice-Varianten; T-Zell-Aktivierung über Antigenrezeptor, Pan-Leukozytenmarker
CD79 α / CD19	Ig α /B-Lymphozyten-Antigen	Exprimiert auf B-Lymphozyten; Komponente des B-Zellrezeptor-Komplexes, wichtige Rolle bei B-Zell-Signalgebung, B-Zell-spezifischer Korezeptor, essentiell für B-Zell-Aktivierung
HLA-DR (Humanes Leukozytenantigen, DR Isotyp)	MHC-II (Haupthistokompatibilitätskomplex)	Exprimiert auf verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen, z.B. B-Zellen und Makrophagen; Präsentation von Antigenen

Auch wenn die Untersuchung des Genexpressionsprofils von MSCs keinen Teil der ISCT-Kriterien darstellt, soll diese nicht unerwähnt bleiben: MSCs exprimieren einige der ESCs-assoziierten Pluripotenzgene, zu denen neben den drei klassischen ESCs-Transkriptionsfaktoren *OCT4/POUF5*, *SOX2* und *NANOG* auch Faktoren wie *DNMT3B*, *MYC* und *SSEA-4* gehören (Riekstina et al. 2009; Pierantozzi et al. 2011; Hackett et al. 2012; Calloni

et al. 2013; Esteves et al. 2014; Kozłowska et al. 2019). Die Expression dieser Marker kann zwischen verschiedenen Studien sowie speziesspezifisch variieren (Riekstina et al. 2009; Pierantozzi et al. 2011; Hackett et al. 2012; Esteves et al. 2014; Kozłowska et al. 2019), wie in **Kap. 5.7.** beschrieben ist. **Tab. 2** gibt einen Überblick über die Funktionen dieser ESCs-assozierten Pluripotenzfaktoren, wobei die genauen Funktionen bis heute nicht vollständig verstanden sind (Calloni et al. 2013).

Tab. 2: Namen und Funktionen der von multipotenten mesenchymalen Stammzellen exprimierten pluripotenzassoziierten embryonalen Stammzellmarker.

(Kamachi et al. 2000; Pan et al. 2002; Watanabe et al. 2002; Huntriss et al. 2004; Hyslop et al. 2005; Gang et al. 2007; Kopp et al. 2008; Calloni et al. 2013; Kozłowska et al. 2019; GeneCards Database www.genecards.org); **Abkürzung:** ESCs, embryonale Stammzellen.

Gen-abkürzung	Genname	Funktion
<i>OCT4/POUF5</i> ¹	Oktamer-bindendes Protein 4	Transkriptionsregulator, Kontrolle der Pluripotenz von ESCs sowie der Expression einer Reihe von an der Embryonalentwicklung beteiligter Gene, Bildung eines Komplexes mit <i>SOX2</i>
<i>NANOG</i> ¹	Nanog	Transkriptionsregulator, Beteiligung an der Proliferation von ESCs, Kontrolle der Pluripotenz von ESCs, Verhinderung der Differenzierung von ESCs in extraembryonale Linien, essentiell bei der <i>in-vitro</i> -Differenzierung und Selbsterneuerung von MSCs, begünstigt osteogene gegenüber adipogene Differenzierung
<i>SOX2</i> ¹	SRY-bezogenes HMG-Box-Gen 2	Aufrechterhaltung des ESCs-Status zusammen mit <i>OCT4/POUF5</i> und <i>NANOG</i> , jedoch können Zielgene nicht alleine aktiviert werden (<i>OCT4/POUF5</i> notwendig)
<i>DNMT3B</i>	DNA (Zytosin-5) Methyltransferase 3b	Essentiell für De-Novo-Methylierung und Etablierung von DNA-Methylierungsmustern während der Entwicklung, bei Differenzierung von ESCs Verschiebung von <i>DNMT3B1</i> in Richtung <i>DNMT3B3</i>
<i>MYC</i> (<i>c-MYC</i>)	<i>MYC</i> -Protoonkogen	Beteiligt an Vielzahl von Zellfunktionen, Zellproliferation, Differenzierung, Metabolismus, Apoptose, reguliert Adipogenese, wird kontrolliert durch <i>SOX2</i> , Risiko der Onkogenese
<i>SSEA-4</i>	Stadium-spezifisches-embryonales Antigen-4	Nützlicher Marker für die Isolierung von MSCs mit Differenzierungspotential in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Pankreas- und neuronale Zellen

¹Klassische ESC-Marker.

2.1.2.2. Tripotentes Differenzierungspotential

Durch die Untersuchung des tripotenten Differenzierungspotentials wird das Multiliniendifferenzierungspotential von MSCs exemplarisch an drei Differenzierungswegen *in vitro* überprüft. Die Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten wird durch verschiedene in den Induktions- und Differenzierungsmedien enthaltende Transkriptionsfaktoren und die dadurch aktivierten Signalwege eingeleitet (Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2002; Dominici et al. 2006).

2.1.2.2.1. Adipogene Differenzierung

Zur Induktion der Adipogenese kommen Faktoren wie 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX), Dexamethason, Insulin bzw. Insulin-Transferrin-Selenium (ITS), Indomethacin oder alternativ Rosiglitazon zum Einsatz (Burk et al. 2013; Lange-Consiglio et al. 2013; Alipour et al. 2015; Hillmann et al. 2016; Sandhu et al. 2017; Arnhold et al. 2019; Jurek et al. 2020). Dazu existieren in der Literatur verschiedene Protokolle, in denen einerseits der Einsatz eines einzigen Differenzierungsmediums für 3 Tage (Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016), 7 Tage (Iacono et al. 2017), 10 Tage (Arnhold et al. 2019) oder 21 Tage (Alipour et al. 2015) und andererseits der Einsatz sowohl eines Induktionsmediums für 2 Tage als auch eines Differenzierungsmediums für 7 bzw. 14 Tage beschrieben ist (Sandhu et al. 2017; Jurek et al. 2020). Bedeutend für die Adipogenese ist der Wntless-related integration site (Wnt-)/ β -Catenin-Signalweg, der an der frühen adipogenen Differenzierung beteiligt ist, während der Maturation der Adipozyten inaktiviert wird und nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren beeinflusst (Ross et al. 2000; Bennett et al. 2002; Naji et al. 2019). Eine adipogene Differenzierung von MSCs ist durch das Auftreten von Lipidvakuolen gekennzeichnet, die standardmäßig durch eine Oil Red O- oder Nilrot-Färbung nachgewiesen werden (Schwarz et al. 2012; Lange-Consiglio et al. 2013; Alipour et al. 2015; Hillmann et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019; Jurek et al. 2020). Der Anteil der differenzierten MSCs wird nachfolgend über die Messung der Fluoreszenzindizes bestimmt (Sandhu et al. 2017; Jurek et al. 2020). Zudem können Enzymaktivitäten, insbesondere der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) (Becker et al. 2021), sowie die Expression spezifischer Marker molekularbiologisch und immunzytochemisch überprüft werden. Zu diesen Markern zählen Leptin, der Peroxisom Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ , das Fettsäure-bindende Protein 4 und der Glukosetransporter Typ 4 (Lange-Consiglio et al. 2013; Arnhold et al. 2019; Jurek et al. 2020).

2.1.2.2.2. Osteogene Differenzierung

Zur Induktion der Osteogenese von MSCs kommen Differenzierungsmedien mit Induktionsfaktoren wie β -Glycerophosphat, Dexamethason und Ascorbinsäure bzw. L-Ascorbinsäure-2-Phosphat zum Einsatz, wobei die Inkubationsdauer bei verschiedenen Studien zwischen 7 Tagen (Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019), 14 Tagen (Mohanty et al. 2016; Arnhold et al. 2019), 21 Tagen (Braun et al. 2010; Schwarz et al. 2012; Alipour et al. 2015; Hillmann et al. 2016; Mohanty et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Merlo et al. 2019) und 28 Tagen variiert (Mohanty et al. 2016). Auch der Einsatz von knochenmorphogenetischen Proteinen (engl. bone morphogenetic protein, BMP) wurde beschrieben (Friedman et al. 2006). Die Regulation der osteogenen Differenzierung erfolgt über verschiedene Signalwege und Transkriptionsfaktoren, insbesondere über BMP,

Hedgehog (HH), dem Wnt- β -Catenin- und Notch-Signalweg (Wang et al. 1988; St-Jacques et al. 1999; Qiu et al. 2007; Engin et al. 2008). Die Osteogenese wird durch das Vorhandensein von Kalziumablagerungen bzw. der Zellmorphologie sich differenzierender Osteoblasten (noduläre Aggregate, polygonale Form) über verschiedene Verfahren nachgewiesen. Dazu zählen die Alizarinrot- und Von-Kossa-Färbung (Braun et al. 2010; Kisiel et al. 2012) sowie die quantitative Messung der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (EZM) durch Ermittlung der optischen Dichte (Ostanin et al. 2008). Zusätzlich können Genexpressionsanalysen von für Osteoblasten spezifische Transkriptionsfaktoren durchgeführt werden, wobei neben dem Runt-bezogenen Transkriptionsfaktor 2 (RUNX-2), einem wichtigen frühen Osteogenese-Marker, auch Osteocalcin, Osteopontin, Osterix und das Knochen-Sialoprotein zu nennen sind (Zuk et al. 2002; Kisiel et al. 2012; Bourin et al. 2013; De Bakker et al. 2013). Aktivitätsmessungen von Enzymen, insbesondere der während der osteogenen Differenzierung ansteigenden Alkalischen Phosphatase (ALP), können ebenfalls durchgeführt werden (Arnhold et al. 2019).

2.1.2.2.3. Chondrogene Differenzierung

Während die adipogene und osteogene Differenzierung von MSCs standardmäßig in 2D-Monolayer-Kultur durchgeführt wird, kann die chondrogene Differenzierung über verschiedene Kulturverfahren erfolgen. Dazu zählen die in 96-Well-Platten durchgeführte 2D-Monolayer-Kultur, die in 15ml-Polypropylenröhrchen durchgeführte Standard-3D-Micromass-Pelletkultur und die in 96-Well-Platten durchgeführte 3D-Mikropellet-Kultur (Prosser et al. 2019). Alternativ kommen Alginate-Hydrogel- und Atellocollagen-Kulturen zum Einsatz, die das chondrogene Differenzierungspotential von MSCs erhöhen (Kolambkar et al. 2007; Kim et al. 2020). Pelletkultur bedeutet, dass sich sphärische Zellaggregate am Boden der Kulturgefäße bilden, die für 7 Tage (Zhang et al. 2010), 14 Tage (Zhang et al. 2010; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Prosser et al. 2019), 21 Tage (Giovannini et al. 2008; Zhang et al. 2010; Arnhold et al. 2019; Prosser et al. 2019) oder 28 Tage (Braun et al. 2010) mit chondrogenem Differenzierungsmedium induziert werden. Als chondrogene Induktionsfaktoren werden BMP-2, der transformierende Wachstumsfaktor- β -1 oder -3 (engl. transforming growth factor beta, TGF- β -1/3), der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (engl. fibroblast growth factor, FGF-2) oder der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (engl. insulin-like growth factor, IGF) eingesetzt (Pittenger et al. 1999; Chiou et al. 2006; Longobardi et al. 2006; Mehlhorn et al. 2007). Weitere die Chondrogenese regulierende Signalwege und Faktoren stellen HHs und der Wnt/ β -Catenin-Signalweg dar (Leung et al. 2011; Huang et al. 2018; Naji et al. 2019). Der Nachweis einer chondrogenen Differenzierung, d.h. das Vorhandensein von Glykosaminoglykanen und Kollagen, kann über eine Alcianblau-, Masson's Trichrom- und Safranin-O-Färbung (Burk et al. 2013) sowie über ein visuelles histologisches von Grogan et al. (2006) entwickeltes

Bewertungssystem erfolgen (Grogan et al. 2006) (**Kap. 3.4.3.2.3.**). Zudem können die Messungen des Anteils sulfatierter Proteoglykane, zu denen Typ-2 α -Kollagen und Aggrecan gehören (Pittenger et al. 1999; Burk et al. 2013), bzw. von SOX9 und des Cartilage Oligomeric Matrix Proteins als weitere Biomarker erfolgen (Bourin et al. 2013; Arnhold et al. 2019).

2.1.2.3. Plastikadhärenz

Das plastikadhärente Wachstum von MSCs unter Standardkulturbedingungen ist ein wichtiges Selektionsmerkmal für die Isolierung von MSCs aus einem heterogenen Zellgemisch. MSCs können sich an mit Plastik behandelte Oberflächen anheften (adhärieren), während nicht-MSCs nicht-adhätierend sind, im Kulturmedium suspendiert bleiben und bei Mediumwechseln (MW) herausgewaschen werden (Dominici et al. 2006; Choudhery et al. 2022).

2.1.3. Isolierung und Kultivierung von MSCs aus Fettgewebe

2.1.3.1. Fettgewebe

Es lassen sich drei Fettgewebearten unterscheiden, weißes (engl. white adipose tissue, WAT), braunes (engl. brown adipose tissue, BAT) und beiges Fettgewebe (engl. brown-like adipose tissue, BLAT) (Young et al. 1984; Cousin et al. 1992; Zoico et al. 2019). Während WAT eine hohe endokrine Aktivität aufweist, als Energiespeicher und mechanischer Schutz dient (Young 1976; Coelho et al. 2013), wird BAT eine im Energiemetabolismus regulatorische Rolle zugeschrieben und dient der Thermogenese (Smith und Roberts 1964; Van Marken Lichtenbelt et al. 2009). BLAT scheint sowohl eine Funktion bei der Energiespeicherung als auch der Thermogenese zu haben (Wu et al. 2013; Zoico et al. 2019). BAT wird nicht nur bei Neonaten, sondern auch bei Adulten in supraklavikulären Lokalisationen oder im Nackenbereich nachgewiesen (Aherne und Hull 1966). WAT tritt in viszeralen und subkutanen Fettdepots auf (Wronska und Kmiec 2012) und kann sich in BLAT umwandeln (Himms-Hagen et al. 2000; Wu et al. 2013; Altinova 2022). BLAT liegt sowohl in subkutanen Fettdepots als auch in den für BAT-spezifischen Lokalisationen vor (Lidell et al. 2014; Pandžić Jakšić und Grizelj 2016). Die verschiedenen Fettgewebearten reagieren auf metabolische Veränderungen Depot-spezifisch. Dies hat Einfluss auf ihre Mikroumgebung und die von ihr ausgesendeten Signale, wodurch die Zellausbeute, der Phänotyp und die von den ASCs sezernierten Faktoren beeinflusst werden können (Lee et al. 2014; Câmara et al. 2020).

2.1.3.2. Isolierung

ASCs werden standardmäßig aus WAT, darunter aus subkutanem, viszeralem, inguinalem, retroperitonealem und abdominalem Fettgewebe isoliert (Metcalf et al. 2016; Arnhold et al. 2019), wobei auch Studien existieren, in denen die Gewinnung aus BAT beschrieben ist (Silva et al. 2014; Jiang et al. 2018). Während die Gewinnung von BM-MSCs mit einigen Limitationen

verbunden ist (geringe Zellausbeute, niedrige Proliferationsrate und erhöhte Morbidität an der Entnahmestelle), sind ASCs aufgrund ihrer leichten Gewebezugänglichkeit und des Vorliegens in großen Mengen in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Stammzellforschung gerückt (Pittenger et al. 1999; Zuk et al. 2002; Bukowska et al. 2021). Zur Gewinnung von MSCs existieren verschiedene Protokolle, wobei klassischerweise ein enzymatischer Verdau mittels Kollagenase (Kollagenase I oder II, in 0,075–0,2% Verdünnung) durchgeführt wird, wobei die enthaltenen Gewebezellen freigesetzt werden (Rodbell 1966; Zuk et al. 2002; Schwarz et al. 2012). Alternativ kommen Digestionslösungen wie Trypsin oder Hyaluronidase zum Einsatz (Gittel et al. 2013). Nach dem Kollagenaseverdau und der Zentrifugation des Fettgewebes werden mature Adipozyten von der im Zellpellet konzentrierten stromalen Gefäßfraktion (engl. stromal vascular fraction, SVF) separiert (Vidal et al. 2007; Matsumoto et al. 2008; Braun et al. 2010; Shen et al. 2011; Schwarz et al. 2012; Kono et al. 2014; Alipour et al. 2015; Murata et al. 2016; Arnhold et al. 2019; Merlo et al. 2019). Die SVF stellt ein heterogenes Zellgemisch dar und beinhaltet neben ASCs und HSCs viele weitere Zellen, darunter Fibroblasten, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten. Nach Aussäen der SVF-Zellen in Plastik-Zellkulturgefäße können ASCs *in vitro* weiter kultiviert werden, wobei ASCs keine homogene Zellfraktion darstellen, obgleich sie weitaus homogener als SVF-Zellen sind (Bourin et al. 2013). Beim Pferd stellt der Kollagenaseverdau (im Folgenden auch als „SVF“-Verfahren bezeichnet) das am häufigsten eingesetzte Kulturverfahren dar (Braun et al. 2010; Hillmann et al. 2016; Murata et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019; Merlo et al. 2019). Um potentiell negative Einflüsse wie eine unspezifische Wirkung, eine variable Produktzusammensetzung zwischen verschiedenen Herstellern und Kontaminationen mit Toxinen der beim SVF-Verfahren eingesetzten Enzyme zu vermeiden, wurde das Explantat-Verfahren entwickelt (Priya et al. 2014). Dieses Verfahren basiert auf der direkten Explantation des Fettgewebes und Zellmigration der Präadipozyten aus dem Gewebestück in die Kulturschale. Dazu werden Fettgewebestückchen auf den Boden von Plastik-Zellkulturgefäßen aufgelegt, aus denen aufgrund ihres Migrationspotentials Zellen auswandern, die am Boden der Zellkulturgefäße adhäreren (Lee et al. 2011; Salehinejad et al. 2012; Gittel et al. 2013; Priya et al. 2014; Sandhu et al. 2017). Die isolierten Zellen weisen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf (Merlo et al. 2019).

2.1.3.3. Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgt standardmäßig unter Standardzellkulturbedingungen in einem Inkubator bei 37°C, gesättigter Wasserdampfatosphäre und zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes bei 5% CO₂ (Freshney 2010). Das Kulturmedium, das den Zellen alle essentiellen Nährstoffe bereitstellt, stellt den bei weitem wichtigsten Faktor bei der

in-vitro-Kultivierung dar (Levintow und Eagle 1961; Bettger und Mckeehan 1986; Butler und Jenkins 1989). Als Kulturmedium kommen zumeist Eagle´s-Medien (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, DMEM oder α -Eagle´s Minimum Essential Medium, α -MEM) und Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medien mit niedrigem oder hohem Glukosegehalt zum Einsatz (Pal et al. 2009; Fekete et al. 2014; Naji et al. 2019). Die Supplementierung mit Blutserum, zumeist fetalem Kälberserum (FKS), ist bedeutend, da dieses neben Nährstoffen viele essentielle Makromoleküle, Wachstumsfaktoren, Hormone und Transportproteine enthält und eine wachstumsfördernde, mitogene Wirkung aufweist (Freshney 1994; Lindl und Bauer 2002; Gstraunthaler 2003). Alternativ kommen speziesspezifische Seren, Plättchen-Derivate (autologe Thrombozytenlysate) (Del Bue et al. 2008; Hemeda et al. 2014) oder eine Kombination verschiedener Seren zum Einsatz (Mareschi et al. 2001). Zur Reduktion von Kontaminationen mit Bakterien, Hefen und Pilzen werden dem Medium standardmäßig Antibiotika und Antimykotika zugesetzt (Farzaneh 2021).

2.1.3.4. Heterogenität der gewonnenen MSCs

Der Einsatz unterschiedlicher Isolierungs- und Kultivierungsverfahren hat erheblichen Einfluss auf die Zellausbeute, das Proliferations- und Differenzierungspotential und die parakrine Wirkung der gewonnenen MSCs (Hua et al. 2013; Czapla et al. 2019; Câmara et al. 2020) (**Abb. 2.**). Bei der Zellisolierung sind insbesondere donorspezifische Faktoren wie das Alter, Geschlecht, der Body-Mass-Index (BMI) und das Vorliegen von Grunderkrankungen entscheidend, die in variablen Eigenschaften der MSCs resultieren können (Mojallal et al. 2011; Choudhery et al. 2014; Marycz et al. 2016). Zudem müssen Speziesspezifitäten sowie die Art und Aufbereitung des entnommenen Gewebes berücksichtigt werden (Gittel et al. 2013; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Câmara et al. 2020).

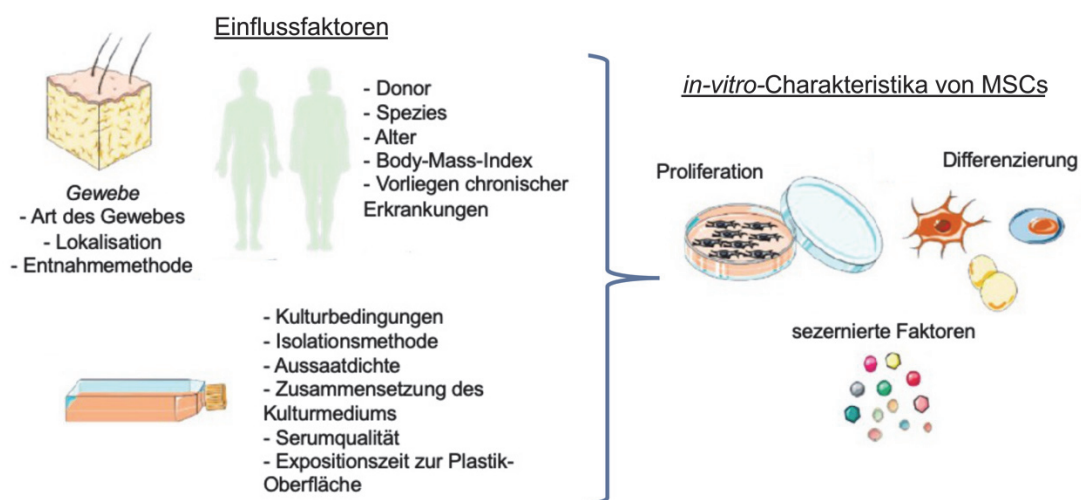


Abb. 2: Einflussfaktoren bei der Isolierung und Kultivierung auf die Eigenschaften multipotenter mesenchymaler Stammzellen (modifiziert nach Kocan et al. 2017; Câmara et al. 2020).

Ad Abb. 2: Eine Vielzahl von Faktoren (die Gewebequelle, donorspezifische Faktoren und das gewählte Isolierungs- und Kultivierungsverfahren) beeinflussen die *in-vitro*-Charakteristika von MSCs, zu denen das Proliferations- und Differenzierungspotential sowie die parakrine Wirkungsweise gehören.

2.1.3.5. Proliferationspotential

MSCs (darunter insbesondere ASCs) weisen ein hohes Proliferationspotential *in vitro* auf (Alipour et al. 2015; Arnhold et al. 2019). Für die Untersuchung der Proliferationskapazität der kultivierten MSCs existieren verschiedene Verfahren wie die Ermittlung der Zellwachstumskinetik, der Populationsverdopplungszeit (engl. population doubling time, PDT) oder der Kolonie-formenden Einheit (engl. colony forming unit, CFU) (Burk et al. 2013; Alipour et al. 2015). Arnhold et al. (2019) wiesen einen Anstieg des Proliferationspotentials von Passage (P) 1 bis 10 bei ASCs aus retroperitonealem und subkutanem Fettgewebe nach (Arnhold et al. 2019). Im weiteren Verlauf wird eine Abnahme der Telomerase-Aktivität sowie der Proliferationsfähigkeit mit zunehmender Kultivierungszeit beobachtet. Es kommt zur zellulären Seneszenz, deren Auftreten je nach Donor- und Gewebeherkunft der MSCs variieren kann (Bernardo et al. 2007; Bork et al. 2010). Ein direkter Einfluss der Proliferationskapazität der Zellen auf die MSC-Charakteristika und das Differenzierungspotential wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen (Bonab et al. 2006; Wagner et al. 2008).

2.2. Einsatz von multipotenten mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin

Neben dem in **Kap. 2.1.2.2.** beschriebenen klassischen tripotenten Differenzierungspotential haben MSCs die Fähigkeit, in weitaus mehr spezialisierte Zelltypen verschiedener Gewebe zu differenzieren (**Abb. 3, Seite 14**), darunter in Kardiomyozyten (Rangappa et al. 2003; Yang et al. 2012; Carvalho et al. 2013), Skelettmuskelzellen (Gang et al. 2004), Hepatozyten (He et al. 1983), Neuronen (Jang et al. 2010), Tenozyten (Kuo und Tuan 2008), Zellen des Epithels (Păunescu et al. 2007) und der Epidermis (Ma et al. 2009). Es wird davon ausgegangen, dass ihre Fähigkeit zur Multipotenz allein nicht ihr regeneratives Potential begründet, sondern vielmehr eine Folge der Wirkung der von MSCs sezernierten, bioaktiven Faktoren (insbesondere von Wachstumsfaktoren und Zytokinen) ist (Cequier et al. 2021; Han et al. 2022). Dieser parakrine Wirkungsmechanismus begründet ihre anti-inflammatorischen, anti-apoptischen und anti-fibrotischen Effekte und die Fähigkeit zur Angiogenese (Vizoso et al. 2017; Cequier et al. 2021). Insbesondere ASCs, BM-MSCs und UCB-MSCs werden zur Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt, darunter Osteoarthritis (Jo et al. 2014; Latief et al. 2016), Sehnen- bzw. Bandverletzungen (Smith et al. 2003; Van Loon et al. 2014), Verletzungen der Haut (Sato et al. 2004) oder kardiovaskuläre Erkrankungen wie dem akuten Myokardinfarkt (Miyahara et al. 2006; Léobon et al. 2009) und Kardiomyopathien mit

Gewebeischämie (Chen et al. 2006). Defektes Herzgewebe besitzt eine sehr geringe Regenerationsfähigkeit bzw. wurden die Existenz und das Differenzierungspotential kardialer Progenitorzellen von verschiedenen Forschungsgruppen in Frage gestellt (Neidig et al. 2018; Chien et al. 2019; Epstein 2019). Nach Transplantation können MSCs zur myokardialen Regeneration und zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen (Assmus et al. 2002; Zhang et al. 2007; Beliën et al. 2022). Die meisten stammzellbasierten, regenerativen Therapien befinden sich in einer noch experimentellen Phase oder werden im Rahmen klinischer Studien untersucht. Diese können in der Datenbank „ClinicalTrials.gov“ (U.S. National Library of Medicine, 2022) eingesehen werden. Eingang in die Praxis haben erst wenige MSC-basierte-Arzneimittel gefunden (Wright et al. 2021).

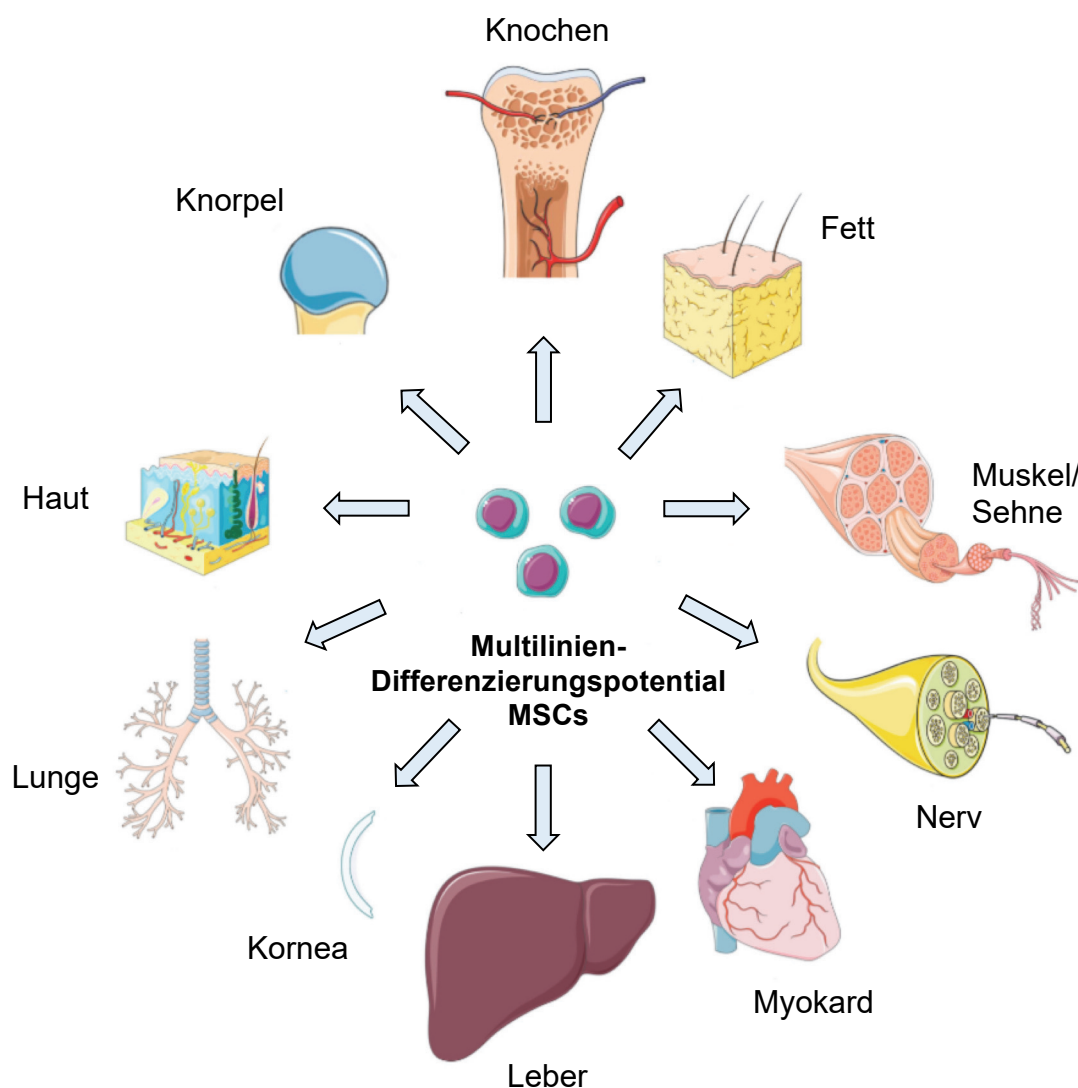


Abb. 3: Multiliniendifferenzierungspotential am Beispiel humaner mesenchymaler Stammzellen in Bezug auf den Einsatz in der regenerativen Medizin (modifiziert nach Han et al. 2019).

Neben dem klassischen tripotenten Differenzierungspotential können MSCs in weitaus mehr spezialisierte Zellen unterschiedlicher Gewebe differenzieren. Dies begründet ihren Einsatz in der regenerativen Medizin. **Abkürzung:** MSCs: mesenchymale Stammzellen.

2.2.1. Stammzellbasierte in-vitro-Modelle

In präklinischen Studien werden seit Jahrzehnten stammzellbasierte *in-vitro*-Modelle genutzt, zur Überprüfung der Wirksamkeit und Toxizitätsbestimmung von Medikamenten, der Untersuchung pharmakokinetischer Prozesse und der Untersuchung der Entwicklung von Krankheitsprozessen (English et al. 2014; Ryu et al. 2019; Sun et al. 2021; Zhou et al. 2021). MSCs werden beispielsweise als Tumormodelle (Li et al. 2009; Lin et al. 2009) sowie für die Organrekonstruktion („Tissue Engineering“) eingesetzt (Ju et al. 2008; Li et al. 2017). Ein *in-vitro*-Modell besteht aus zwei Hauptkomponenten, den verwendeten Zellen und dem Zellkultursubstrat (Afflerbach et al. 2020). MSCs gelten als eine besonders geeignete Zellquelle, da sie die Fähigkeit besitzen, donor- und speziesspezifische Merkmale im Modell widerzuspiegeln (Hillmann et al. 2016), geeignete Wachstumseigenschaften aufweisen (Burk et al. 2013; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019) und nicht zu den transformierten Zellen gehören (English et al. 2014). Ein limitierender Faktor stellt das gegenüber ESCs und iPSCs eingeschränkte Differenzierungspotential dar (**Kap. 2.1.1.**). Als zweite Komponente des *in-vitro*-Modells hat das Zellkultursubstrat einen wesentlichen Einfluss auf das Differenzierungsergebnis der Zellen. Neben den klassischen 2D-Zellkulturmodellen (Monolayer) kommen auch komplexe 3D-Modelle zum Einsatz. Dazu zählen Sphäroid-Kulturen (Lee et al. 2018; Ryu et al. 2019), Gerüstsubstanzen wie Hydrogele (Yang et al. 2017), Organoide (Lancaster und Knoblich 2014) und „Organs-on-a-Chip“-Systeme (Perottoni et al. 2021), die den Zellen ein Substrat bereitstellen, das die physiologischen *in-vivo*-Bedingungen aufgrund ihrer 3D-Struktur und der mehrzelligen Gewebeorganisation (Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktion) besser widerspiegelt (Ryu et al. 2019; Afflerbach et al. 2020).

2.3. Kardiomyogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Zum besseren Verständnis der *in-vitro*-Differenzierung von MSCs in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (engl. cardiomyocyte-like cells, CLCs) durch den Einsatz verschiedener Induktionsfaktoren und -medien werden im Folgenden die Kardiomyogenese und innerhalb dieser wirkende Signaltransduktionswege *in vivo* erläutert. Dieses Grundlagenwissen stellt nicht nur die Basis für eine mögliche Anwendung von MSCs in der regenerativen Medizin, sondern auch für die Wirkstoffprüfung und Medikamentenentwicklung in der kardiovaskulären Forschung dar (Soltani und Mahdavi 2022).

2.3.1. Kardiomyogenese und Signaltransduktionswege *in vivo*

Das Herz stellt das erste bei der Embryonalentwicklung gebildete funktionelle Organ dar (Ji et al. 2003). Es ist aus verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Funktionen zusammengesetzt, darunter aus atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten, Zellen des Erregungsleitungssystems, glatten Muskel- und Endothelzellen (Hansson et al. 2009; Vincent und Buckingham 2010; Später et al. 2014; Sahara et al. 2015). Die sich nach der Gastrulation entwickelnden drei Keimblätter entstammen der inneren Zellmasse (Morris et al. 2010; Später et al. 2014). Aus dem Mesoderm entwickeln sich die meisten Zellen des Myokards (Stalsberg und Dehaan 1969; Tam et al. 1997; Abu-Issa und Kirby 2007; Xin et al. 2013). Die Mesoderminduktion und Bildung kardialer Progenitorzellen wird hauptsächlich durch die extrazellulären Signalwege Wnt/ β -Catenin, die TGF- β -Superfamilie (Wnt3a, BMP-4, Nodal, Activin A) sowie durch FGFs reguliert (Cornell et al. 1995; Marvin et al. 2001; Nosedá et al. 2011). Als Reaktion auf abwechselnd hemmende und stimulierende Signale dieser und nachgeschalteter Transkriptionsereignisse entwickelt sich das erste (engl. first heart field, FHF) und zweite (engl. second heart field, SHF) Herzfeld, woraus letztendlich über die Bildung eines Herzschlauches und einer Herzschleife die kardialen Ventrikel, Vorhöfe und Ausflusstrakte entstehen (Evans et al. 2010; Vincent und Buckingham 2010; Später et al. 2014). Während das FHF zur Bildung des linken Ventrikels und beider Atrien beiträgt (Buckingham et al. 2005; Später et al. 2014), ist das SHF für die Bildung des rechten Ventrikels sowie ebenso beider Atrien und des Ausflusstraktes verantwortlich (Zaffran et al. 2004; Buckingham et al. 2005; Galli et al. 2008; Später et al. 2014). Neben den beiden Herzfeldern sind auch weitere Zellpopulationen an der Kardiomyogenese beteiligt, wie kardiale Neuralleistenzellen (Gorza et al. 1988; Hildreth et al. 2008) und das sich zum Epikard entwickelnde proepikardiale Organ, dessen Zellen nach einer epithelial-mesenchymalen Transition als Epikard-abgeleitete Zellen zur Entstehung des kardialen Ausflusstraktes beitragen können (Katz et al. 2012; Sahara et al. 2015). Die an der Kardiomyogenese beteiligten Signalwege und Transkriptionsfaktoren sind in **Abb. 4 (Seite 17)** schematisch dargestellt.

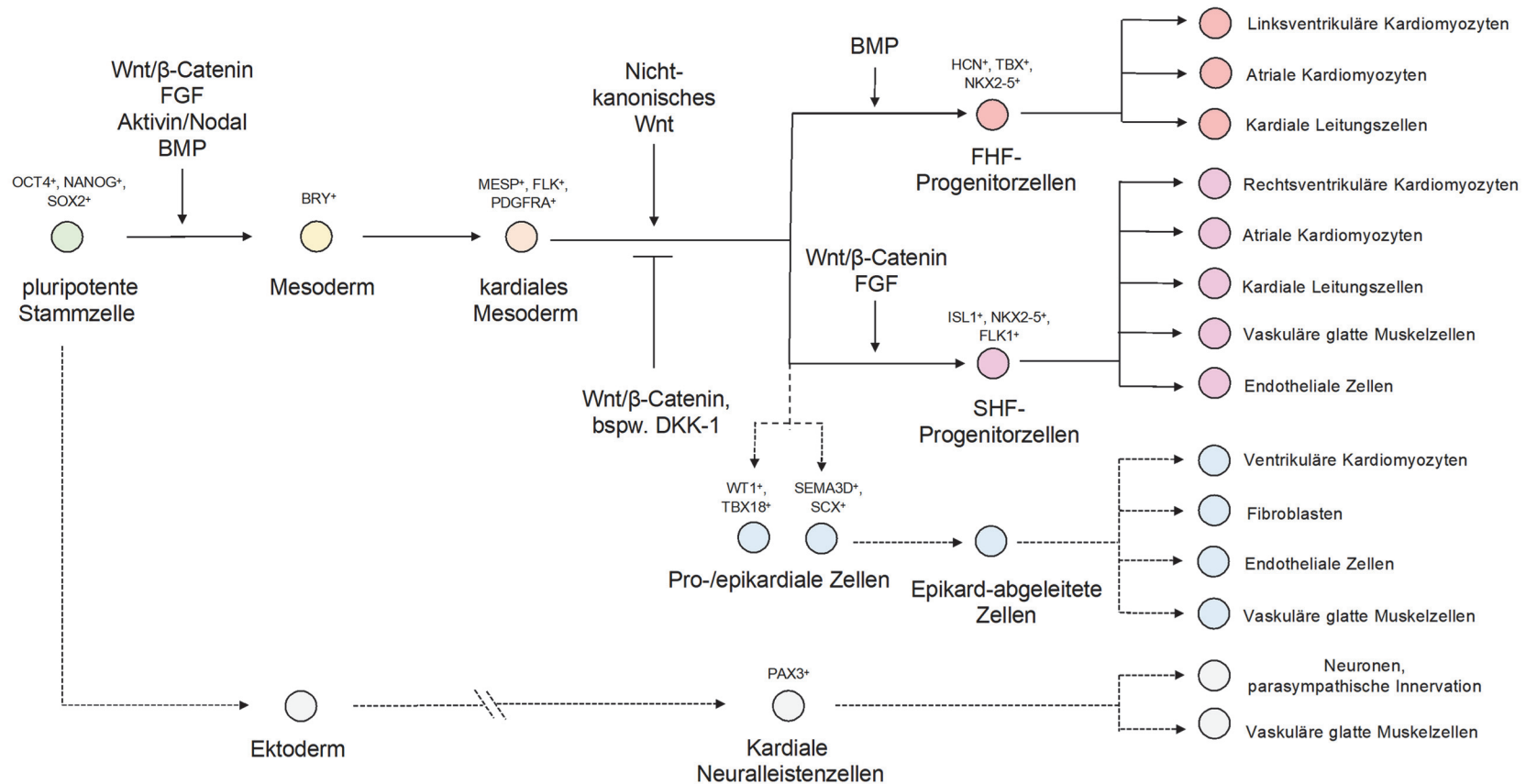


Abb. 4: Darstellung der Kardiomyogenese (modifiziert nach Später et al. 2014; Sahara et al. 2015).

Aufgezeigt ist die Differenzierung pluripotenter Stammzellen, die sich nach der Bildung des Mesoderms und des kardialen Mesoderms über das Stadium der kardialen Progenitorzellen des ersten (FHF) und zweiten (SHF) Herzfeldes zu maturaen, spezialisierten Herzzellen entwickeln. Neben den beiden Herzfeldern entwickelt sich das proepikardiale Organ zum Epikard und kardiale Neuralleistenzellen tragen zur Entstehung des kardialen Ausflusstraktes bei. An der Kardiomyogenese sind verschiedene Signalwege und molekulare Marker beteiligt. Hierzu zählen vor allem der BMP-Signalweg, der die Herzmesodermbildung induziert und zur Bildung des FHF beiträgt sowie der Wnt/β-Catenin-Signalweg, der die Entwicklung des SHF reguliert. Zudem stellt das nach der Gastrulation durch den Wnt-Inhibitor Dickkopf-1 (DKK-1) unterdrückte β-Catenin-Signal einen essentiellen Schritt zur weiteren Herzspezifikation im Mesoderm dar. Aktivin und Nodal sind insbesondere in der frühen Phase an der Mesodermbildung beteiligt, ebenso wie der FGF-Signalweg, der zudem für die SHF-Entwicklung von Bedeutung ist. **Abkürzungen:** BMP, knochenmorphogenetisches Protein; BRY, Brachyury; DKK-1, Dickkopf-1; FGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor; FLK, fetale Leberkinase; HCN, Hyperpolarization Activated Cyclic Nucleotide Gated Potassium Channel 1; ISL, Insulin gene enhancer protein; MESP, Mesoderm posterior Protein; NANOG, NANOG Homeobox; NKX2-5, NK2 Homeobox 5; OCT4, Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4; PAX, Paired Box; PDGFRA, Thrombozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Alpha; SCX, Scleraxis BHLH Transcription Factor; SEMA3D, Semaphorin 3D; SOX2, SRY-box transcription factor 2; TBX, T-Box Transkriptionsfaktor; Wnt, Wingless-related integration site; WT1, Wilms-Tumor-Protein.

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit bedeutenden Signaltransduktionswege beschrieben (**Kap. 2.3.1.1.** und **2.3.1.2.**).

2.3.1.1. Bedeutung des TGF β -/BMP-Signalweges

Der TGF β -/BMP-Signalweg ist unverzichtbar aufgrund seiner Beteiligung an der Gastrulation und Mesodermbildung. Zudem ist er an der Bildung des FHF beteiligt und trägt zur Proliferation der Kardiomyozyten sowie zur Förderung der Herzspezifikation, Myokarddifferenzierung und vermutlich auch zur Myokardreifung bei. Hierbei sind insbesondere BMP-2 und BMP-4 beteiligt (Schultheiss et al. 1997; Shi et al. 2000; Tirosh-Finkel et al. 2006; Klaus et al. 2007). Zur TGF β -Superfamilie zählen außerdem Nodal und Activin (Act), die zur Gastrulation, Mesodermbildung und kardialen Myogenese beitragen (Stern et al. 1995; Ben-Haim et al. 2006; Samuel und Latinkić 2009). Die Aktivierung der TGF β -/BMP-Signalgebung erfolgt nach der in **Abb. 5** dargestellten Signalkaskade. Letztendlich kommt es im Nukleus zur Transkription spezifischer Zielgene, zu denen GATA Binding Protein 4 (GATA4) und NK2 Homeobox 5 (NKX2-5) zählen (Schultheiss et al. 1997; Jamali et al. 2001).

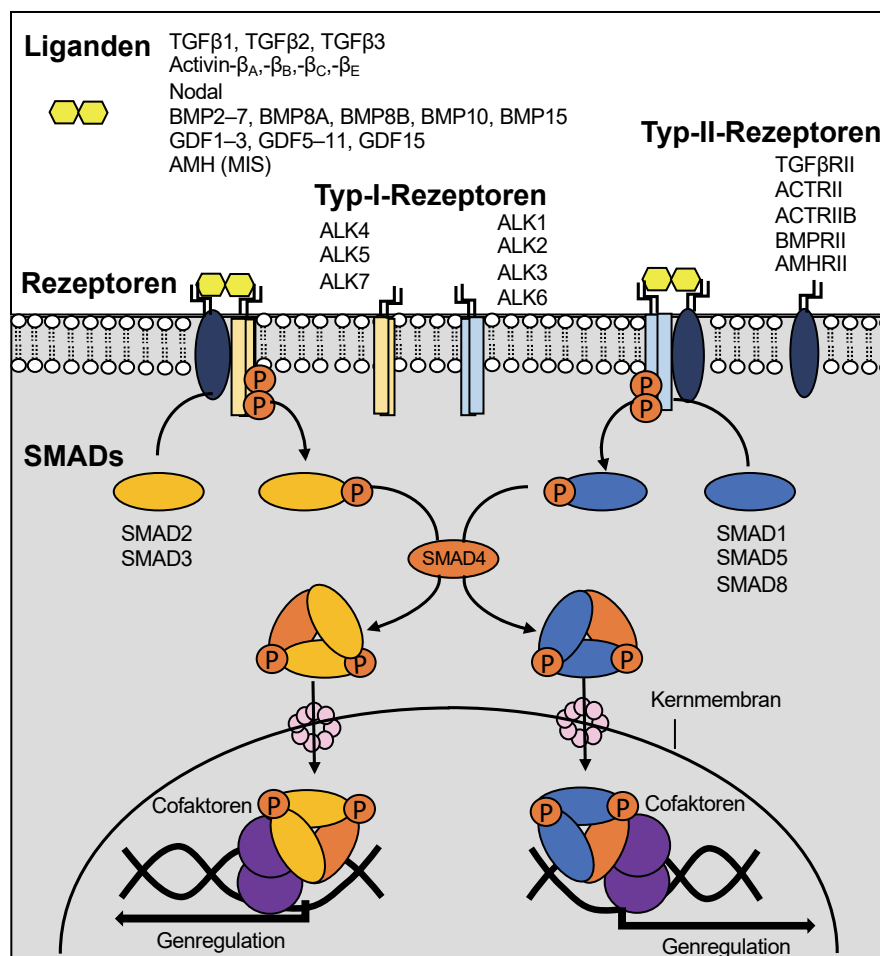


Abb. 5: Schematische Darstellung der TGF β -/BMP-Signalgebung (modifiziert nach Schmierer und Hill 2007).

Ad Abb. 5: Die Bindung der Liganden, die sich in SMAD1-, SMAD5-, SMAD8-aktivierende (z.B. BMPs) sowie SMAD2- und SMAD3-aktivierende Liganden (z.B. Activine) unterteilen lassen, erfolgt an den Typ-II-Rezeptor, der wiederum die Tyrosin-Kinase-Domäne des Typ-I-Rezeptors phosphoryliert und zugleich aktiviert. Im Einzelnen werden SMAD1, SMAD5 und SMAD8 durch die Activin Rezeptor-ähnliche Kinase (ALK)1, ALK2, ALK3 und ALK6 sowie SMAD2 und SMAD3 durch ALK4, ALK5 und ALK7 phosphoryliert. Es erfolgt eine Interaktion der phosphorylierten SMAD-Proteine mit SMAD4 und nach Translokation in den Nukleus und Bindung an die DNA unter Zuhilfenahme von Cofaktoren die Transkription spezifischer Zielgene. **Abkürzungen:** ACTRII: Activin Typ-II-Rezeptor; ACTRIIB: Activin Rezeptor Typ IIB; ALK: anaplastische Lymphomkinase; AMH: Anti-Müller-Hormon; AMHRII: Anti-Müller Hormon-Rezeptor; BMP: knochenmorphogenetisches Protein; BMPRII: knochenmorphogenetischer Protein Rezeptor Typ 2; GDF: growth differentiation factor; MIS: Müllerian inhibiting substance; P: Phosphorylierung; SMAD: suppressor of mothers against decapentaplegic; TGF: transforming growth factor; TGF β RII: transforming growth factor β receptor II.

2.3.1.2. Bedeutung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

Beim Wnt-/ β -Catenin-Signalweg können drei Signalwege unterschieden werden (Krishnamurthy und Kurzrock 2018; Zhu et al. 2021; Liu et al. 2022), wobei im Folgenden ausschließlich der kanonische (klassische) Wnt-/ β -Catenin-Signalweg beschrieben wird. Dieser Signalweg ist vor der Gastrulation an der Induktion des primitiven Mesoderms beteiligt (Barrow et al. 2007). Nach der Gastrulation hingegen ist eine Inhibition der Signale zur weiteren Spezifikation des kardialen Mesoderms nötig, die über die Inhibitoren Dickkopf-1 (DKK-1) oder das secreted Frizzled-related protein erfolgen kann (Kawano und Kypta 2003; Foley und Mercola 2005). Im SHF wird der kanonische Wnt-/ β -Catenin-Signalweg wiederum aktiviert, wobei er für die Proliferation von SHF-Progenitorzellen essentiell ist (Cohen et al. 2007; Lin et al. 2007). Die Signalkaskade des kanonischen Wnt-/ β -Catenin-Signalweges ist in **Abb. 6** nach Inhibition mit DKK-1 sowie bei Anwesenheit der Wnt-Liganden (z.B. Wnt1, Wnt3a, Wnt8) aufgezeigt. Zu den im Nukleus exprimierten Wnt-spezifischen Zielgenen gehören insbesondere die frühkardialen Transkriptionsfaktoren der SHF-Progenitorzellen, darunter FGF-10 (Cohen et al. 2007), ISL LIM Homeobox 1 (Cohen et al. 2007; Lin et al. 2007), der Gap Junction-Marker Connexin-43 (Ai et al. 2000) und MYC (Jackson et al. 1990). FGFs tragen innerhalb der Kardiomyogenese gemeinsam mit Wnt-/ β -Catenin, BMP, Act und Nodal zur Mesoderminduktion bei und sind an der Differenzierung und Spezifizierung von SHF-Progenitorzellen beteiligt (Ben-Haim et al. 2006; Ai et al. 2007; Klaus et al. 2007; Park et al. 2008).

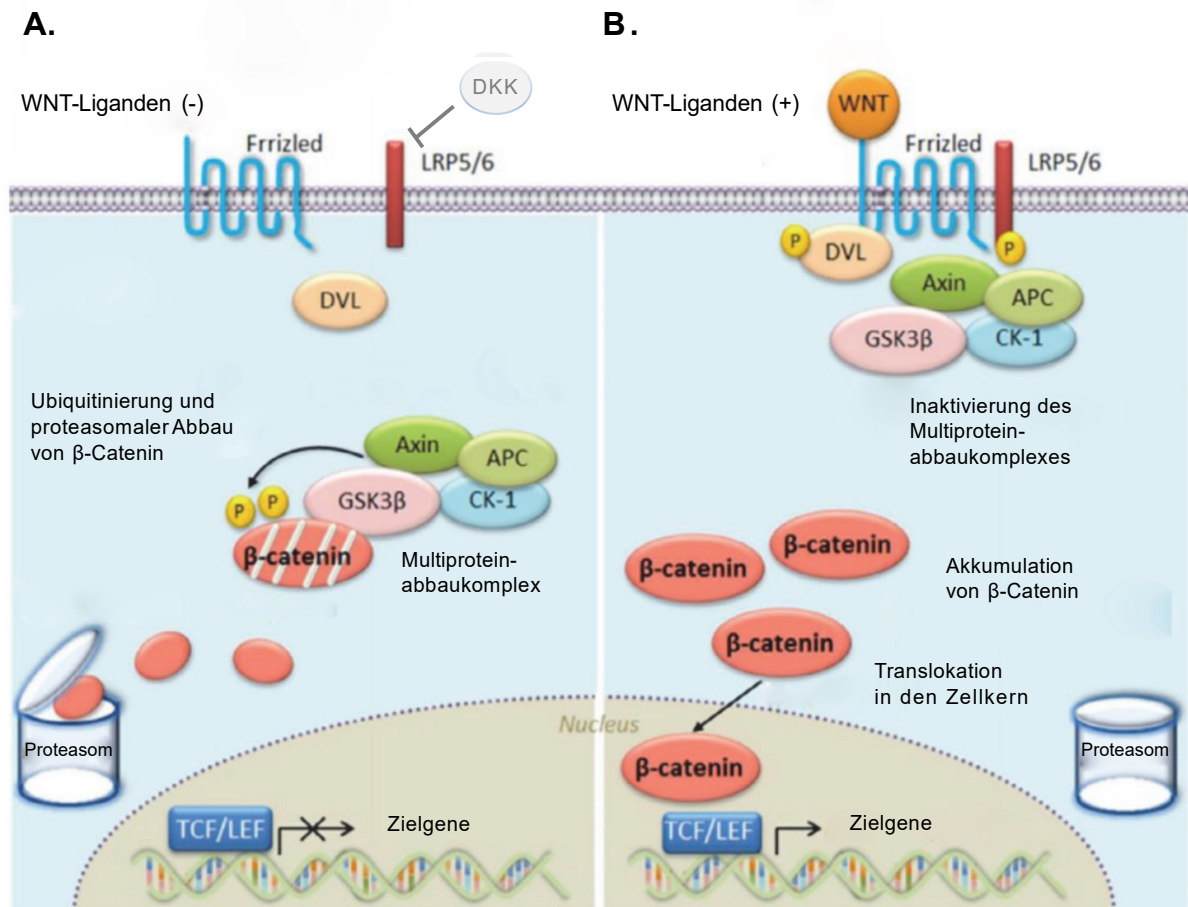


Abb. 6: Klassischer, kanonischer Wnt/β-Catenin-Signalweg (modifiziert nach Zhu et al. 2021).

A. Bei Abwesenheit von Wnt-Liganden oder bei Inhibition von LRP5/6, beispielsweise durch Dickkopf (DKK), wird β-Catenin von dem aus Axin, APC, CK-1 und GSK3β bestehenden Degradationskomplex rekrutiert. Nach Phosphorylierung durch CK-1 oder GSK3β wird es von der E3-Ubiquitinligase β-TrCP erkannt und schließlich abgebaut. Eine Transkription Wnt-spezifischer Zielgene kann nicht erfolgen. **B.** Bindet allerdings ein Wnt-Ligand an das komplexierte Frizzled und LRP5/6, wird der Multiproteinabbaukomplex inaktiviert, indem er zur Plasmamembran transloziert und an Frizzled bindet. Das nicht-degradierte β-Catenin kann in den Nucleus translozieren. Nach Komplexbildung mit LEF und TCF kommt es zur Expression Wnt-spezifischer Zielgene. **Abkürzungen:** APC: adenomatous polyposis coli, CK-1: Casein kinase-1, DKK: Dickkopf, DVL: Dishevelled, GSK3β: Glycogen synthase kinase 3β, LEF: Lymphoid enhancer-binding factor, LRP: low density lipoprotein receptor-related proteins 5/6, P: Phosphorylierung, TCF: T-cell factor, WNT: Wingless-related integration site, β-TrCP: β-transducin repeat-containing protein.

2.3.2. Kardiomyogene Differenzierungsprotokolle *in vitro*

Die in verschiedenen Studien beschriebenen Induktionsprotokolle machen sich die Signalwege und Transduktionsfaktoren der Kardiomyogenese zu Nutze, um MSCs, ESCs und iPSCs *in vitro* in CLCs zu differenzieren (Später et al. 2014). Eine kardiomyogene Differenzierung wurde bereits bei verschiedenen Spezies, darunter Menschen (Yang et al. 2012; Hasani et al. 2020), Nagern (Carvalho et al. 2013; Jiang et al. 2018; Ibarra-Ibarra et al. 2019) und Kaninchen (Rangappa et al. 2003) nachgewiesen. Es können verschiedene Differenzierungsstrategien angewendet werden (**Abb. 7.A., Seite 22**), darunter der Einsatz

exogener, pro-kardiogener Induktoren wie der TGF- β -Superfamilie mit und ohne Cofaktoren (Mohanty et al. 2013; Kakkar et al. 2019; Ramesh et al. 2021). Beispielsweise exprimieren mit BMP-2 und Salvianolsäure B (72 h Inkubation) behandelte BM-MSCs (Lv et al. 2017) oder mit BMP-4 und dem Vascular Endothelial Growth Factor VEGF (96 h Inkubation) behandelte ASCs der Ratte kardiale Marker (Ibarra-Ibarra et al. 2019). Weitere Protokolle hierzu werden in **Kap. 5.7.2.** beschrieben. Humane pluripotente Stammzellen können mithilfe der Induktionsfaktoren Act A (24 h Inkubation) und BMP-4 (Inkubation für 4 Tage) in kontrahierende Kardiomyozyten differenzieren (Laflamme et al. 2007; Yang et al. 2008; Paige et al. 2010), wobei die Hinzugabe von DKK-1 eine Optimierung zu diesem Protokoll darstellt (Yang et al. 2008; Paige et al. 2010). Ebenso können murine MSCs mithilfe des Transformationsfaktors DKK-1 (Palpant et al. 2007) oder der Kombination von BMP-4 und 5-Azacytidin (5-AZA) (Jiang et al. 2018) in CLCs differenziert werden. Khaleghi et al. (2014) wiesen nach, dass mit niedrigen BMP-4-Konzentrationen (10 bzw. 20 ng/ml) induzierte MSCs vermehrt in atriale CLCs differenzieren, während hingegen höhere BMP-4-Konzentrationen (50 ng/ml) vermehrt ventrikuläre CLCs generieren (Khaleghi et al. 2014). 5-AZA stellt den am häufigsten eingesetzten kardialen Induktionsfaktor dar (Kakkar et al. 2019) und fungiert als epigenetischer Modifikator und DNA-Demethylierungsmittel. Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und des Differenzierungsvermögens der Zellen. Das Genom undifferenzierter Zellen ist hochmethyliert, während hingegen das Genom sich differenzierender Zellen zunehmend demethyliert wird (Safwani et al. 2012; Gupta et al. 2021). Innerhalb des Wnt/ β -Catenin-Signalweges (**Kap. 2.3.1.2.**) soll 5-AZA zudem die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3 β) unspezifisch aktivieren. In Folge dessen wird die kardiomyogene Differenzierung zusätzlich gefördert (Cho et al. 2009). Neben 5-AZA kommen als chemische Induktoren Ascorbinsäure (Takahashi et al. 2003; Ding und Schultz 2004), Dimethylsulfoxid (Jasmin et al. 2010), Trichostatin A (Lim et al. 2013) oder Oxytocin (Hatami et al. 2007) als niedermolekulare Verbindungen (engl. small molecules) zum Einsatz, ebenso wie MikroRNAs (Chen et al. 2018). Gerüstsubstanzen können die kardiomyogene Differenzierung zusätzlich fördern (Van Dijk et al. 2008). Überdies wurde der Einsatz mechanischer und elektrischer Stimulation beschrieben (Crowder et al. 2013; Cao et al. 2018; He et al. 2019).

und kardiales Troponin exprimiert (Potter und Gergely 1974; Jumabay et al. 2010; Paoletti et al. 2018). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten kardialen Marker und ihre Funktionen werden im Folgenden beschrieben.

GATA-4 gehört zu den Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren und stellt einen Schlüsselfaktor und Regulator der embryonalen Kardiomyogenese dar (Kelley et al. 1993; Jiang und Evans 1996). Es wird in kardialen Progenitorzellen exprimiert (Zhao et al. 2008) und löst gemeinsam mit *Baf60c*, *TBX5* und *NKX2-5* die kardiale Differenzierung nicht-kardialen Mesoderms aus (Takeuchi und Bruneau 2009). **NKX2-5** ist folglich ebenso unverzichtbar für die kardiale Differenzierung. Es wird kardial, aber auch extrakardial exprimiert (Kasahara et al. 1998). Gemeinsam mit *GATA4* und weiteren Kofaktoren ist *NKX2-5* an der Sarkomerbildung und -kontraktion beteiligt (Linhares et al. 2004; Armiñán et al. 2009). Herzmuskelspezifische Promotoren werden unter Mitwirkung von Myokardin, BMP-2, BMP-4 und des Serum-Response-Faktors aktiviert (Ueyama et al. 2003; Callis et al. 2005; Balza und Misra 2006), woraufhin es zur Expression myokardialer Marker wie α -kardiales Aktin, kardiales Troponin, Titin und Myosin-Schwerketten (engl. myosin heavy chain, MHC) kommt (Van Der Loop et al. 1992).

Myosin wird sowohl in den frühen Stadien der Kardiomyogenese als auch im adulten Herzen exprimiert (Lompré et al. 1984; Sheikh et al. 2015) und setzt sich aus zwei Paaren leichter (engl. myosin light chain, MLC) und einem Paar schwerer Ketten (MHC) zusammen (Warrick und Spudich 1987). Sarkomere MHC interagieren durch zyklische Wechselwirkungen der Kopfdomänen mit Aktinfilamenten (Gleitfilamenttheorie). Es kommt zu einer Querbrückenbildung zwischen Aktin und Myosin und die Kontraktion der Myofibrillen wird ausgelöst (Hanson und Huxley 1953; Huxley 1965). Demgegenüber sind MLC an der Feinregulation der myokardialen Kontraktion beteiligt (England und Loughna 2013). Sowohl von MLC als auch MHC lassen sich verschiedene Isoformen unterscheiden (Lowey et al. 1993; England und Loughna 2013). Das Gen **MYH6** (engl. myosin heavy chain 6) kodiert für α -MHC und wird auch als *atriales MHC* bezeichnet. Während es im Verlauf der Kardiomyogenese neben den Vorhöfen auch in den Ventrikeln exprimiert wird, nimmt diese Expression im adulten Herzen ab, sodass α -MHC vorwiegend in den Atrien exprimiert wird. Das Gen **MYH7** (engl. myosin heavy chain 7) kodiert für β -MHC (ventrikuläres MHC) und wird vorwiegend in den Ventrikeln sowohl des fötalen als auch des adulten Herzens exprimiert, aber auch im Skelettmuskel (Wessels et al. 1991; Reiser et al. 2001; England und Loughna 2013).

Troponin lässt sich in drei Proteinkomponenten unterteilen, die inhibitorische Untereinheit kardiales Troponin I (engl. cardiac troponin I, cTnI), das Calcium-bindende Troponin (cTnC) und die an Tropomyosin bindende Untereinheit (cTnT), die zusammen den Troponin-Komplex

bilden (Sasse et al. 1993). Dieser Komplex ist ebenso an der Aktin-Myosin-Interaktion des kontraktiven Apparates beteiligt und ermöglicht durch Freilegen der Myosin-Bindungsstellen eine Bindung des Myosinköpfchens an Aktin. Bei cTnI lassen sich drei Isoformen unterscheiden, die entweder in schnellen (TnI_f, engl. fast) oder langsamen Skelettmuskelfasern (TnI_s, engl. slow) oder im Herzmuskel (TnI_c, engl. cardiac) vorliegen (Syska et al. 1974; Wilkinson und Grand 1978). Das ausschließlich im Herzmuskel exprimierte Protein TnI_c wird durch das Gen **TNNI3** reguliert und gilt als spezifischer kardialer Marker (Sasse et al. 1993; Bhavsar et al. 1996).

2.4. Die kardiale Elektrophysiologie des Pferdes und Notwendigkeit speziesspezifischer *in-vitro*-Modelle

Im Vergleich zu anderen Spezies, inklusive des Menschen, weist das Pferdeherz (patho-)physiologische Besonderheiten bzw. eine speziesspezifische Elektrophysiologie auf (Van Der Vekens et al. 2013). Anatomisch gesehen bestehen insofern Unterschiede im Erregungsleitungssystem, als sich Purkinje-Fasern bei Menschen, Fleischfressern und Primaten im subendokardialen Myokard befinden (Typ I), während hingegen sich diese bei Pferden, Schweinen, Wiederkäuern und den meisten anderen Tierarten über das gesamte Myokard erstrecken (Typ II). Dies hat Auswirkungen auf die Ausbreitung und Aktivierung der elektrischen Aktivität. Typ II resultiert in einer effizienteren und relativ kurzen ventrikulären Erregung gegenüber Typ I (Oosthoek et al. 1993; Hamlin 2010; Van Der Vekens et al. 2013). Ein weiterer Unterschied besteht in der Dauer des Aktionspotentials, die beim Pferd deutlich länger ist (Franz et al. 1988; Pedersen et al. 2015) und insbesondere die Repolarisation betrifft (Pedersen et al. 2013). Bei Nagern begünstigt eine Verlängerung des Aktionspotentials die Entstehung von Extrasystolen (engl. early after depolarisation, EAD). Eine übermäßig lange Repolarisationsdauer kann Torsade-de-Pointes-Tachykardien verursachen (Guo et al. 2008). Es treten jedoch beim Pferd trotz langer QT-Strecke weder vermehrt EAD noch Torsade-de-Pointes-Tachykardien auf. Zudem weisen Pferde eine ausgeprägte Adaption der Herzfrequenz an die Leistung auf (Courouze et al. 1999), wobei die Dauer der Repolarisation angepasst wird (Finley et al. 2003). Das Pferd besitzt eine weite Herzfrequenzspanne mit Ruheherzfrequenzen von 27 bis 44 Schlägen bis zu 240 Schlägen pro Minute (min) unter maximaler Belastung (Marsland 1968). Interspezies-Unterschiede sind insbesondere bei den an der ventrikulären Repolarisation beteiligten Kalium-Ionenströmen beschrieben (Varró et al. 1993; Finley et al. 2003; Pedersen et al. 2013). Aufgrund der Besonderheiten der equinen Elektrophysiologie werden beim Pferd zusätzlich stabilisierende Kaliumkanäle vermutet (Finley et al. 2003). Dies macht die Entwicklung speziesspezifischer Modelle notwendig (**Kap. 2.2.1.**), die auch der Übertragung neuer Therapieansätze aus der Human- in die Veterinärmedizin und umgekehrt von Nutzen sein können (Van Der Vekens et al. 2013).

Verschiedene *in-vitro*-Modelle stehen für elektrophysiologische Untersuchungen beim Pferd zur Verfügung, darunter die Untersuchung heterogen exprimierter, herzspezifischer Ionenkanäle in Säugetierzellen (z.B. die CHO-K1-Zelllinie des Hamsterovars) und *Xenopus laevis*-Oozyten (Pedersen et al. 2015; Trachsel et al. 2018; Calloe et al. 2019). Hierbei kommen Patch-Clamp- und Zwei-Elektroden Voltage-Clamp Techniken zum Einsatz, wobei die Expression nur eines Kanals untersucht wird. Als weitere Möglichkeit sind Untersuchungen direkt am Herzmuskelpräparat zu nennen (Pedersen et al. 2015). Diese Modelle spiegeln die physiologischen Gegebenheiten allerdings nur ungenügend wider bzw. ist das Ausgangsmaterial oft schwer zu gewinnen. Des Weiteren können messtechnische Schwierigkeiten auftreten (Fozzard und Beeler Jr 1975; Pedersen et al. 2015; Trachsel et al. 2022).

2.5. Zusammenfassung der Literaturrecherche

Aus der Literaturrecherche wird deutlich, dass multipotente MSCs eine vielversprechende Zellquelle nicht nur für die regenerative Medizin, sondern auch für die Etablierung von speziesspezifischen *in-vitro*-Modellen darstellen. ASCs werden i.d.R. aus dem leicht zugänglichen WAT mittels des Kollagenaseverdaus oder des Explantat-Verfahrens gewonnen und weisen ein hohes Proliferationspotential auf. Die Zellen können über die ISCT-Kriterien eindeutig als MSCs identifiziert werden, zu denen die Untersuchung des speziesspezifischen CD-Markerprofils, des tripotenten Differenzierungspotentials und der Fähigkeit der Plastikadhärenz gehören. In verschiedenen Studien kommen unterschiedliche Labormethoden und -protokolle für die Isolierung und Kultivierung von MSCs verschiedener Gewebequellen zum Einsatz, die direkt Auswirkungen auf die Zellausbeute, das Proliferations- und Differenzierungspotential der Zellen haben. Zudem existieren Interspezies- und Interdonorvariabilitäten (Heterogenität der MSCs). Das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs wurde für verschiedene Spezies, nicht jedoch das Pferd, *in vitro* nachgewiesen. Hierbei kommen verschiedene Induktionsfaktoren zum Einsatz, die innerhalb der embryonalen Kardiomyogenese beteiligt sind. Dazu zählen insbesondere die am TGF β -/BMP- und Wnt-/ β -Catenin-Signalweg beteiligten Faktoren sowie 5-AZA als der am häufigsten eingesetzte kardiomyogene Induktor. Eine stattgefundenene kardiomyogene Differenzierung wird über zellmorphologische Veränderungen und die Expression myokardialer Marker nachgewiesen. Da sich die equine kardiale Elektrophysiologie von der Elektrophysiologie anderer Spezies unterscheidet, wäre ein speziesspezifisches *in-vitro*-Kardiomyozyten-Modell beim Pferd eine wertvolle Ergänzung. Aus der Literaturrecherche geht hervor, dass ASCs ein vielversprechender Ansatz für die Etablierung eines solchen *in-vitro*-Modells darstellen könnten.

3. Material und Methoden

Nach der Isolierung und Kultivierung der Präadipozyten folgte eine Analyse des Isolierungserfolgs, der Proliferationsfähigkeit und des für die Kultivierung am besten geeigneten Serumsupplements. Die Zellen wurden hinsichtlich des tripotenten Differenzierungspotentials und der immunphänotypischen Charakteristika untersucht. Danach erfolgte in zwei Versuchsteilen die Untersuchung des Differenzierungspotentials in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CLCs). Der Effekt verschiedener Induktionsfaktoren auf die Zellen wurde morphologisch und molekularbiologisch mittels SYBR Green quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR) überprüft, wofür zuvor eine Etablierung der RT-qPCR erfolgte (Versuchsablauf siehe **Abb. 8**). Die eingesetzten Materialien inkl. Herstellerangaben sind im **Anhang in Kap. 9.1.** gelistet. Bei den nachfolgend aufgeführten Konzentrationsangaben der Chemikalien handelt es sich um Endkonzentrationen.

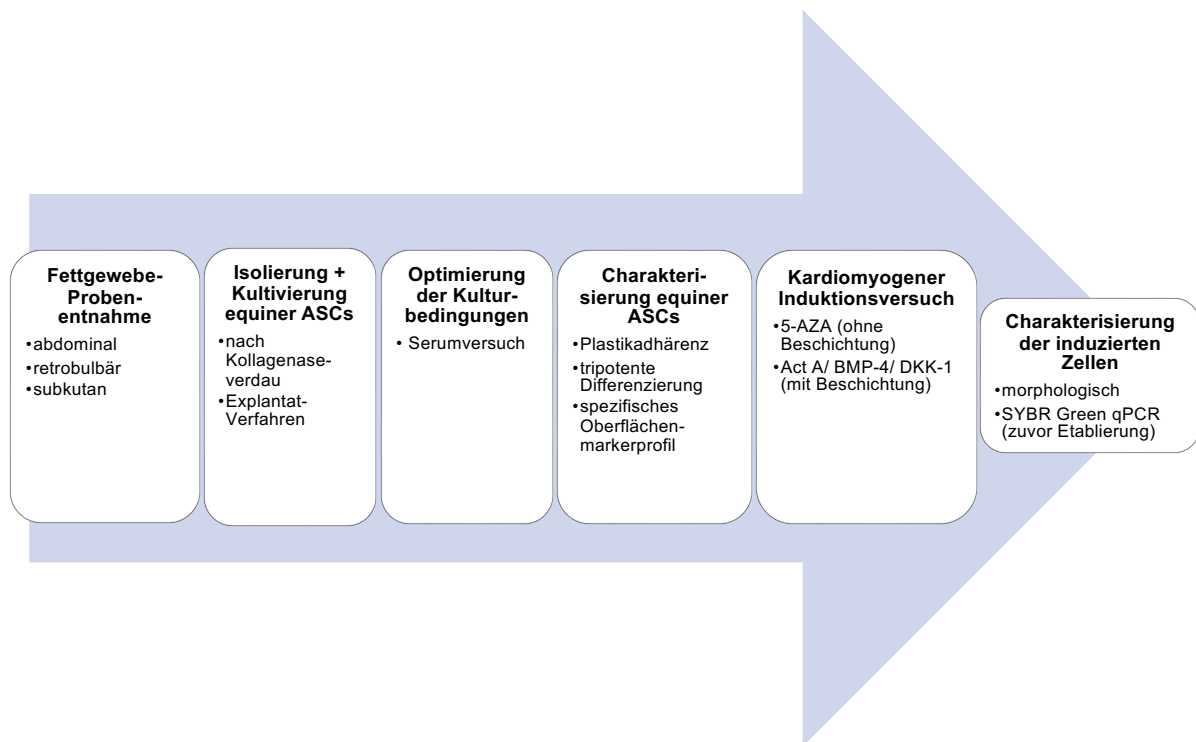


Abb. 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.
Nähere Erläuterungen werden im Text gegeben.

3.1. Pferde und Probenentnahme

Es wurden $n = 16$ Pferde im Zeitraum von August bis September 2021 nach Euthanasien an der Klinik für Pferde der Freien Universität (FU) Berlin ($n = 12$) oder Schlachtungen in kommerziellen Schlachthöfen in Deutschland beprobt ($n = 4$) und abdominales (abd), retrobulbäres (rb) und subkutanes (sc) Fettgewebe maximal 8 h *post mortem* entnommen. Beim abd-Fettgewebe handelte es sich um subseröses Fett, welches aus der *Tela subserosa* des Peritoneums paramedian zur *Linea alba* nach Inzision der Epidermis, Dermis und Subkutis mit dazugehörigem Unterhautfettgewebe und des geraden Bauchmuskels (*Musculus (M.) rectus abdominis*) gewonnen wurde (ca. 9 g). In der Augenhöhle (*Orbita*) lokalisiertes rb-Fettgewebe wurde nach transpalpebraler Eukleation des Augapfels (*Bulbus oculi*) entnommen (ca. 6 g). Hierzu wurden zwei ellipsoide Inzisionen an Ober- und Unterlid gesetzt, das mediale *Ligamentum palpebrale* sowie die laterale palpebrale Raphe durchtrennt. Nach Transsektion der Unterhaut, der extraokulären Muskulatur, des *M. retractor bulbi* und des *Nervus opticus* (Sehnerv) erfolgte die *en-bloc*-Entnahme des *Bulbus oculi* mitsamt der Nickhaut, Konjunktiva, Augenlider und des rb-Fettkörpers. Sc-Fettgewebe (ca. 9 g) wurde im Bereich lateral des Schweifansatzes nach Hautinzision oberhalb des *M. glutaeus superficialis* entnommen. Alle Proben wurden unter (nahezu) sterilen Bedingungen gewonnen. Vorausgegangen war ein Vorversuch mit einem Studienkollektiv von $n = 20$ Pferden im Zeitraum von August 2019 bis Juli 2021 (siehe **Anhang, Kap. 9.8.**). Es wurden Pferde verschiedener Rassen, unterschiedlichen Geschlechts (Stute, Wallach, Hengst) und Alters beprobt (Pferdeliste siehe **Anhang, Kap. 9.2.**). Die Tötung der Tiere stand nicht in Zusammenhang mit der Studie und die Probenentnahme fand in Übereinstimmung zum deutschen Tierschutzgesetz statt (StN 008/20–IV C 10).

3.2. Probenaufbereitung

Nach Entnahme des Fettgewebes wurde dieses einmal in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) mit Kalzium und Magnesium (DPBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, Fa. Sigma Aldrich) gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung im Labor des Institutes für Veterinär-Physiologie der FU Berlin für 2 bis 8 h in auf 4°C vorgekühlte Pufferlösung gelagert. Die Pufferlösung war mit 4% Penicillin-Streptomycin (400 U/ml und 400 µg/ml, Fa. Sigma Aldrich) sowie mit 2% Amphotericin B (5 µg/ml, Fa. Biowest) supplementiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff, woraufhin die Fettgewebeproben von makroskopisch sichtbaren Blutgefäßen befreit und in ca. 2 x 2 x 2 mm kleine Fettgewebestücke geschnitten wurden.

3.3. Zellkultur – Isolierung und Kultivierung equiner ASCs

3.3.1. Isolierung equiner ASCs

Es folgte die Isolierung equiner ASCs mithilfe zwei verschiedener Isolationsmethoden, dem Kollagenaseverdau und dem direkten Explantationsverfahren. Für die erstgenannte Methode wurde das Fettgewebe für 1 h bei 37°C mit einer 0,1% Kollagenase Typ 1 Lösung (1 mg/ml; Fa. Life Technologies GmbH) unter regelmäßigem leichtem Schütteln verdaut und über einen 100 µm-Zellfilter bei 260 x g und Raumtemperatur (RT) für 5 min zentrifugiert (Beschleunigung 2, Bremse 0). Die sich nach der Zentrifugation im Zellpellet befindliche stromale Gefäßfraktion (SVF) wurde in Dulbecco's Modifiziertes Eagle's Medium mit hohem Glukoseanteil (DMEM, 4500 mg/l Glukosegehalt, Fa. Life Technologies GmbH), ergänzt um 20% fetales Kälberserum (FKS; Fa. Sigma Aldrich), 1% Penicillin-Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml; Fa. Sigma Aldrich), 1% Amphotericin B (2.5 µg/ml; Fa. Biowest) und HEPES (15 mM; Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG) aufgenommen (Basalmedium, B-M; siehe **Anhang, Kap. 9.3., Tab. 25.**) und in 75 cm² Zellkulturflaschen ausgesät. Die Inkubation erfolgte unter Standardkulturbedingungen bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Demgegenüber wurden beim direkten Explantationsverfahren die Fettgewebeblöcke direkt auf 12-Well-Zellkulturtestplatten (Fa. TPP Techno Plastic Products AG) aufgelegt. Eine Inkubation erfolgte in 200 µl B-M, sodass sich die Zellen am Boden der Zellkulturgefäße anheften konnten. Nach dem Auswachsen der ASCs-_{EXP} aus den Explantaten wurden die Fettgewebeblöcke entfernt und die Zellen unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank weiter kultiviert. Mediumwechsel (MW) erfolgten bei beiden Verfahren alle zwei bis drei Tage.

3.3.2. Messung des Isolierungserfolgs

Der Isolierungserfolg der aus den abd-, rb- und sc-Fettgeweben gewonnenen ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} ($n = 16$ Tiere) wurde mittels eines binären Bewertungssystems analysiert. Dazu wurden Punkte für jede einzelne Isolierung der Passage (P) 0-Zellen vergeben, 0 Punkte für eine nicht-erfolgreiche Isolierung (Nichtanwachsen der Zellen) und 1 Punkt für eine erfolgreiche Isolierung (Anwachsen der Zellen). Auftretende Kontaminationen der Zellen mit Bakterien oder Hefen wurden aus den Versuchen ausgeschlossen. Während die Punktevergabe bei den isolierten ASCs-_{SVF} pro Kondition und einzelner 75 cm² Zellkulturflasche erfolgte, wurden bei der Explantat (EXP)-Methode die 12 Wells der Zellkulturtestplatten pro Kondition in der Bewertung als Gesamt-Score zusammengefasst.

3.3.3. Passagieren

Die isolierten, plastikadhärenten Zellen wurden beim Erreichen von 80–90% Konfluenz gesplittet. Dazu wurde der Monolayer nach Abpipettieren des Überstands einmalig mit DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Fa. Sigma Aldrich) gespült. Danach wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin/0.02% EDTA, Fa. Sigma Aldrich) nach zehnminütiger Inkubation im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen abgelöst, die Zellsuspension in Kulturmedium aufgenommen (Abstoppen der Trypsinierungsreaktion) und im Verhältnis 1:3 in neue 75 cm² Zellkulturflaschen überführt (P1). Ab der P1 wurde ein Kulturmedium analog zum B-M eingesetzt, wobei der FKS-Gehalt auf 10% FKS reduziert wurde (Expansionsmedium, E-M; Zusammensetzung siehe **Anhang, Kap. 9.3., Tab. 26**). Um eine ausreichende Zellzahl für die nachfolgenden Versuche zu generieren, wurden ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} weiter bis zur Passage 2 bzw. 3 expandiert und nach Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau (0,4%) und Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer (nach Freshney 2010) kryokonserviert.

3.3.4. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen aus den Passagen 2 bis 3 gemäß **Kap. 3.3.3.** von den Kulturgefäßen abgelöst und bei 300 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Einfriermedium (95% B-M + 5% Dimethylsulfoxid, DMSO, Fa. Sigma Aldrich) resuspendiert und die Zellkonzentration auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml-Einfrierröhrchen überführt. In den ersten 24 h wurden die Kryoröhrchen in einer Einfrierhilfe (Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter) bei –80°C gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff (Gasphase) bei –170°C kryokonserviert.

3.3.5. Messung des Proliferationspotentials

Zur Untersuchung des Proliferationspotentials der ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} der verschiedenen Lokalisationen wurden eine Zellwachstumskurve erstellt und die Populationsverdopplungszeit (PDT) ermittelt. Es wurden $n = 3$ Tiere in den Versuch einbezogen und pro Lokalisation und Isolationsmethode je 30.000 Zellen (P3) pro Well in zwei 12-Well-Zellkulturtestplatten in E-M ausgesät. Von Tag 1 bis 8 wurden die Zellen täglich nach 24 h Kultivierungszeit aus drei Wells trypsiniert (**Kap. 3.3.3.**), am automatisierten Zellzähler TC20™ nach Herstellerangaben (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) in Doppelbestimmung gezählt (3 Wells x 2 = 6 Zellzahlwerte) und der Mittelwert errechnet. Die PDT wurde täglich nach der **Formel 1** berechnet, wobei T0 den Startzeitpunkt, T den Endzeitpunkt der Kultur, N0 die Zellzahl an Tag 0 und Nt die Zellzahl am jeweiligen Messtag darstellte.

$$PDT = \frac{(T - T0) \lg 2}{\lg Nt - \lg N0} \quad (1)$$

3.3.6. Evaluierung geeigneter Serumsupplemente für die Kultivierung equiner Präadipozyten (Serumversuch)

Zur Ermittlung des für die Kultivierung und das Wachstumsvermögen der Zellen am besten geeigneten Serumsupplements wurden abd-ASC_{SVF} und abd-ASC_{EXP} der P2 und P3 von $n = 3$ Tieren an Tag 0 (Zeitpunkt T0) aufgetaut und über drei Wochen (bis zum Zeitpunkt T3) in DMEM-Medium mit entweder 10% FKS, 20% FKS, 10% Pferdeserum (engl. horse serum, HS) oder der Kombination aus 10% FKS und 10% HS kultiviert (Mediumzusammensetzungen siehe **Anhang, Kap. 9.3., Tab. 27**). Während der dreiwöchigen Kultivierungszeit wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80–90% i.d.R. zweimal passagiert (**Kap. 3.3.3.**). Die Effekte des Serums auf die Morphologie und das Zellwachstum wurden untersucht und mithilfe eines Punktevergabesystems bewertet. Dazu wurden für abd-ASC_{EXP} und abd-ASC_{SVF} jedes Tieres Punkte zu drei Zeitpunkten (nach dem Auftauen, dem ersten und zweiten Passagieren der Zellen) in sieben Kategorien vergeben (**Tab. 3**), zu einer Gesamtpunktzahl summiert und die verschiedenen Serumzusätze miteinander verglichen.

Tab. 3: Bewertungssystem zur Evaluierung geeigneter Serumzusätze.

	Kriterium	Beurteilung	Punkte
1.	Anwachsen der Zellen nach Auftauen bzw. Passagieren	nicht	0
		mäßig	1
		gut	2
2.	Vorhandensein von Mitosen	keine	0
		wenige	1
		viele	2
3.	Vorhandensein atypischer Zellen	ja	0
		nein	1
4.	Auftreten von Zellablösung	hochgradig	0
		gering- bis mittelgradig	1
		keine	2
5.	Nachwachsen von Zellen nach Zellablösung	nein	0
		ja	0,5
		keine Zellablösung	1
6.	Auftreten von „Türmchen“	viele	0
		wenige	0,5
		keine	1
7.	Dauer bis zum Erreichen von 80–90% Konfluenz	wird nicht erreicht	0
		> 7 Tage	1
		≤ 7 Tage	2

3.4. Tripotentes Differenzierungspotential equiner ASCs

Zur Untersuchung des tripotenten Differenzierungspotentials wurden aus abd-Fettgewebe gewonnene ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} sowie aus rb- und sc-Fettgewebe isolierte ASCs_{-EXP} von jeweils $n = 6$ Tieren in zwei Versuchsdurchläufen adipogen, osteogen und chondrogen induziert. Dazu wurden die kryokonservierten Zellen (**Kap. 3.3.4.**) aufgetaut, durch Passagieren bis zum Erreichen einer für die Versuche ausreichenden Zellzahl vermehrt (**Kap. 3.3.3.**) und die Zellen der P5 bis P6 mithilfe der im **Anhang in Kap. 9.3. (Tab. 28–31)** aufgeführten Induktions- und Differenzierungsmedien induziert. Bei der adipogenen und osteogenen Differenzierung wurden die Zellkulturgefäße mit $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ murinem Laminin (Fa. Sigma Aldrich) beschichtet, um eine Ablösung der Zellen weitestgehend zu vermeiden (Hashimoto et al. 2006), die in vorangegangenen Versuchen beobachtet wurde. MW erfolgten alle zwei bis drei Tage. Es wurden nicht-induzierte Negativkontrollen (NK) mitgeführt.

3.4.1. Adipogene Differenzierung

3.4.1.1. Studiendesign

Pro Tier und Kondition (abd-ASCs_{-EXP}, abd-ASCs_{-SVF}, rb-ASCs_{-EXP} und sc-ASCs_{-EXP}) wurden 20.000 Zellen/ cm^2 in vier 25 cm^2 Zellkulturflaschen (5×10^5 Zellen/25 cm^2 Kulturflasche) und zwei 12-Well-Zellkulturtestplatten (38.000 Zellen/Well) ausgesät. Bei einer Konfluenz von 70–90% wurden die Zellen an Tag 0 mit einem adipogenem Induktionsmedium induziert und an Tag 3 mit einem adipogenen Differenzierungsmedium bis Tag 7 bzw. 14 differenziert.

3.4.1.2. Messung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Zur Überprüfung einer Differenzierung equiner ASCs in mature Adipozyten wurde die Aktivität des am Lipidstoffwechsel beteiligten Enzyms Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) gemessen. Dazu wurden die in 25 cm^2 -Kulturflaschen differenzierten Zellen an Tag 7 gewaschen, trypsinisiert und die induzierten Zellen aufgrund der starken Fetttröpfchenbildung bei $500 \times g$ und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ aufgenommen. Es folgte eine Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau (0,4%) und Zellzählung mittels des Zellzahlgerätes TC20™ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) nach Herstellerangaben. Nach erneuter Zentrifugation ($500 \times g$, 4°C , 5 min) der Zellsuspension, die 1×10^6 Zellen enthielt, wurde laut GPDH Assay Kit Protokoll (Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit, Fa. Abcam) vorgegangen. Das in der Probe enthaltende GPDH reagierte mit dem im Reaktionsmix enthaltenden GPDH-Substrat. Es wurde ein Zwischenprodukt gebildet, das eine GPDH-Sonde (farblos) zu einem farbigen Produkt reduziert, das bei 450 nm mithilfe eines Multiplattenlesers (Tristar 3, Fa. Berthold Technologies GmbH & Co. KG) gemessen wurde. Messwerte wurden alle 60 s für 1 h

aufgezeichnet und im Anschluss mithilfe der Software Instrument Control and Evaluation (ICE) Research (Fa. Berthold Technologies GmbH & Co. KG) ausgewertet.

3.4.1.3. Adipogenese-Score

Die ersten an Tag 5 gebildeten Fetttröpfchen wurden mittels eines Bewertungssystems semiquantifiziert. Pro Tier und Kondition wurden Punkte vergeben (0 Punkte: keine, 1 Punkt: geringgradige, 2 Punkte: mittelgradige, 3 Punkte: hochgradige Bildung von Lipidtröpfchen), die zu einer Gesamtpunktzahl summiert wurden, sodass die Kondition mit der höchsten Adipogenese-Aktivität ermittelt werden konnte.

3.4.1.4. Messung der gebildeten intrazellulären Lipide

Zur Überprüfung des Vorhandenseins intrazellulärer Lipide erfolgte an Tag 14 eine Nilrot-Färbung (Färbeprotokoll siehe **Anhang, Kap. 9.4., Tab. 39**) der in 24-Well-Platten differenzierten Zellen. Zur Kernfärbung wurde DAPI eingesetzt. Die Visualisierung der Färbung erfolgte am Leica DMI 6000B Epi-Fluoreszenzmikroskop (Fa. Leica Microsystems GmbH) für Nilrot bei Anregungs-/Emissionswellenlängen von 480/530 nm (neutrale Lipide) bzw. bei 515/590 nm (Gesamtlipide) und für DAPI bei 360/470 nm (Kerne).

3.4.1.5. Messung der Lipid-Nuclei-Ratio

Der Fluoreszenz-Index von Nilrot (Lipid-Index) wurde mittels des 2300 EnSpire™ Multiplattenlesers (Fa. Perkin Elmer) bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 475/570 nm ermittelt, der Fluoreszenz-Index von DAPI (Nuclei-Index) bei 358/461 nm. Durch Division des Lipid- durch den Nuclei-Index wurde die Lipid-Nuclei-Ratio berechnet. Diese stellt die um die Zelldichte korrigierte Konzentration nicht-polarer Lipide dar und dient der Quantifizierung der adipogenen Differenzierung (Becker et al. 2021).

3.4.2. Osteogene Differenzierung

3.4.2.1. Studiendesign

Zur Untersuchung des osteogenen Differenzierungspotentials wurden die Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen und 24-Well-Zellkulturtestplatten ausgesät (20.000 Zellen/cm²) und bei 70–90% Konfluenz (T0) mit osteogenem Differenzierungsmedium bis Tag 14 bzw. 21 induziert und differenziert.

3.4.2.2. Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität

Die osteogene Differenzierung der in 25 cm²-Kulturflaschen induzierten Zellen wurde an Tag 14 über die Messung der Enzymaktivität der am Knochenwachstum beteiligten Alkalischen Phosphatase (ALP) mithilfe eines fluorometrischen Alkaline Phosphatase Assay Kits (Fa. Abcam) quantitativ ermittelt. 4×10^5 Zellen wurden bei 300 x g und 4°C für 5 min

zentrifugiert, mit DPBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, wiederum zentrifugiert ($300 \times g$, 4°C , 5 min) und das Zellpellet in $400 \mu\text{l}$ ALP Assay Puffer gelöst. Nach Zentrifugation bei $13.000 \times g$ und 4°C für 3 min wurde der Überstand abgenommen und gemäß ALP-Assay-Kitprotokoll vorgegangen. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte am 2300 EnSpire™ Multiplattenleser (Fa. Perkin Elmer) bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 360 nm bzw. 440 nm. Die Abspaltung der Phosphatgruppe des nicht-fluoreszierenden 4-Methyl-Umbelliferyl-Phosphats (MUP) durch die ALP resultiert dabei in einem intensiven Fluoreszenzsignal, das proportional zur ALP-Aktivität ist. Proben mit Messwerten oberhalb des höchsten Standards wurden wiederholt verdünnt eingesetzt.

3.4.2.3. Messung des gebildeten Kalziums

An Tag 21 wurden die in je drei Wells einer 24-Well-Platte osteogen differenzierten Zellen nach Von Kossa angefärbt (Färbeprotokoll siehe **Anhang, Kap. 9.4., Tab. 40**), um das von den Osteoblasten gebildete Kalzium in der extrazellulären Matrix nachzuweisen. Die Visualisierung erfolgte mittels Durchlichtmikroskop (Inverses Mikroskop AE2000, Fa. Motic Deutschland GmbH).

3.4.2.4. Messung des Index der osteogenen Differenzierung

Es folgte eine photometrische Messung der optischen Dichten (OD) sowohl der induzierten (ind) als auch nicht-induzierten Zellen (NK) am 2300 EnSpire™ Multiplattenleser (Fa. Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Der Index der osteogenen Differenzierung (IOD) wurde nach der **Formel 2** berechnet, indem der Quotient aus der $\text{OD}_{492 \text{ nm}}$ der ind- und NK-Zellen gebildet wurde.

$$IOD = \frac{OD(492 \text{ nm})(ind)}{OD(492 \text{ nm})(NK)} \quad (2)$$

3.4.3. Chondrogene Differenzierung

3.4.3.1. Studiendesign

Aufgrund eines erhöhten chondrogenen Differenzierungspotentials von ASCs in 3D-Zellkultur (**Kap. 2.1.2.2.3.**) wurden die Zellen in Pelletkultur differenziert. Dazu wurden nach dem Trypsinieren (**Kap. 3.3.3.**) 5×10^5 Zellen pro Kondition in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und dieses mit 2 ml chondrogenem Differenzierungsmedium bestückt. Nach Zentrifugation bei $280 \times g$ und 4°C für 5 min bildeten sich die Zellpellets. Die Inkubation der Zellen im chondrogenen Differenzierungsmedium erfolgte für 21 Tage im Brutschrank unter Standardkulturbedingungen, wobei die Deckel der Zentrifugenröhrchen locker angedreht waren, um einen Gasaustausch der Zellen zu gewährleisten. Durch tägliches Vortexen der Pelletkulturen wurde ein Floten der Pellets ermöglicht. Da in einem Vortest die Erfahrung

gemacht wurde, dass Pellets unabhängig von der eingesetzten Zellzahl bei Kultivierung in herkömmlichem Kulturmedium bzw. ohne den Einsatz chondrogener Induktionsfaktoren zerfallen, wurde auf das Mitführen einer NK in 3D-Pelletkultur verzichtet und nicht-induzierte Zellen als NK in 24-Well-Platten (Aussaatdichte 20.000 Zellen/cm²) über 21 Tage als 2D-Kultur mitgeführt. An Tag 21 wurden die Pellets und NK für die anschließende histologische Untersuchung mit ROTI®Histofix 4% (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG) über Nacht fixiert.

3.4.3.2. Histologische Untersuchung

Die Zellpellets wurden maschinell im Einbettautomat Logos One (Fa. A. Menarini Diagnostics) gemäß Herstellerangaben in Paraffin eingebettet, im Rotationsmikrotom (HM 325, Fa. Thermofisher Scientific) auf eine Schichtdicke von 0,5 µm geschnitten, in einem Wasserbad „gestreckt“ und auf beschichtete Objektträger (StarFrost Advanced Adhesive, Fa. Engelbrecht GmbH) gezogen. Diese Vorarbeiten und die in **Kap. 3.4.3.2.1.** beschriebene Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgten durch das Histologie-Labor des Instituts für Tierpathologie der FU Berlin. Die Proben wurden mit Xylol entparaffiniert, über eine absteigende Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 60% Ethanol) hydriert und mit Alcianblau-Kernechtrot gefärbt.

3.4.3.2.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die histologischen Schnittpräparate wurden zur Übersicht mit Hämatoxylin (Fa. Carl Roth GmbH + Co. KG) und Eosin (Fa. Waldeck GmbH & Co. KG) angefärbt (Färbeprotokoll siehe **Anhang, Kap. 9.4., Tab. 41**). Während Hämatoxylin (Hämalaun) Zellkerne im sauren Milieu blau anfärbt, stellen sich azidophile Strukturen wie das Zytoplasma, Kollagenfasern und die Zellwand nach Eosin-G-Färbung rot dar.

3.4.3.2.2. Messung der gebildeten sauren Mukopolysaccharide

Die Alcianblau-Färbung diente dem Nachweis der gebildeten sauren Glykosaminoglykane in der von den Chondroblasten gebildeten extrazellulären Matrix. Als Kerngegenfärbung wurde Kernechtrot eingesetzt. Die Färbung wurde gemäß dem Alcianblau-Kernechtrot-Färbekit für saure Mukosubstanzen (Fa. Morphisto GmbH) laut Herstellerangaben durchgeführt (Färbeprotokoll siehe **Anhang, Kap. 9.4., Tab. 42.**). Die als Monolayer mitgeführten NK wurden auf gleiche Weise angefärbt, wobei die unter **Kap. 3.4.3.2** beschriebene histologische Aufbereitung der Proben entfiel.

3.4.3.2.3. Modifizierter „Bern-Score“

Das chondrogene Differenzierungspotential wurde mittels eines Punktevergabesystems angelehnt an den von Grogan et al. (2006) entwickelten sog. „Bern-Score“ bewertet (Grogan et al. 2006). Dazu wurde der „Bern-Score“ insofern modifiziert, als dass die Bewertung nicht nach der Safranin-O/Fast Green-Färbung, sondern nach der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

erfolgte. Die histologischen Schnittpräparate der Zellpellets wurden durch zwei Beobachter „verblindet“ mikroskopiert und anhand von drei Kategorien (Kategorien A, B und C; siehe **Tab. 4**) bewertet. Für jede Kategorie wurden Punkte von null bis drei vergeben und diese summiert, sodass eine Gesamtpunktzahl von null bis neun Punkten erreicht werden konnte.

Tab. 4: Punktevergabesystem zur Bewertung der chondrogenen Differenzierung equiner Präadipozyten (modifiziert nach Grogan et al. 2006).

Modifizierter „Bern-Score“ nach Alcianblau-Kernechtrot-Färbung	
Kategorien	Punkte
A. Uniformität und Intensität der Alcianblau-Kernechtrot-Färbung	
• Keine Färbung	0
• Schwache Färbung mit gering ausgebildeter Matrix	1
• Moderate, gleichmäßige Färbung	2
• (teils) dunkle Färbung	3
B. Abstand zwischen den Zellen/Menge der akkumulierten Matrix	
• Hohe Zelldichte ohne Matrix (kein Abstand zwischen den Zellen)	0
• Hohe Zelldichte mit wenig Matrix (Zellen < 1 Zellgröße auseinander)	1
• Moderate Zelldichte mit mittelgradig Matrix (Zellen ca. 1 Zellgröße auseinander)	2
• Niedrige Zelldichte mit umfangreicher Matrix (moderater Abstand zwischen den Zellen, > 1 Zellgröße)	3
C. Zellmorphologie	
• Kondensierte/nekrotische/pyknotische Zellkörper	0
• Spindel-/faserförmige Zellmorphologie	1
• Gemisch aus spindel-/faserförmiger bzw. rundlicher, chondrogener Morphologie	2
• Hauptsächlich rundliche, chondrogene Morphologie	3

3.5. Immunologische Methoden

Die Reinheit der equinen abd-ASCs-_{EXP}- und abd-ASCs-_{SVF}-Populationen wurde anhand des Vorkommens stammzellspezifischer Oberflächenmarker mittels einer durchflusszytometrischen Analyse bei $n = 5$ Tieren überprüft. Auf Grundlage der für humane MSCs definierten ISCT-Kriterien (Dominici et al. 2006) und der in der Literatur beschriebenen Speziespezifität des Pferdes (**Kap. 2.1.2.1.**) wurde die Expression der Positivmarker CD29, CD44, CD90 und CD105 und der Negativmarker CD34 und CD45 nach dem folgenden Protokoll untersucht.

3.5.1. Vorbereitung und Fluoreszenzfärbung equiner ASCs

Zellen aus P3 und P4 wurden mit Akkutaselösung (Fa. PAN Biotech GmbH) von den Kulturflaschen abgelöst und das Zellpellet nach Zentrifugation (300 x g, 4°C, 5 min) in FACS-Puffer (DPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ supplementiert mit 0,2% BSL und 2 mM EDTA) resuspendiert, um die Enzymreaktion der Akkutase abzustoppen. Nach einer Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau (0,4%) wurden die Zellen in einer Neubauer Zählkammer gezählt und 1 x 10⁵ Zellen in jeweils ein Well einer 96-Well-Spitzbodenplatte (Fa. Greiner Bio-One GmbH)

überführt. Die Platte wurde zentrifugiert (400 x g, 8°C, 4 min) und der Überstand verworfen. Für die Fluoreszenzmarkierungen wurden 30 µl eines Mix aus den in **Tab. 5** aufgelisteten Primär-Antikörpern (AK) in den entsprechenden Verdünnungen in jedes Well pipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Primär-AKs wurden sog. Isotypkontrollen als NK auf gleicher Weise mitgeführt (siehe **Anhang, Kap. 9.5., Tab. 43**).

Tab. 5: Auflistung der für die Immunphänotypisierung eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Klon	Reaktivität	Fluorochrom	Verdünnung	Bezugsquelle
CD29	TS2/16	Anti-Human	Allophycocyanin (APC)	1:30	BioLegend
CD34	581	Anti-Human	Phycoerythrin (PE)	1:20	BioLegend
CD44	IM7	Anti-Maus/ Human	Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	1:600	BioLegend
CD45	F10-89-4	Anti-Human	Biotin (B)	1:10	Bio-Rad Laboratories GmbH
CD90.1	OX-7	Anti-Ratte	Pacific Blue (PB)	1:200	BioLegend
CD105	SN6	Anti-Human	Phycoerythrin-Cyanine7 (PE-Cy7)	1:20	ThermoFisher Scientific Inc.
Sekundär (Streptavidin)	-	Anti-Human/ Maus/Ratte	Alexa Fluor 488 (AF 488)	1:200	BioLegend

Der Mix aus Primär-AKs bzw. Isotypkontrollen enthielt zudem einen Viabilitätsfarbstoff eFluor780 (1:1000-Verdünnung; Fa. ThermoFisher Scientific Inc.) zum Ausschluss nicht-vitaler Zellen (engl. dead cell exclusion, DCE). Außerdem wurde zur Detektion von Hintergrundstrahlung bzw. Autofluoreszenz der Zellen eine ungefärbte Kontrolle mitgeführt, die ausschließlich 30 µl FACS-Puffer enthielt. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit 30 µl des Sekundärkonjugates Streptavidin-Alexa Fluor 488 (Fa. BioLegend) für 10 min bei 4°C, wonach sich wiederum ein Waschschrift anschloss. Für die durchflusszytometrische Messung wurde das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Als Positivkontrollen wurden mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnene Makrophagen sowie mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) mitgeführt. Dazu wurden bei im Rahmen des Klinikbetriebes an der Klinik für Pferde der FU Berlin durchgeführten Lungenuntersuchungen BAL-Proben von $n = 2$ Tieren entnommen. Die Makrophagengewinnung erfolgte durch das Institut für Tierpathologie der FU Berlin. Die PBMC-Isolation erfolgte durch eine Blutprobenentnahme aus der *Vena jugularis externa* nach Scheren der Haut und antiseptischer chirurgischer Vorbereitung bei $n = 5$ Pferden, die an der Klinik für Pferde der FU Berlin im Rahmen von Routineuntersuchungen vorstellig wurden. Nach 1:2-Verdünnung des EDTA-Blutes mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9% Natriumchlorid) wurde dieses in ein mit 12,5 ml humanem Pancoll (Fa. PAN-Biotech GmbH) bestücktes Zentrifugentube aufgetragen und bei 800 x g und RT für 20 min zentrifugiert (Bremse 0, Beschleunigung 0). Die PBMC enthaltende Interphase

wurde in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt, in das 40 ml DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ vorgelegt wurde, und bei 400 x g und 4°C für 8 min erneut zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das die PBMCs enthaltende Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert. Sowohl BAL-Makrophagen als auch PBMC wurden in einem CASY® Cell Counter (Fa. Roche-Innovatis AG) gemäß Herstellerangaben gezählt und Fluoreszenzmarkierungen angeschlossen (Protokoll s.o.).

3.5.2. Durchflusszytometrische Untersuchung zur Immunphänotypisierung equiner ASCs

Die Durchflusszytometrie (engl. fluorescence-activated cell sorting, FACS) ermöglicht als Messverfahren eine zeitgleiche Bestimmung der Größe, Granularität und des Phänotyps der untersuchten Zellen. Grundlage hierfür stellt eine Zellsuspension dar, in der die Zellen einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden, der auf die Zelle treffende Lichtstrahl je nach Zellbeschaffenheit abgelenkt wird und als Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter, FSC) bzw. Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter, SSC) detektiert wird. Der FSC spiegelt die Größe und der SSC die Granularität der Zellen wider. Die bei der Markierung der Zellen mit Fluorochrom-markierten AK entstehenden Fluoreszenzsignale werden detektiert und in ein elektrisches Signal umgewandelt, das elektronisch weiterverarbeitet wird. Die Datenerhebung erfolgte am BD FACSCanto II (Fa. BD Biosciences) und die Analyse der Daten erfolgte mittels FlowJo Software (Version 9.9.6, Fa. Tree Star Inc.). Die Gating-Strategie (engl. gating, Schleusen) ermöglichte ein gezieltes Auswählen der zu untersuchenden Zellpopulation, sodass unter anderem Zelldubletten, Zelldebris und nicht-vitale Zellen aus den Messungen ausgeschlossen wurden (siehe **Anhang, Kap. 9.5., Abb. 37**).

3.6. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs

Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche in zwei Versuchsdurchläufen durchgeführt.

3.6.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin

Zur Evaluierung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs wurde zunächst der Effekt des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-AZA auf equine Präadipozyten *in vitro* untersucht. Dazu wurden abd-ASCs_{-SVF} der P3 und P4 von $n = 5$ Tieren aufgetaut, in unbeschichteten 75 cm² Zellkulturflaschen in E-M vermehrt und bei 80–90% Konfluenz an Tag 0 (Zeitpunkt T0) mit 10 µM 5-AZA über 48 h induziert (Zusammensetzung des Differenzierungsmediums siehe **Anhang, Kap. 9.3., Tab. 32**). Nach Wechsel zum herkömmlichen E-M am dritten Tag wurden die Zellen weiter bis Tag 21 (3 Wochen nach Induktionsstart, Zeitpunkt T3) inkubiert. MW erfolgten alle zwei bis drei Tage (Versuchsdesign siehe **Abb. 9**). Nicht-induzierte Zellen wurden als NK mitgeführt. Die Zellmorphologie wurde

während des Induktionszeitraums alle zwei bis drei Tage subjektiv durchlichtmikroskopisch beurteilt. Zu den Zeitpunkten T0 und T3 wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers geerntet und mittels einer SYBR Green RT-qPCR die Genexpressionen pluripotenzassoziierter Marker, kardialer Marker und eines Muskelmarkers untersucht (siehe **Kap. 3.7.**).

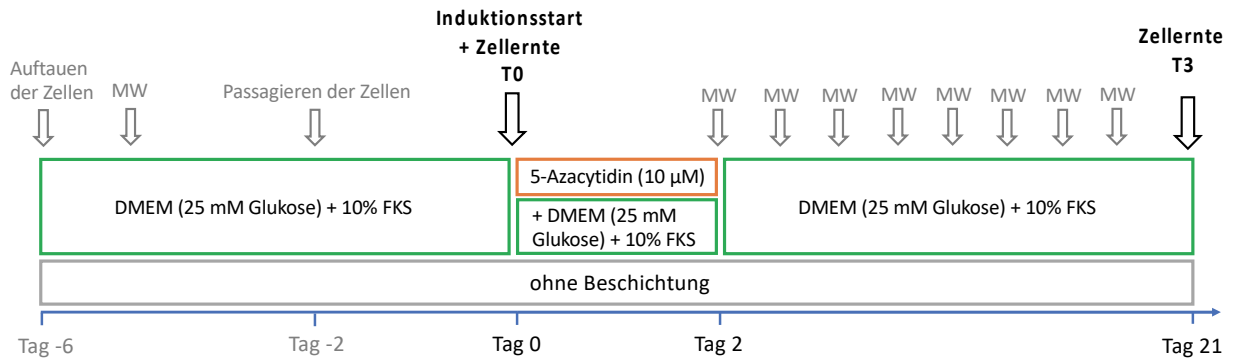


Abb. 9: Versuchsdesign des 5-Azacytidin-Induktionsversuchs.

Equine Präadipozyten wurden nach zeitgleichem Auftauen und Vermehren der Zellen an Tag 0 mit 10 µM 5-Azacytidin über 48 Stunden kardiomyogen induziert und ab Tag 3 in herkömmlichem Expansionsmedium weiter kultiviert. An Tag 21 wurden die Zellen für die anschließende molekularbiologische Untersuchung geerntet. **Abkürzungen:** DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FKS, fetales Kälberserum; MW, Mediumwechsel; T0, Zeitpunkt Tag 0; T3, Zeitpunkt 3 Wochen nach Induktion.

3.6.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1

Im nächsten Schritt wurde das kardiomyogene Differenzierungspotential equiner ASCs unter Einsatz weiterer Induktionsfaktoren und unter Zuhilfenahme eines extrazellulären Matrixproteins untersucht. Dazu wurden abd-ASCs_{-SVF} der P3, P4 und P6 mit den an der embryonalen Kardiomyogenese beteiligten Transduktionsfaktoren Act A, BMP-4 und DKK-1 induziert (siehe **Kap. 2.3.1.**). Im ersten Teilversuch wurden abd-ASCs_{-SVF} von $n = 5$ Tieren zeitgleich aufgetaut und in B-M in mit murinem Laminin (Fa. Sigma Aldrich) beschichteten 25 cm² Zellkulturflaschen vermehrt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80–90% wurden die Zellen gemäß den Protokollen 1A und 1B in **Tab. 6** induziert.

Tab. 6: Protokoll des Induktionsversuchs mit Act A, BMP-4 und DKK-1 (1. Teilversuch).

Faktor	Dauer	1A	1B
Act A	24 h	100 ng/ml	100 ng/ml
BMP-4	96 h	10 ng/ml	20 ng/ml
DKK-1	48 h	100 ng/ml	100 ng/ml

Nach der einwöchigen Induktionszeit erfolgte die weitere Inkubation der Zellen in einem modifizierten Basalmedium (MB-M, Zusammensetzung siehe **Anhang, Kap. 9.3., Tab. 33**). MW erfolgten alle zwei bis drei Tage. Es wurden nicht-induzierte Zellen als NK mitgeführt.

Durchlichtmikroskopisch wurden die Zellen hinsichtlich morphologischer Veränderungen untersucht und zu den Zeitpunkten T0 und T3 eine Genexpressionsanalyse mittels SYBR Green RT-qPCR angeschlossen (**Kap. 3.7.**).

Der zweite Teilversuch erfolgte gemäß dem Protokoll für den ersten Teilversuch mit den in **Tab. 7** aufgeführten Variationen (2A, 2B und 2C) der Induktionsfaktoren.

Tab. 7: Protokoll des Induktionsversuchs mit Act A, BMP-4 und DKK-1 (2. Teilversuch).

Faktor	Dauer	2A	2B	2C
Act A	24 h	0 ng/ml	100 ng/ml	100 ng/ml
BMP-4	96 h	50 ng/ml	50 ng/ml	50 ng/ml
DKK-1	48 h	150 ng/ml	150 ng/ml	0 ng/ml

Die Zusammensetzungen der Differenzierungsmedien beider Teilversuche sind im Einzelnen im **Anhang** in **Kap. 9.3.**, **Tab. 34–38** aufgeführt. Das Versuchsdesign ist in **Abb. 10** dargestellt.

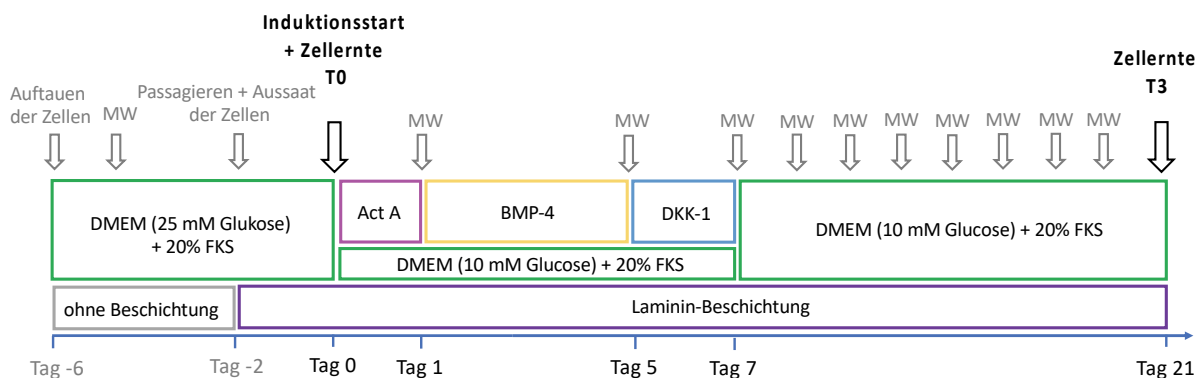


Abb. 10: Versuchsdesign des kardiomyogenen Differenzierungsversuchs des ersten und zweiten Teilversuchs unter Einsatz der Induktionsfaktoren Aktivin A (Act A), knochenmorphogenetisches Protein-4 (BMP-4) und Dickkopf-1 (DKK-1).

Die kardiomyogene Induktion equiner Präadipozyten erfolgte an Tag 0 mit Act A, von Tag 1 bis Tag 5 mit BMP-4 und von Tag 5 bis Tag 7 mit DKK-1 in lamininbeschichteten Kulturgefäßen. In beiden Teilversuchen wurden verschiedene Faktorkonzentrationen hinsichtlich des kardiomyogenen Differenzierungspotentials getestet (nicht dargestellt). Die weitere Kultivierung der Zellen ab Tag 7 fand in einem modifizierten Basalmedium statt und die Zellernte erfolgte an Tag 21. **Abkürzungen:** DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; FKS, fetales Kälberserum; MW, Mediumwechsel; T0, Zeitpunkt Tag 0; T3, Zeitpunkt 3 Wochen nach Induktion.

3.7. Molekularbiologische Methoden

Zur Überprüfung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner abd-ASCs_{SVF} wurde die Genexpression verschiedener an der Kardiomyogenese beteiligter Marker untersucht. Dazu wurden repräsentativ die Expression der frühkardialen Gene *NKX2-5* und *GATA4* sowie der herzspezifischen Gene *MYH6*, *MYH7* und *TNNI3* mittels SYBR Green RT-qPCR zu den Zeitpunkten T0 und T3 analysiert. Zudem erfolgte eine Charakterisierung der Zellen hinsichtlich der Expression der pluripotenzassoziierten Marker *MYC*, *OCT4/POUF5*

sowie bei den Act A-, BMP-4- und DKK-1-Induktionsversuchen zusätzlich des Markers *DNMT3B* und des Muskelmarkers *MYF6* zum Ausschluss einer myogenen Differenzierung. Als Referenzpopulationen (Positivkontrollen, PK) wurden neben equinen abd-ASCs_{SVF} zum Zeitpunkt T0 atriale und ventrikuläre Herzmuskelgewebeprobe mitgeführt, die am Department of Veterinary Clinical Sciences, Section of Large Animal Medicine and Surgery der Universität Kopenhagen von $n = 6$ Pferden *post mortem* entnommen und dem Projekt zur Verfügung gestellt wurden, sowie an der Klinik für Pferde der FU Berlin entnommene Muskelgewebeprobe von $n = 2$ euthanasierten Pferden. Dazu wurde *post mortem* im Bereich des Sitzbeinhöckers nach Scheren der Haut, chirurgischer Vorbereitung und Inzision aller Hautschichten mitsamt des Unterhautfettgewebes ein ca. 2 x 2 x 2 cm großes Gewebestück des langen Sitzbeinbeinmuskels (*M. semimembranosus*) entnommen.

3.7.1. RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA der T0- und T3-Zellen erfolgte mithilfe des Extraktionskits NucleoSpin® RNA (Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben. Die Herzmuskel- und Muskelgewebeprobe wurden zunächst in 30 mg (± 5 mg) große Gewebestücke geschnitten, in ein mit 700 μ l RA1-Lysispuffer und 7 μ l β -Mercaptoethanol bestücktes Reaktionsgefäß überführt und in einer Kugelschwingmühle (MM200, Fa. Retsch GmbH) mit einer Schwingfrequenz von 1200/min für 120 s homogenisiert. Nach Zentrifugation (14000 x g , RT, 1 min) wurden 700 μ l Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 700 μ l Phenol-Chloroform überschichtet (Phenol-Chloroform-Extraktion) und gevortext. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 x g und 4°C für 10 min. 500 μ l der oberen, die Nukleinsäuren enthaltenden Phase wurden abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 200 μ l einer Lösung aus 198 μ l RA1-Lysispuffer und 2 μ l β -Mercaptoethanol vermischt. Nach Überführen der Probe auf den rosa NucleoSpin®-Filter erfolgte die RNA-Extraktion gemäß Kitprotokoll. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.7.2. Messung der RNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung der extrahierten RNA wurde mittels NanoPhotometer® (Fa. Implen) die Extinktion der Proben bei 260 nm gemessen. Eine Extinktion von 1 entspricht dabei 40 μ g/ml RNA. Zur Überprüfung der Reinheit der Probe wurde das Maß der Verunreinigung durch Proteine bei 280 nm und durch Kohlenhydrate bzw. Phenole bei 230 nm ermittelt, die Ratio A260/A280 (Referenzwert: 1,8–2,0) sowie A260/230 (Referenzwert: > 1,7) bestimmt und Proben mit Messwerten außerhalb der Referenzbereiche ausgeschlossen.

3.7.3. Messung der RNA-Qualität

Als Maß der Integrität (Qualität) wird der RIN-Wert (engl. RNA integrity number) bestimmt, der sich aus dem Quotienten der ribosomalen RNA-Untereinheiten (r28S/r18S) ergibt. Damit kann eine Aussage über eine potentielle RNA-Degradation durch RNA-abbauende Enzyme (RNAsen) geliefert werden (Schroeder et al. 2006). Die Qualität der extrahierten Gesamt-RNA wurde mikroelektrophoretisch als „Lab-on-a-chip“-Verfahren mit einem kommerziellen Kit (Agilent RNA 6000 Nano Kit, Fa. Agilent) nach Herstellerangaben in einem Bioanalyzer 2100 (Fa. Agilent) sowie mittels der Software „Agilent Expert 2100“ überprüft. Für eine hohe RNA-Integrität sprachen ein RIN-Wert nahe 10 (Soll-Wert: 6–10) sowie ein Elektropherogramm, welches neben dem Peak für den Marker zwei ribosomale RNA-Peaks aufwies. Das Verhältnis der ribosomalen RNA-Untereinheiten sollte einen Wert von ≥ 2 annehmen.

3.7.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Es folgte die reverse Transkription (cDNA-Synthese) intakter RNA-Proben mithilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) laut Herstellerangaben. Alle RNA-Proben eines Versuchsansatzes wurden mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in einen komplementären DNA-Strang in einem Ansatz umgeschrieben, um methodische Fehler zu vermeiden. Es wurden 500 ng/ml RNA-Template pro Reaktionsansatz eingesetzt. Zur Überprüfung einer Kontamination der Ausgangs-RNA mit genomischer DNA (gDNA) wurde eine sog. Non-Reverse-Transkriptase-Kontrolle (NRT) mitgeführt, indem die Reverse Transkriptase durch DEPC-H₂O ersetzt wurde. Das Temperatur-Zeit-Profil und der Reaktionsansatz sind dem Kitprotokoll zu entnehmen. Die Inkubation der Proben fand in einem Thermocycler (Mastercycler® nexus gradient, Fa. Eppendorf) statt. Anschließend wurden die doppelsträngigen cDNA-Proben und NRTs 1:10 verdünnt (20 µl Probe bzw. NRT und 180 µl DEPC-H₂O) und bei –20°C gelagert.

3.7.5. Primer (Oligonukleotide)

3.7.5.1. Primerdesign und -herstellung

Es wurden tierartsspezifische Primer der jeweiligen Gene erstellt, die komplementär an die zu amplifizierende cDNA-Sequenz binden, basierend auf der Nukleotid-Datenbank „NCBI“, dem multiplen Sequenzalignment („Clustal Omega“) und der Software „Primer 3 Plus“. Sekundärstrukturen (Haarnadeln) wurden mithilfe des „Mfold Web Server(s)“ softwaregestützt detektiert und vermieden. Die Primer wurden zur Vermeidung der Amplifikation kontaminierender gDNA „intronübergreifend“ konzipiert, sollten eine Länge von 18 bis 22 Nukleotide, eine Schmelztemperatur (engl. melting temperature, T_M) von 52 bis 61°C und eine (möglichst) gleichmäßige Nukleotidsequenz aufweisen. Die Auflistung der Primer ist dem **Anhang, Kap. 9.6., Tab. 44** zu entnehmen. Die Herstellung der

Primer erfolgte über die Fa. Eurofins Genomics Germany GmbH. Die gelieferten lyophilisierten Oligonukleotide wurden auf 100 pmol/µl mit DEPC-H₂O verdünnt (Stammlösung). Die Arbeitslösung enthielt 20 pmol/µl. Die gelösten Primer wurden bei -20°C gelagert.

3.7.5.2. Überprüfen und Etablieren der Primer

Vor Beginn der RT-qPCR-Experimente wurden alle Primer auf ihre Sensitivität, Spezifität, Effizienz und die optimalen Temperaturen für die Primeranlagerung (Annealing) überprüft (Bustin et al. 2009). Als Template diente eine Poolprobe aus T0-abd-ASCs_{-SVF}, Kardiomyozyten und Myozyten aus allen hergestellten cDNA-Proben (**Kap. 3.7.4.**).

3.7.5.2.1. Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR (kPCR) diente der Überprüfung der Amplikongröße der Gene. Die Primer wurden auf ihre Funktionsfähigkeit und Produktspezifität überprüft. Der Reaktionsansatz ist **Tab. 8** zu entnehmen.

Tab. 8: Reaktionsansatz für die kPCR.

Reagenz	Menge (in µl)	Endkonzentration
Taq PCR Mastermix ¹	10	0,5 Units/Reaktion Qiagen Taq DNA Polymerase Puffer mit 1,5 mM MgCl ₂ 40 µM von jedem dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Primer	3	1,5 µl Sense-Primer, 1,5 pmol 1,5 µl Antisense-Primer, 1,5 pmol
cDNA (Template)	7	
Σ	20	

¹Taq PCR Master Mix Kit, Fa. Qiagen.

Zum Ausschluss von Kreuzkontaminationen wurde für jedes Gen eine Kontrolle ohne Template (engl. no template control, NTC) mitgeführt (siehe **Kap. 3.7.6.2.**). Die kPCR wurde nach dem in **Tab. 9** beschriebenen Temperatur-Zeit-Profil im PCR-Thermocycler (Mastercycler® nexus gradient, Fa. Eppendorf) durchgeführt. Die doppelsträngige DNA wurde durch Hitzedenaturierung in zwei DNA-Einzelstränge gespalten, wonach die Primerhybridisierung an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge erfolgte (Annealing) und mithilfe des hitzestabilen Enzyms Taq-DNA-Polymerase (Fa. Qiagen) ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert wurde (Elongation). Die Menge der synthetisierten DNA verdoppelte sich pro Zyklus. Die Produkte der kPCR wurden sofort weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

Tab. 9: Temperatur-Zeit-Profil der kPCR.

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Phase
1 x	94°C	3 min	initiale Denaturierung
35 x	94°C	30 s	Denaturierung
	57°C	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Elongation
1 x	72°C	10 min	finale Elongation

3.7.5.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der qualitativen Bewertung der DNA-Amplifikation und Darstellung der kPCR-Produkte durch Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe. Die mit Ladepuffer (6 x Orange DNA Loading Dye, Fa. ThermoScientific) bestückten kPCR-Produkte wurden auf ein 2%-TAE-Agarosegel aufgetragen, dem Midori Green (Fa. Biozym Scientific GmbH) zugesetzt war. Als Größenstandard diente ein HyperLadder™ 25–500 bp (Fa. Biorline). Nach Anlegen einer Spannung mittels des PowerPac Universal Power Supply (Fa. Bio-Rad) interkalierte das dem Agarosegel zugesetzte Midori Green mit der DNA, sodass unter UV-Licht (ChemiDoc™ XRS+ System Imaging System, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) die fluoreszierenden DNA-Fragmente (Bandenmuster) detektiert werden konnten. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software Image Lab™ (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH).

3.7.5.2.3. Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte mithilfe des „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits“ (Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben. Es folgte eine Konzentrationsbestimmung mittels NanoPhotometer® (Implen), wobei die Mindestkonzentration für die anschließende Sequenzierung 10 ng/μl DNA betrug.

3.7.5.2.4. DNA-Sequenzierung

Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zusammen mit den Sense- bzw. Antisense-Primern in ein externes Sequenzierungslabor (Fa. Microsynth Seqlab GmbH) geschickt und nach Sanger sequenziert. Die Sequenzierung diente der Bestimmung der Nukleotidsequenz des PCR-Produkts und Überprüfung der Primer zum Ausschluss von Kreuzreaktivitäten. Die Auswertung erfolgte mit dem Sequenzierungsprogramm „SeqTrace“. Die Produkte der Sequenzierung wurden auf die gesuchte Nukleinsäure-Sequenz sowie die Spezifität der Tierart zum Ausschluss von Homologien gegenüber anderen Spezies untersucht (NCBI Nucleotide BLAST).

3.7.5.2.5. Verdünnungsreihen und Effizienzen

Zur Bestimmung der Sensitivität wurde eine Amplifikation der zu untersuchenden Sense- und Antisense-Primer mittels achtsufiger log₄-Verdünnungsreihe durchgeführt, wobei 200 μl des auf 1 ng/μl verdünnten PCR-Produktes (dsDNA) je Verdünnungsstufe um 1:4 verdünnt wurden. Sensitivität beschreibt die kleinste, noch detektierbare Kopienzahl der mRNA-Sequenz. Für die RT-qPCR wurde ein 20 μl-Reaktionsansatz gemäß **Tab. 10** vorbereitet. Der Mastermix (2x IQ™ SYBR® Green Supermix, Fa. Bio-Rad) enthielt die thermostabile 50 U/ml iTaq™ DNA-Polymerase, dNTPs (je 0,4 mM von dATP, dCTP, cGTP, dTTP), 6 mM MgCl₂, SYBR Green Farbstoff (20 nM Fluoreszein), Puffersubstanzen (40 mM Tris-HCl, pH 8,4; 100 mM KCl) sowie Stabilisatoren.

Tab. 10: Reaktionsansatz für die RT-qPCR (Verdünnungsreihe).

Reagenz	Menge (in µl)
2 x iQ™SYBR Green Supermix	10
Sense-Primer	0,38 (0,5pM/µl)
Antisense-Primer	0,38 (0,5pM/µl)
Template (cDNA)	5
DEPC-H ₂ O	4,24
Σ	20

Das Temperatur-Zeit-Profil entsprach dem in **Kap. 3.7.6., Tab. 12** beschriebenen. Die höchste, noch amplifizierbare Verdünnungsstufe stellte die Sensitivitätsgrenze dar. Die Verdünnungsreihe einer bekannten Template-Konzentration wurde zur Etablierung einer Standardkurve verwendet, sodass die Effizienz der Reaktion und Startmenge (Kopienzahl) der eingesetzten Zielgen-Sequenzen in der Probe aus der Steigung des logarithmisch linearen Bereichs ermittelt werden konnten (Bustin et al. 2009). Der lineare Bereich wurde über den Korrelationskoeffizienten (r) ermittelt und das Bestimmtheitsmaß (r^2) berechnet (**Formel 3**).

$$r^2 = \left[\frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \right]^2$$

r^2 = Bestimmtheitsmaß x = Konzentration (logarithmiert) y = Ct – Wert (logarithmiert) \bar{x} und \bar{y} = Mittelwerte	(3)
---	------------

Die Effizienz (E) eines RT-qPCR-Assays gibt an, wie oft das Template in jedem Zyklus amplifiziert wird, und beträgt idealerweise 100%. Dies entspricht einer Verdopplung der DNA-Produktmenge nach jedem Zyklus während der exponentiellen Phase der RT-qPCR (Bustin et al. 2009). Als Maß der Effizienz wurde die Steigung (engl. slope, s) der Standardkurve der verschiedenen Verdünnungsstufen herangezogen, die bei einer Effizienz von 100% $-3,32$ beträgt. Die Effizienz und Steigung wurden nach den folgenden **Formeln 4** und **5** berechnet, wobei eine Effizienz von 90 bis 110% und eine Steigung von $-3,58$ bis $-3,10$ angestrebt wurden (Hatch et al. 2014).

$$E = 10^{\left(\frac{-1}{s}\right)} - 1$$

E = Effizienz s = Steigung	(4)
-----------------------------------	------------

$$s = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2}$$

x = Konzentration in pg/µl (logarithmiert) y = Ct – Wert (logarithmiert) \bar{x} und \bar{y} = Mittelwerte	(5)
--	------------

3.7.5.2.6. Gradientenlauf

Zunächst wurden die optimalen Hybridisierungstemperaturen (engl. optimal annealing temperature, T_a Opt) der Primer mithilfe der Software „Tm Calculator“ bzw. über die von Rychlik et al. (1990) aufgestellte Formel berechnet (Rychlik et al. 1990). Diese theoretisch ermittelten Werte wurden in einem Gradientenlauf für ausgewählte Gene (*OCT4/POUF5*, *GATA4*, *TNNI3*, *MYH7*) im iCycler iQ™ (Fa. Bio-Rad) nach dem in **Tab. 11** beschriebenen Protokoll überprüft. Der Reaktionsansatz dafür erfolgte gemäß **Tab. 10**.

Tab. 11: Temperatur-Zeit-Profil der kPCR (Gradientenlauf).

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Phase
1 x	94°C	3 min	initiale Denaturierung
40 x	94°C	30 s	Denaturierung
	51°C–58°C Gradient (+1°C)	1 min	Annealing
	72°C	1 min	Elongation
1 x	72°C	10 min	finale Elongation

} Amplifikation

Es wurden NTCs mitgeführt (siehe **Kap. 3.7.6.2.**). Die Temperaturstufe mit der größten Differenz der C_T -Werte zwischen dem jeweiligen Zielgen und der NTC entsprach der T_a Opt. Zum Ausschluss von Doppel- und Mehrfachbanden wurde eine Agarose-Gelelektrophorese angeschlossen (**Kap. 3.7.5.2.2.**).

3.7.5.2.7. Referenzgene

Als interne Kontrollen wurden die Gene Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*), β -Actin (*ACTB*) und 18S ribosomale RNA (*RN18S*) eingesetzt, die sich in anderen Versuchen am Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin als stabil exprimiert erwiesen hatten. Mithilfe der Analysesoftware „geNorm“ wurden die Expressionsstabilitäten über den M-Wert ermittelt (nach Hellemans et al. 2007) und das für den Assay am besten geeignete Referenzgen bestimmt.

3.7.6. SYBR Green RT-qPCR

Die RT-qPCR stellt ein direktes Nachweisverfahren dar, bei dem eine Quantifizierung des PCR-Produkts nach jedem Amplifikationszyklus stattfindet (Holzapfel und Wickert 2007). Die Detektion erfolgte mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs SYBR Green (iQ™ SYBR® Green Supermix, Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH), der sich in die doppelsträngige DNA einlagerte (Interkalation), bei entsprechender Bestrahlung durch Lichtemission spezifischer Wellenlänge ($\lambda = 520$ nm). Die Zunahme des Fluoreszenzsignals korrelierte mit zunehmender Zyklenzahl mit der Menge der Amplifikate-DNA. Die RT-qPCR fand im iCycler iQ™ (Fa. Bio-Rad) nach dem in **Tab. 12** dargestellten Temperatur-Zeit-Profil statt, wobei die Annealing-Temperaturen

für jedes spezifische Primerpaar entsprechend angepasst wurden (**Kap. 3.7.5.2.6.**). Der Reaktionsansatz ist in **Tab. 13** aufgeführt.

Tab. 12: Temperatur-Zeit-Profil der SYBR Green RT-qPCR.

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit	Phase
1x	95°C	180 s	Polymerase-Aktivierung / DNA-Denaturierung
40x	95°C	10-15 s	Denaturierung
	60°C	30-60 s	Annealing / Elongation
1x	72°C	360 s	Finale Elongation
1x	55-95°C (0,5°C)	2-5 s	Schmelzkurve

Tab. 13: Reaktionsansatz für die SYBR Green RT-qPCR.

Reagenz	Menge (in µl)
IQ™ SYBR® Green Supermix ¹	10
Sense-Primer	1,5
Antisense-Primer	1,5
cDNA (Template)	5
ddH ₂ O	2
Σ	20

¹Zusammensetzung bzw. Konzentrationen siehe im Text unten.

Für den Reaktionsansatz wurde ein 1x IQ™ SYBR® Green Supermix eingesetzt, der die thermostabile 25 U/ml iTaq™ DNA-Polymerase, dNTPs (je 0,2 mM von dATP, dCTP, cGTP, dTTP), 3 mM MgCl₂, SYBR Green Farbstoff (10 nM Fluoreszein), Puffersubstanzen (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl) und Stabilisatoren enthielt. Die Proben wurden als Triplikate in 96-Well-Platten (Fa. BRAND GMBH + CO KG) pipettiert. Zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche einmal wiederholt.

3.7.6.1. Schmelzkurvenanalyse

Zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikationsprodukte und zum Ausschluss unspezifischer PCR-Produkte bzw. Nebenprodukte (Primerdimere) erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Dazu wurde die Temperatur auf 55°C heruntergekühlt und schrittweise auf 95°C erhöht (**Tab. 12.**). Bei einer für das Amplifikat spezifischen Schmelztemperatur kommt es zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green, woraufhin ein Fluoreszenzabfall detektiert wird. Als Schmelzpunkt wurde der Punkt bezeichnet, bei dem 50% der Amplifikate (dsDNA) als Einzelstränge vorlagen. Die spezifische Schmelztemperatur wurde aus der negativen ersten Ableitung der Schmelzkurve bzw. des Fluoreszenzsignals ermittelt und als Schmelzkurven-Peak dargestellt.

3.7.6.2. Platteninterne und plattenübergreifende RT-qPCR-Kontrollen

Als PK dienten cDNA-Poolproben aus abd-ASCs-SVF zum Zeitpunkt T₀, Herzmuskel- bzw. Muskelgewebeproben entsprechend des jeweiligen Zielgens (**Kap. 3.7.**), die insbesondere bei

negativen Amplifizierungsergebnissen als Referenzpopulation geeignet sind. Als NK wurden aus ddH₂O (anstelle des Templates) bestehende NTCs zum Ausschluss einer Kontamination und von Primerdimeren innerhalb der RT-qPCR-Läufe mitgeführt. Die in **Kap. 3.7.4.** beschriebenen NRTs wurden für jeden RT-qPCR-Lauf eines Gens eingesetzt. Zum Ausschluss technischer Variationen zwischen verschiedenen 96-Well-Platten wurde ein Inter-Run-Calibrator (IRC, Poolprobe aus allen im Experiment beteiligten DNA-Proben) mitgeführt, der auf jeder Platte mit dem gleichen Referenzgen (*GAPDH*) angesetzt wurde, und eine Inter-Run-Kalibrierung durchgeführt.

3.7.6.3. Auswertung der RT-qPCR-Daten

Zunächst wurde für alle Gene der arithmetische Mittelwert der in Triplets gemessenen C_t-Werte berechnet sowie die ΔC_t , $\Delta\Delta C_t$ und $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte nach der Methode der relativen Quantifizierung von Livak und Schmittgen (Livak und Schmittgen 2001; Schmittgen und Livak 2008) ermittelt und die RT-qPCR-Resultate der einzelnen Proben miteinander verglichen. Es wurde festgestellt, dass die kardialen Marker *GATA4*, *NKX2-5*, *TNNI3*, *MYH6* und *MYH7* und der Muskelmarker *MYF6* mit hohen C_t-Werten amplifiziert wurden und im negativen Bereich der Genregulation lagen. Aus diesem Grund wurde sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden, die Livak-Methode (relative Quantifizierung) nicht anzuwenden (Trachsel et al. 2022).

3.8. Statistische Analyse

Die Datenanalyse erfolgte mittels kommerzieller statistischer Software (IBM SPSS, Version 27 und Graph Pad Prism, Version 9.1.2. für Mac, Graph Pad Software). Die Rohdaten wurden zuvor in Microsoft®Excel für Mac (Version 16.67, 2022 Microsoft) übertragen. Zunächst erfolgte eine deskriptive Datenanalyse, in dem der Mittelwert bzw. Median, das 95% Konfidenzintervall, die Varianz und Standardabweichung, das Minimum und Maximum, der Interquartilsbereich (IQR) sowie die Schiefe und Kurtosis der erhobenen Daten berechnet wurden. Es wurde ein Test auf Normalverteilung angeschlossen (Kolmogorov-Smirnov- bzw. Shapiro-Wilk-Test). Die dazugehörigen Histogramme, QQ-Diagramme und Boxplots wurden visuell bewertet. Bei Annahme einer Normalverteilung wurden parametrische Tests und bei Nicht-Annahme einer Normalverteilung nicht-parametrische Tests angewendet. Bei allen statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt ($\alpha = 0,05$). Der Isolierungserfolg von ASCs wurde mithilfe eines linearen gemischten Modells berechnet. Dabei stellte die Gesamtpunktzahl das Ziel, das Tier den zufälligen Faktor und die Lokalisation, Isolationsmethode sowie die Interaktion aus Lokalisation und Isolationsmethode die festen Effekte dar. Diese genannten Effekte wurden auch in den Folgeversuchen als feste Faktoren berücksichtigt. Zur Untersuchung des Zellwachstums und der PDT wurde eine ANOVA mit

Messwiederholung durchgeführt, wobei die Zellzahlen bzw. die PDT der einzelnen Tage die Messwiederholungen darstellten. Zur Evaluierung des am besten geeigneten Serumsupplements wurden eine univariate Varianzanalyse und ein Tukey-HSD-Test (Post-Hoc) für ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} durchgeführt. Im Rahmen der tripotenten Differenzierungsversuche wurden einerseits abd-ASCs der EXP- und SVF-Methode (zwei Gruppen) und andererseits ASCs-_{EXP} der abd-, rb- und sc-Lokalisation (drei Gruppen) miteinander verglichen. Es wurden nicht-parametrische Tests angewendet, ein Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der zwei Gruppen (Isolationmethode) und ein Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich der drei Gruppen (Lokalisation). Wurden Daten sowohl für induzierte Zellen als auch für NK erhoben, wurde zusätzlich untersucht, ob ein signifikanter Behandlungseffekt vorlag (Mann-Whitney-U-Test). Bei Mehrfachvergleichen wurden die Signifikanzwerte mithilfe der Bonferroni-Korrektur angepasst (siehe Bender et al. 2007). In den Dotplots sind die Mediane der Resultate und die IQR dargestellt. Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Oberflächenmarkerexpressionen der ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} mithilfe eines Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben miteinander verglichen (Vergleich zweier Gruppen). Für die kardiomyogenen Differenzierungsversuche wurde folgende statistische Regel aufgestellt: *Statistische Tests werden zur Analyse der Resultate der SYBR Green RT-qPCR der jeweiligen Marker nur durchgeführt, wenn die C_T-Mittelwerte der verschiedenen Behandlungen mehr als vier Zyklen von den C_T-Mittelwerten der H₂O- und NRT-technischen Kontrollproben entfernt liegen.* In diesen Fällen wurde eine univariate Varianzanalyse durchgeführt, wobei beim 5-AZA-Induktionsversuch ein Tukey-HSD- oder Hochberg-Post-Hoc-Test und bei den Act A-, BMP-4- und DKK-1-Induktionsversuchen ein Tukey-HSD-Post-Hoc-Test für Mehrfachvergleiche angeschlossen wurde. In den Dotplots sind die Resultate als Mittelwerte ± Standardabweichungen (engl. standard deviation, SD) aufgezeigt.

4. Ergebnisse

4.1. Pferde und Probenentnahme

Die beprobten Pferde wiesen ein Durchschnittsalter von 13,5 [18,0] Jahre (Median [IQR]) auf. Bei 10/16 Tieren (62,5%) handelte es sich um Wallache, bei 4/16 Tieren (25%) um Stuten und bei 2/16 Tieren (12,5%) um Hengste. Die Wallache wiesen ein Durchschnittsalter von 19,5 [13,3] Jahren, die Stuten von 6,5 [13,8] Jahren und die Hengste von 5,0 [0,0] Jahren auf (**Abb. 11**). In die Studie wurden unterschiedliche Rassen einbezogen, insbesondere Warmblüter (5/16 Tiere = 31,25%) sowie American Quarter Horses (3/16 Tiere = 18,75%), Shetlandponys (2/16 Tiere = 12,5%), ein Islandpferd, Fjordpferd, Deutsches Reitpony, Araber-Mix, Pura Raza Española und Shire Horse (je 1/16 Tiere = 6,25%). Es wurden neben hauptsächlich euthanasierten (12/16 Tiere = 75%) auch geschlachtete Pferde (4/16 Tiere = 25%) beprobt. Während bei den geschlachteten Pferden keine Grunderkrankungen bekannt waren, wiesen die euthanasierten Pferde Koliken (5/16 Tiere = 31,25%), orthopädische Erkrankungen (5/16 Tiere = 25%), virale Infektionserkrankungen (1/16 Tiere = 6,25%) und Tumorerkrankungen (1/16 Tiere = 6,25%) auf.

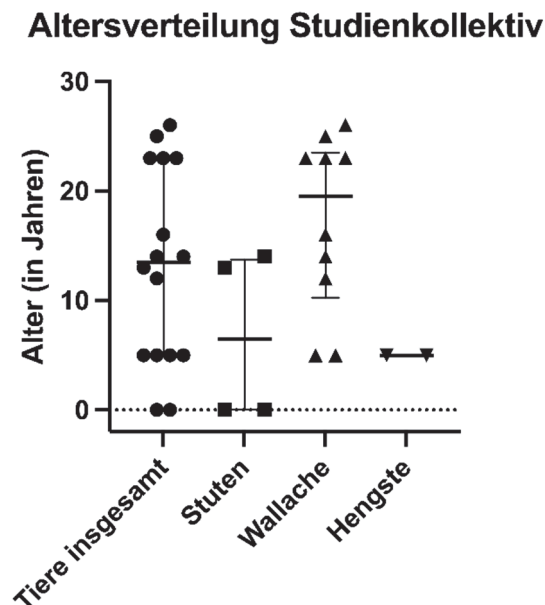


Abb. 11: Altersverteilung des Studienkollektivs.

Es wurden $n = 16$ Tiere in den Versuch einbezogen. Aufgezeigt sind die Mediane mit den Interquartilsbereichen (Fehlerbalken).

4.2. Isolierung und Kultivierung equiner ASCs

4.2.1. Isolierung equiner ASCs

Plastikadhärente ASCs_{-SVF} und ASCs_{-EXP} mit einer Fibroblasten-ähnlichen Morphologie und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung konnten nach dem Kollagenaseverdau und mittels des Explantatverfahrens aus allen drei Fettgewebelokalisationen (abd, rb und sc) gewonnen werden. Während ASCs_{-EXP} innerhalb von einer Woche aus den Explantaten auswuchsen, hefteten sich ASCs_{-SVF} i.d.R. bereits drei bis vier Tage nach Aussaat an den Boden der Kulturgefäße an (**Abb. 12**). Mit dem ersten MW wurden nicht-adhärenente Zellen aus der Kultur entfernt (Selektion durch Plastikadhärenz).

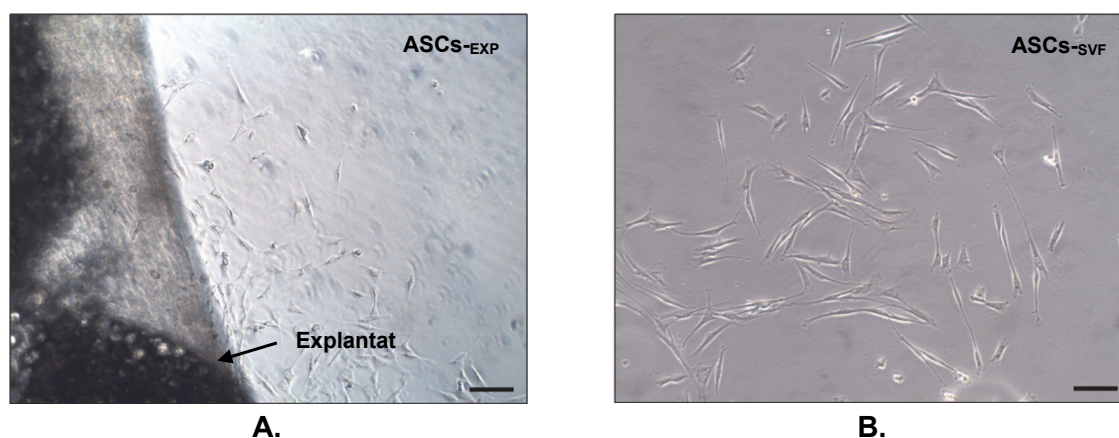


Abb. 12: Durchlichtmikroskopieaufnahmen equiner Präadipozyten nach einwöchiger Kultivierungszeit.

A. Die mithilfe des Explantatverfahrens gewonnenen Präadipozyten (ASCs_{-EXP}) wachsen aus dem Fettgewebestück (Explantat) aus. **B.** Die nach dem Kollagenaseverdau isolierten ASCs_{-SVF} wachsen in kleinen Inseln. Maßstabsbalken: 100 μ m (10x Objektiv).

4.2.2. Messung des Isolierungserfolgs

Mithilfe eines linearen gemischten Modells wurde aufgezeigt, dass die Fettgewebelokalisation einen signifikanten Effekt auf den Isolierungserfolg aufwies ($p = 0,003$), nicht jedoch die Isolationsmethode ($p = 0,12$) und auch nicht die Interaktion zwischen der Isolationsmethode und Lokalisation ($p = 0,19$). Signifikante Unterschiede zwischen ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} wurden nicht nachgewiesen. Während die Isolierung von ASCs_{-EXP} der verschiedenen Lokalisationen vergleichbar erfolgreich war ($p = 0,14$), wiesen sc-ASCs_{-SVF} gegenüber abd- und rb-ASCs_{-SVF} einen signifikant niedrigeren Isolierungserfolg auf ($p = 0,028$ bzw. $p = 0,021$), d.h. weniger sc-ASCs_{-SVF} wuchsen am Boden der Zellkulturflaschen an (**Abb. 13**).

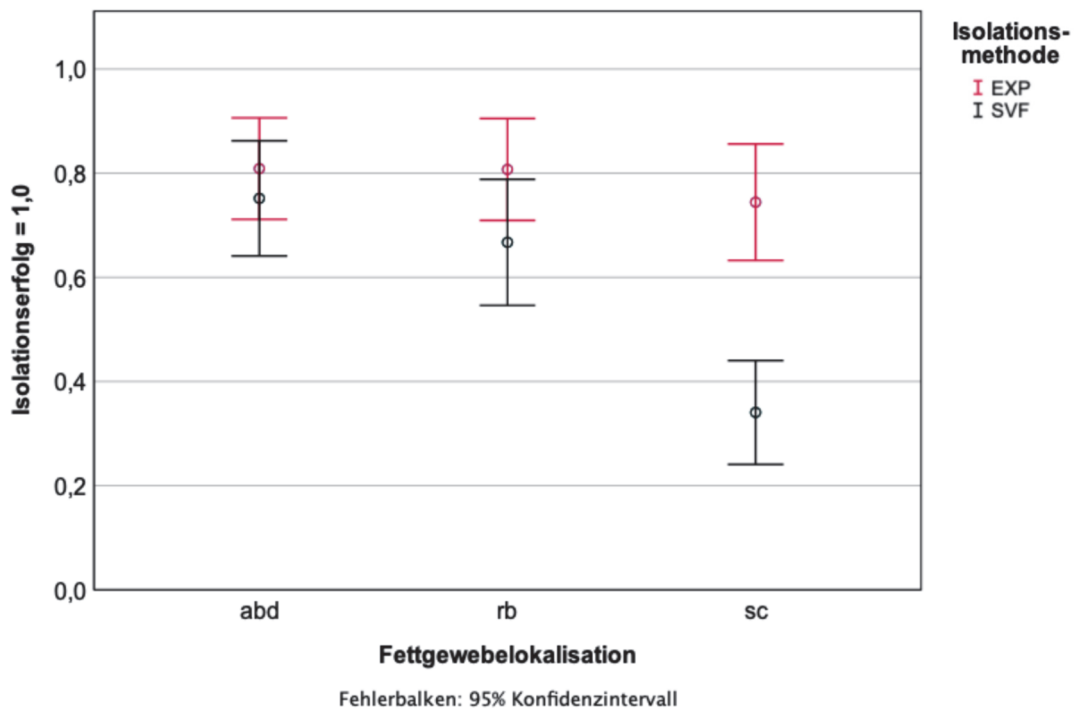


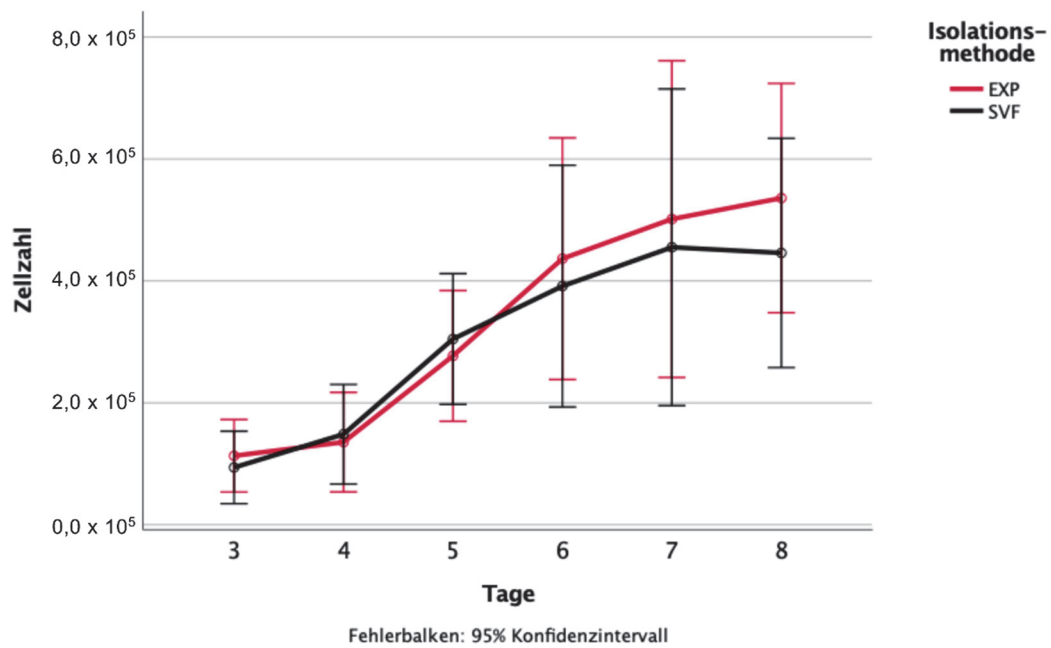
Abb. 13: Darstellung des Isolierungserfolgs equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe.

Der Isolierungserfolg der aus abdominalem (abd), retrobulbärem (rb) und subkutanem (sc) Fettgewebe mittels des Explantat-Verfahrens (EXP, rot) und nach Kollagenaseverdau (SVF, schwarz) gewonnenen Präadipozyten wurde mithilfe eines binären Bewertungssystems analysiert.

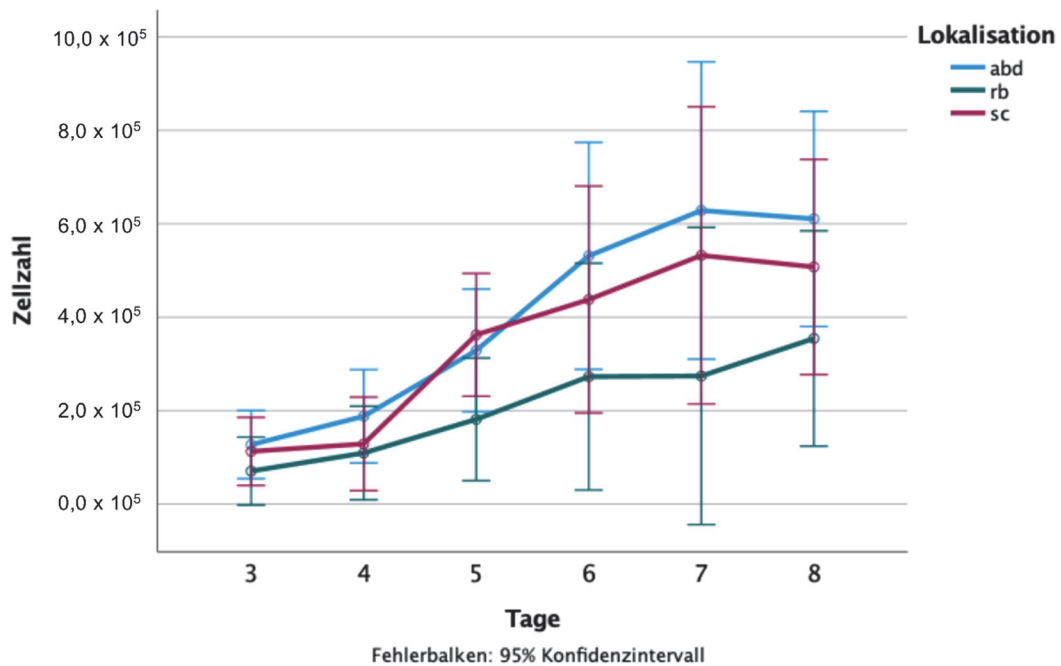
4.2.3. Messung des Proliferationspotentials

ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} der abd-, rb- und sc-Lokalisationen wiesen eine hohe Proliferationsfähigkeit auf. Die Zellen aus P3 adaptierten sich nach dem Aussäen schnell an die Kulturbedingungen (i.d.R. zwei Tage). Bis zum fünften bzw. sechsten Tag zeigten die Zellen ein exponentielles Wachstum, woraufhin das Zellwachstum mit einer verringerten Proliferationsrate fortgesetzt wurde. Abd-ASCs-_{EXP} und sc-ASCs-_{SVF} traten bereits zwischen dem siebten und achten Tag in die Plateauphase ein. Die Zellwachstumskurven sind in **Abb. 14** für die beiden Isolationsmethoden und die unterschiedlichen Lokalisationen dargestellt. Im **Anhang** in **Kap. 9.7.1.**, **Tab. 46** sind die Mittelwerte \pm SD der Zellzahlen aufgelistet. Mittels einer ANOVA mit Messwiederholung konnten signifikante Unterschiede der Zellzahlen zwischen den Tagen ($p < 0,001$), nicht aber zwischen den verschiedenen Lokalisationen ($p = 0,35$) und Isolationsmethoden ($p = 0,64$) beobachtet werden, wobei subjektiv durchlichtmikroskopisch betrachtet abd-ASCs-_{EXP} ein höheres Zellwachstum aufwiesen. Während die Unterschiede der Zellzahlen zwischen den Tagen global signifikant waren, konnte mittels des Greenhouse-Geisser-Tests eine formale Signifikanz allein zwischen den Tagen 4 und 5 ($p < 0,001$), 5 und 6 ($p = 0,007$) sowie 6 und 7 ($p = 0,049$) festgestellt werden. Die Interaktionen zwischen den Tagen und der Lokalisation ($p = 0,35$) bzw. zwischen den Tagen und der Isolationsmethode ($p = 0,64$) wiesen keine statistische Signifikanz auf, d.h.

der Einfluss der Lokalisation und Isolationsmethode war zu den verschiedenen Zeitpunkten gleich.



A.



B.

Abb. 14: Darstellung der Zellwachstumskurven von equinen Präadipozyten der Passage 3.

An den Tagen 3 bis 8 wurde die Proliferationsfähigkeit von ASCs-EXP (rot) und ASCs-SVF (schwarz), die aus abdominalem (abd, blau), retrobulbärem (rb, grün) und subkutanem (sc, dunkelrot) Fettgewebe von $n = 3$ Tieren isoliert wurden, ermittelt. Die Zellzahlen sind für die beiden Isolationsmethoden (A.) und die Lokalisationen (B.) dargestellt.

Die PDT wurde für ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} aus abd-, rb- und sc-Fettgewebe berechnet (tabellarische Auflistung aller Mittelwerte \pm SD siehe **Anhang, Kap. 9.7.1., Tab. 47**), wobei eine hohe PDT für ein langsames Zellwachstum und eine niedrige PDT für ein schnelles Zellwachstum sprach. Weder der Isolationsmethodeeffekt ($p = 0,91$) noch der Lokalisationseffekt ($p = 0,48$) waren signifikant, d.h. die PDT der verschiedenen Isolationsmethoden und Fettgewebe unterschieden sich nicht signifikant. Mittels des Greenhouse-Geisser-Tests konnte kein signifikanter Unterschied der PDT zwischen den Tagen aufgezeigt werden ($p = 0,07$). Auch die Interaktionen zwischen den Tagen und der Lokalisation ($p = 0,60$) bzw. zwischen den Tagen und der Isolationsmethode ($p = 0,06$) wiesen keine Signifikanz auf. In **Abb. 15** ist die PDT für die beiden Isolationsmethoden und die drei Lokalisationen dargestellt.

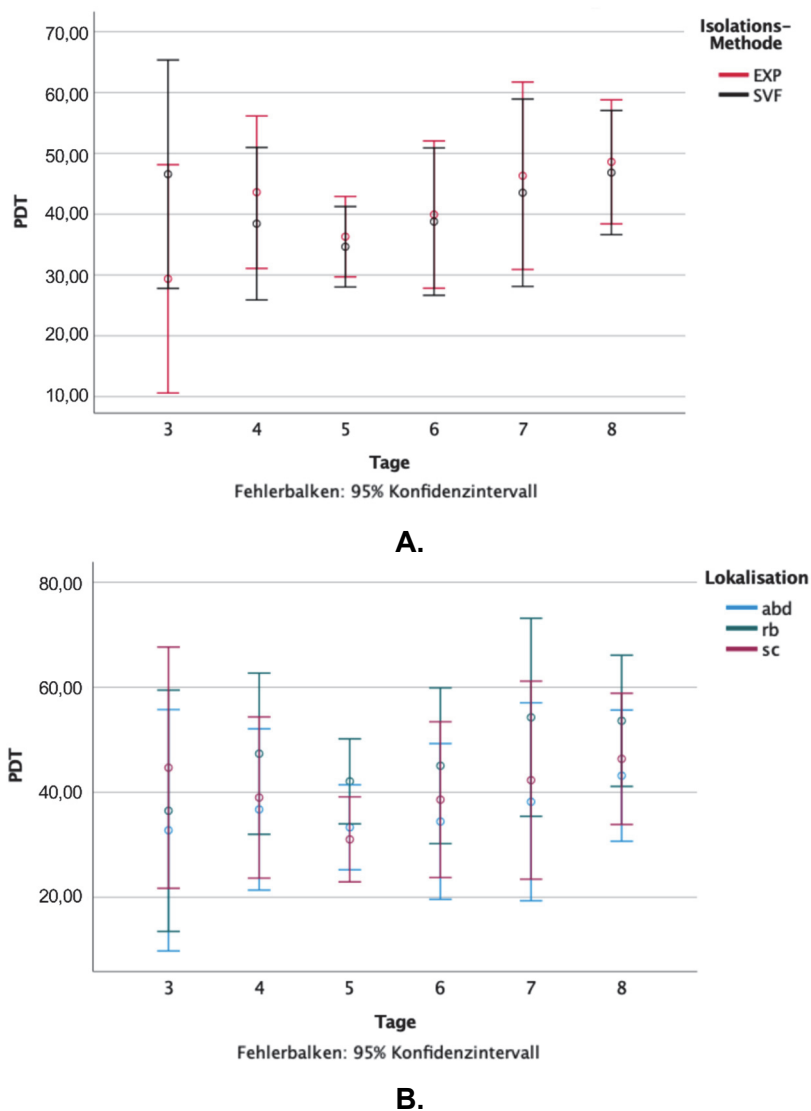


Abb. 15: Darstellung der Populationsverdopplungszeiten equiner Präadipozyten der Passage 3.

An den Tagen 3 bis 8 wurden die PDT von ASCs-_{EXP} (rot) und ASCs-_{SVF} (schwarz), die aus abdominalem, retrobulbärem und subkutanem Fettgewebe (abd, rb, sc) gewonnen wurden, ermittelt. Die PDT (in Stunden) ist für die beiden Isolationsmethoden (**A.**) bzw. die Lokalisationen (**B.**) dargestellt.

4.2.4. Evaluierung geeigneter Zellkultursupplemente (Serumversuch)

In **Abb. 16** ist das für die jeweilige Serumvariante charakteristische Zellbild dargestellt, das über die dreiwöchige Kultivierungszeit beobachtet werden konnte. Während die in 10% FKS kultivierten Zellen subjektiv durchlichtmikroskopisch das langsamste Zellwachstum und teils kleine, hellleuchtende, atypische Zellen als Indikatoren für Zellablösung aufwiesen, zeigten die in 20% FKS sowie der Kombination aus 10% HS und 10% FKS kultivierten Zellen ein deutlich höheres Proliferationspotential mit „Türmchen“-Bildung auf. Dies spiegelte sich auch in der Dauer bis zum Erreichen von 80 bis 90% Konfluenz wider (20% FKS bzw. 10% HS und 10% FKS: i.d.R. < 7 Tage; 10% FKS nach dem zweiten Passagieren: i.d.R. > 7 Tage). Die in 10% HS kultivierten Präadipozyten proliferierten moderat (Dauer bis zum Erreichen von 80 bis 90% Konfluenz nach dem 2. Passagieren: i.d.R. > 7 Tage) und nahmen über die Kultivierungszeit ein zumeist rhombenförmiges Aussehen an, während die anderen Zellen ihre Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie beibehielten.

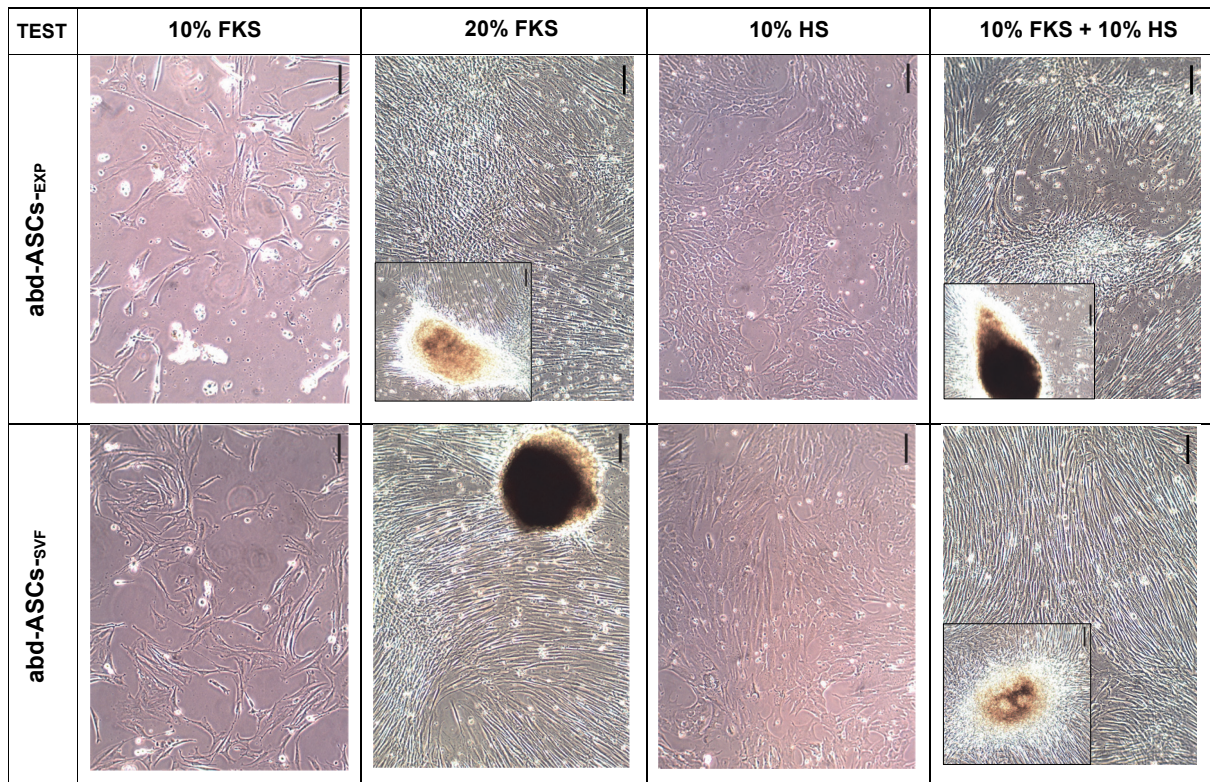


Abb. 16: Darstellung der charakteristischen Zellmorphologie der mit verschiedenen Serumvarianten kultivierten Präadipozyten.

Während die in 20% FKS sowie in 10% HS und 10% FKS kultivierten Präadipozyten (abd-ASCs^{-EXP} und abd-ASCs^{-SVF}) das schnellste Zellwachstum aufwiesen, wiesen die in 10% FKS kultivierten Zellen ein niedrigeres Proliferationspotential und teils atypische, hellleuchtende Zellen als Indikatoren für Zellablösung auf. Die in 10% HS kultivierten Zellen nahmen i.d.R. eine rhombenförmige Zellmorphologie an und proliferierten moderat. Maßstabsbalken: 100 µm (10x Objektiv). **Abkürzungen:** FKS: fetales Kälberserum, HS: Pferdeserum.

Mithilfe einer univariaten Varianzanalyse konnten sowohl für abd-ASCs-_{EXP} als auch abd-ASCs-_{SVF} signifikante Serumvarianteneffekte festgestellt werden ($p = 0,011$ bzw. $p = 0,007$). Bei abd-ASCs-_{EXP} wies der Gesamtscore der 10%-FKS-Variante gegenüber den 20%-FKS- ($p = 0,014$) sowie 10% HS- und 10% FKS-Varianten ($p = 0,020$) einen signifikanten Unterschied auf. Bei abd-ASCs-_{SVF} konnten signifikante Unterschiede des Gesamtscores zwischen der 10% FKS-Variante und den 20% FKS- ($p = 0,011$), 10% HS- ($p = 0,032$) sowie 10% HS- und 10% FKS-Varianten ($p = 0,011$) festgestellt werden (**Abb. 17**). Die 10% FKS-Variante wies folglich den niedrigsten Gesamtscore und das langsamste Zellwachstum auf. Zwischen abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} konnten weder signifikante Isolationsmethodeeffekte ($p = 0,61$) noch signifikante Interaktionseffekte zwischen der Serumvariante und der Isolationsmethode ($p = 0,77$) beobachtet werden, d.h. die Serumeffekte wurden unabhängig von der Isolationsmethode erzielt. Auf Grundlage der Resultate wurde in den Folgeversuchen für die Kultivierung der Zellen standardmäßig 20% FKS als Kultursupplement eingesetzt.

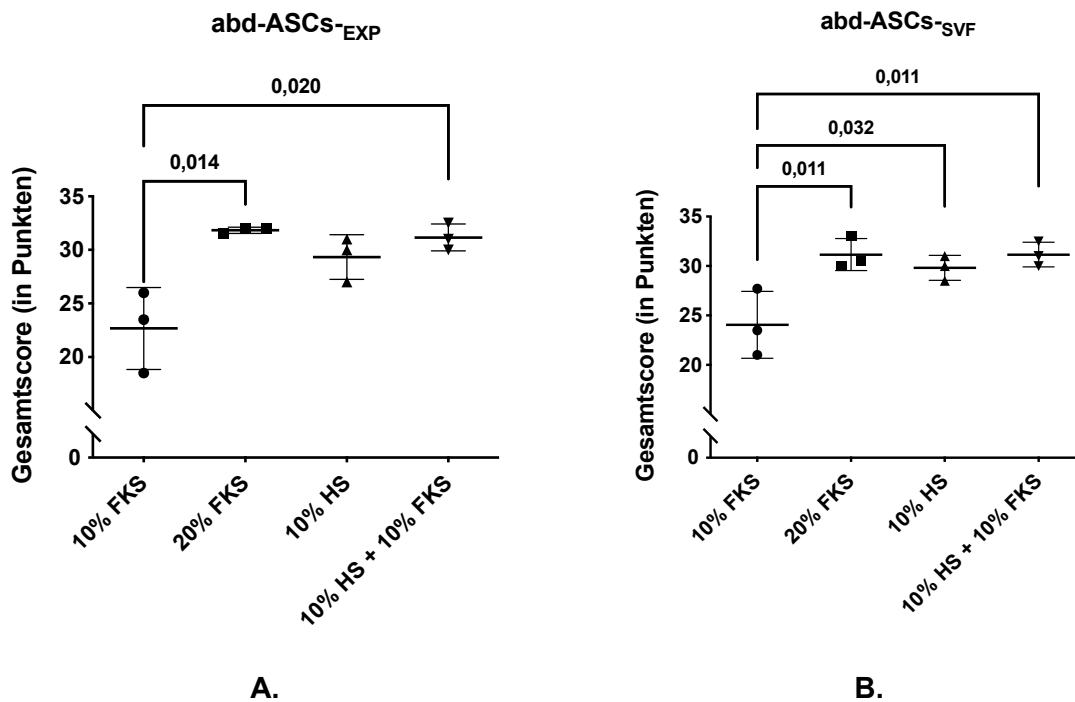


Abb. 17: Beurteilung der für die Kultivierung equiner Präadipozyten geeigneten Serumzusätze auf Grundlage eines Scoring-Systems.

Präadipozyten (abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF}) von $n = 3$ Tieren wurden 21 Tage in mit verschiedenen Seren (10% FKS, 20% FKS, 10% HS oder 10% HS und 10% FKS) supplementierten Kulturmedien kultiviert und die Effekte des Serums auf das Zellwachstum mithilfe eines Punktevergabesystems bewertet. Dargestellt ist der Gesamtscore für abd-ASCs-_{EXP} (**A.**) und abd-ASCs-_{SVF} (**B.**). Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen als Fehlerbalken angezeigt. Eine univariate Varianzanalyse wurde durchgeführt und eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen.

4.3. Tripotentes Differenzierungspotential equiner ASCs

4.3.1. Adipogene Differenzierung

4.3.1.1. Zellmorphologie

Durchlichtmikroskopisch konnte fünf Tage nach Induktion die Bildung erster intrazellulärer Lipidtröpfchen beobachtet werden. Diese wurde mittels eines Scoring-Systems quantifiziert, wobei aufgezeigt wurde, dass weder der Isolationsmethodeneffekt (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,49$) noch der Lokalisationseffekt (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,11$) signifikant waren, d.h. die Adipogenese-Aktivität zwischen den Zellen war vergleichbar. 14 Tage nach Induktionsstart konnten bei allen Proben intrazelluläre Lipidtröpfchen beobachtet werden (Ausnahme: rb-ASCs-_{EXP} eines Tieres). Die Zellmorphologie veränderte sich von Fibroblasten-ähnlichen zu großen rhomben- und tropfenförmigen Zellen, die Lipidtröpfchen bildeten. Diese Lipidtröpfchen nahmen mit der Zeit an Größe zu. Die NK behielten ihre spindelförmige Zellform bei und bildeten zunehmend „Türmchen“ (**Abb. 18**).

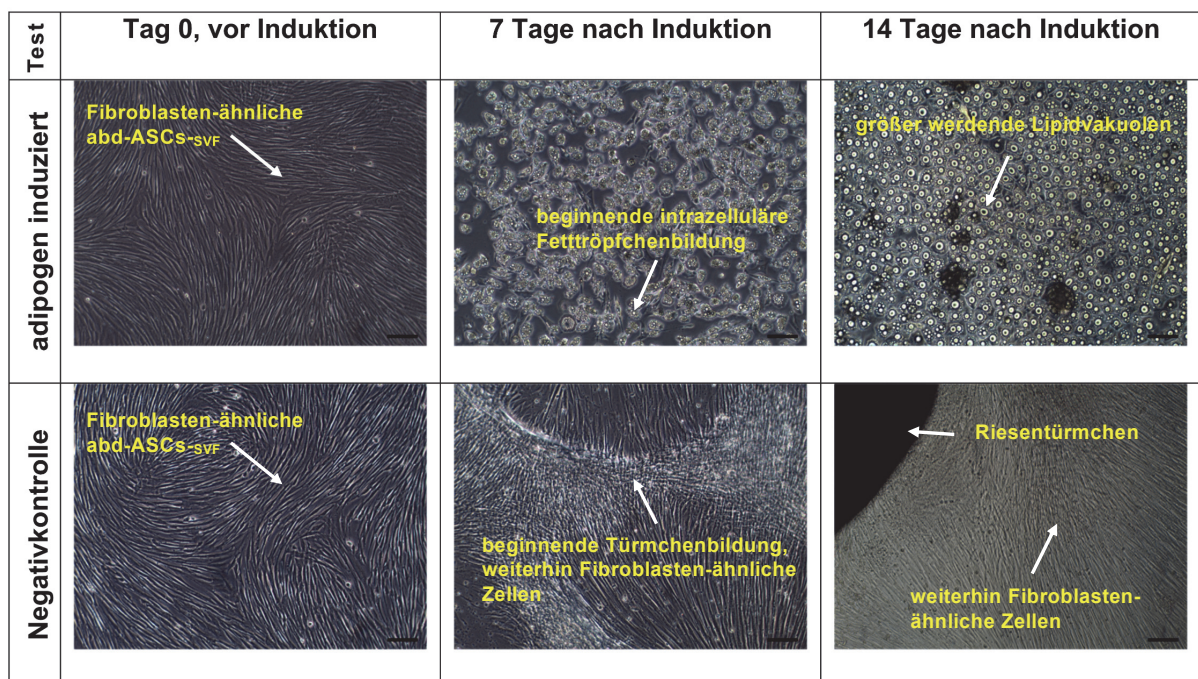


Abb. 18: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der adipogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.

Dargestellt ist die Zellmorphologie vor (Tag 0) und nach Induktion (Tag 7 und 14) sowie der Negativkontrollen. Während die induzierten Zellen intrazelluläre Lipidtröpfchen bildeten, wurden diese bei den NK nicht nachgewiesen. Hier konnte lediglich „Türmchen“-Bildung beobachtet werden. Maßstabsbalken: 100 μm (10x Objektiv).

4.3.1.2. Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Bei Vergleich der induzierten ASCs-_{EXP} der abd-, rb- und sc-Lokalisation konnte ein signifikanter Lokalisationseffekt nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test: $p < 0,001$). Abd-ASCs-_{EXP} wiesen eine signifikant höhere GPDH-Aktivität gegenüber rb-ASCs-_{EXP}

($p < 0,001$) und $sc\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ ($p < 0,001$) auf, nicht jedoch $rb\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ gegenüber $sc\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ ($p > 0,99$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Isolationsmethoden EXP und SVF wurde bei induzierten $abd\text{-ASCs}$ nicht festgestellt (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,28$). Bei Vergleich der GPDH-Aktivität der induzierten Zellen und der NK konnte bei $abd\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ und $abd\text{-ASCs}_{\text{-SVF}}$ ein signifikanter Behandlungseffekt nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test: je $p < 0,001$). Bei $rb\text{-}$ und $sc\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ konnten keine GPDH-Aktivitäten (Ausnahme: $rb\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ eines Tieres) und somit keine signifikanten Behandlungseffekte nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test: $rb\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$: $p = 0,18$, $sc\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$: $p = 0,51$). Ausgeschlossen von den Messungen wurden $abd\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ von zwei Tieren, da die für die Untersuchung erforderliche Zielzellzahl ($\sim 1 \times 10^6$ Zellen) aufgrund von Zellablösung unterschritten wurde. In **Abb. 19** sind die GPDH-Aktivitäten für die adipogen induzierten Zellen und NK der verschiedenen Lokalisationen und Isolationsmethoden dargestellt.

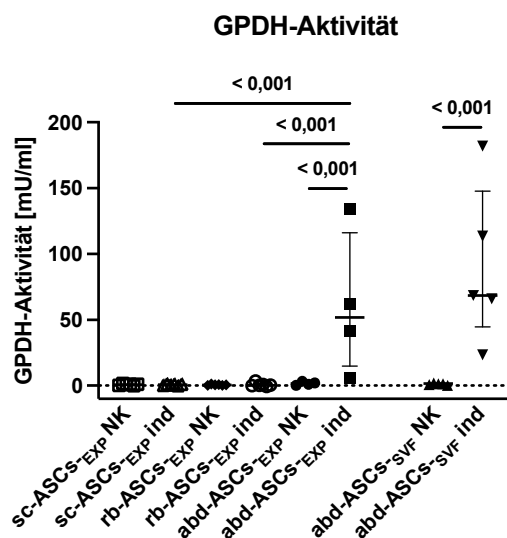


Abb. 19: Messung der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH)-Aktivität.

Die GPDH-Aktivität (Ordinate) der adipogen induzierten equinen Präadipozyten (ASCs), die aus abdominalem (abd), retrobulbärem (rb) und subkutanem (sc) Fettgewebe (Abszisse) von $n = 6$ Tieren isoliert wurden, wurde 7 Tage nach Induktion (ind) gemessen. Es wurden nicht-induzierte Negativkontrollen (NK) mitgeführt. Aufgezeigt ist der Median mit dem Interquartilsabstand als Fehlerbalken. Als statistische Tests wurden der Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test angewendet, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen wurde.

4.3.1.3. Messung der gebildeten intrazellulären Lipide

Nach der Nilrot-Färbung konnte analog zur durchlichtmikroskopischen Beobachtung eine Lipidbildung in ASCs aller Proben fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden (Ausnahme: $rb\text{-ASCs}_{\text{-EXP}}$ eines Tieres), wobei nach subjektivem Eindruck $abd\text{-ASCs}_{\text{-SVF}}$ am meisten Lipidtröpfchen aufwies. Während DAPI die Zellkerne blau färbte, nahmen nicht-polare Lipide eine grüne und Gesamtlipide eine rote Farbe an. Die Lipidtröpfchenbildung wurde im rot-grün-Overlay (Merge) dargestellt (**Abb. 20**).

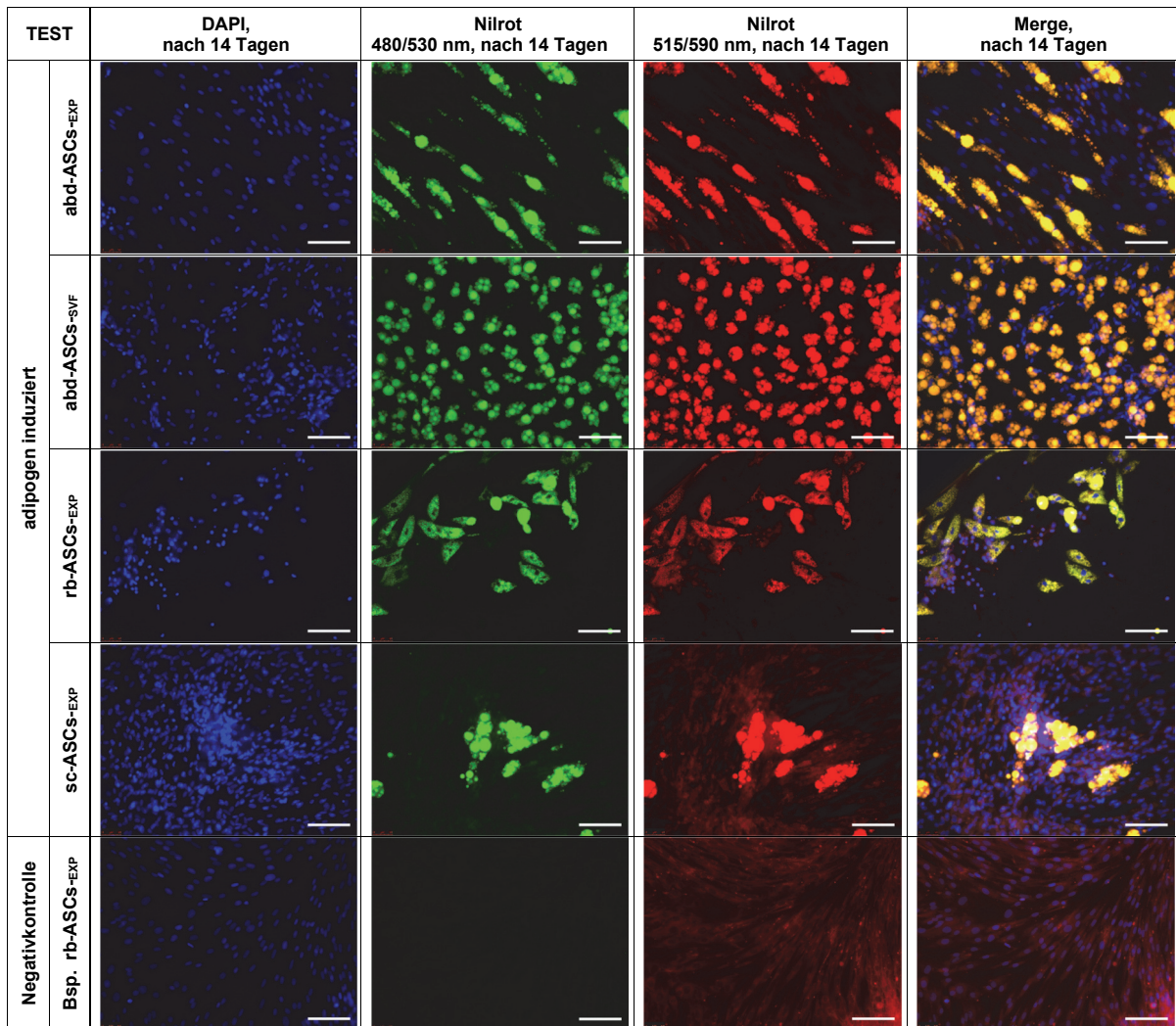


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen nach Nilrot- und DAPI-Färbung der adipogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.

Die aus abdominalem (abd), retrobulbärem (rb) und subkutanem (sc) Fettgewebe mittels des Explantationsverfahrens (EXP) bzw. nach Kollagenaseverdau (SVF) gewonnenen Präadipozyten (ASCs) wurden an Tag 14 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es konnten bei allen induzierten Proben Lipidtröpfchen nachgewiesen werden, abgesehen von den nicht-induzierten Negativkontrollen. Die nicht-polare Lipide färbten sich grün, die Gesamtlipide rot (Nilrot) und die Zellkerne blau an (DAPI). Maßstabsbalken: 100 µm (20 x Objektiv).

4.3.1.4. Messung der Lipid-Nuclei-Ratio

Nach zweiwöchiger Differenzierungszeit zeigte sich, dass zwischen den induzierten ASCs-EXP der abd-, rb- und sc-Lokalisation in Bezug auf die Lipid-Nuclei-Ratio kein signifikanter Unterschied vorlag (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,078$). Beim Vergleich der beiden Isolationsmethoden (abd-ASCs-EXP und abd-ASCs-SVF) konnte hingegen ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,020$), d.h. induzierte abd-ASCs-SVF zeigten eine signifikant höhere Lipid-Nuclei-Ratio im Vergleich zu induzierten abd-ASCs-EXP auf (**Abb. 21**). Die Behandlungseffekte erwiesen sich für abd-ASCs-EXP, abd-ASCs-SVF, rb-ASCs-EXP und sc-ASCs-EXP als signifikant (Mann-Whitney-U-Test:

je $p < 0,001$), d.h. alle induzierten Proben wiesen gegenüber den entsprechenden nicht-induzierten NK eine signifikant höhere Lipid-Nuclei-Ratio auf.

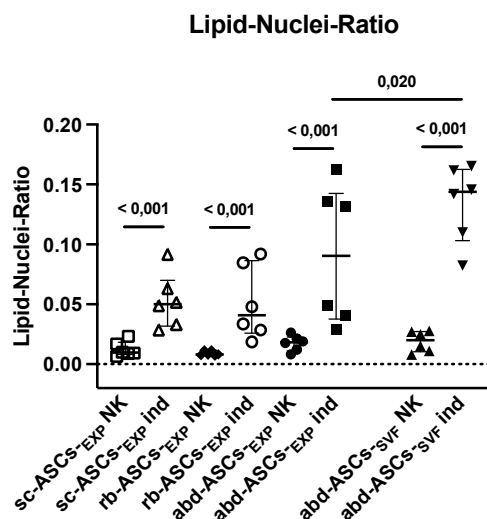


Abb. 21: Lipid-Nuclei-Ratio adipogen induzierter equiner Präadipozyten.

Dargestellt ist die Lipid-Nuclei-Ratio (Ordinate) an Tag 14 für abd-ASCs-_{EXP}, abd-ASCs-_{SVF}, rb-ASCs-_{EXP} und sc-ASCs-_{EXP} (Abszisse) nach Induktion (ind) sowie für die nicht-induzierten Negativkontrollen (NK). Aufgezeigt ist der Median mit dem Interquartilsabstand (Fehlerbalken) der in den Versuch einbezogenen $n = 6$ Pferde. Als statistische Tests wurden der Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test durchgeführt und eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen.

4.3.2. Osteogene Differenzierung

4.3.2.1. Zellmorphologie

Durchlichtmikroskopisch konnten ab Tag 11 nach Induktion erste punktförmige, hellleuchtende Ablagerungen in der extrazellulären Matrix (EZM) beobachtet werden, die an Tag 14 bei allen Proben festgestellt werden konnten, wobei auffiel, dass sich im weiteren Verlauf der Induktion die hellleuchtenden in schwärzliche, punktförmige Ablagerungen umwandelten. Diese Kalziumphosphat-Ablagerungen wurden insbesondere in den Randbereichen der Kulturgefäße beobachtet, nahmen bis Tag 21 an Größe zu und stellten sich als punkt- und knötchenförmige sowie teils flächenhaft schwärzliche EZM-Ablagerungen dar. Abd-ASCs-_{EXP} wiesen subjektiv durchlichtmikroskopisch betrachtet den höchsten Anteil dieser und ein Tier insgesamt den niedrigsten Anteil auf. In den NK wurden keine EZM-Ablagerungen beobachtet (**Abb. 22**).

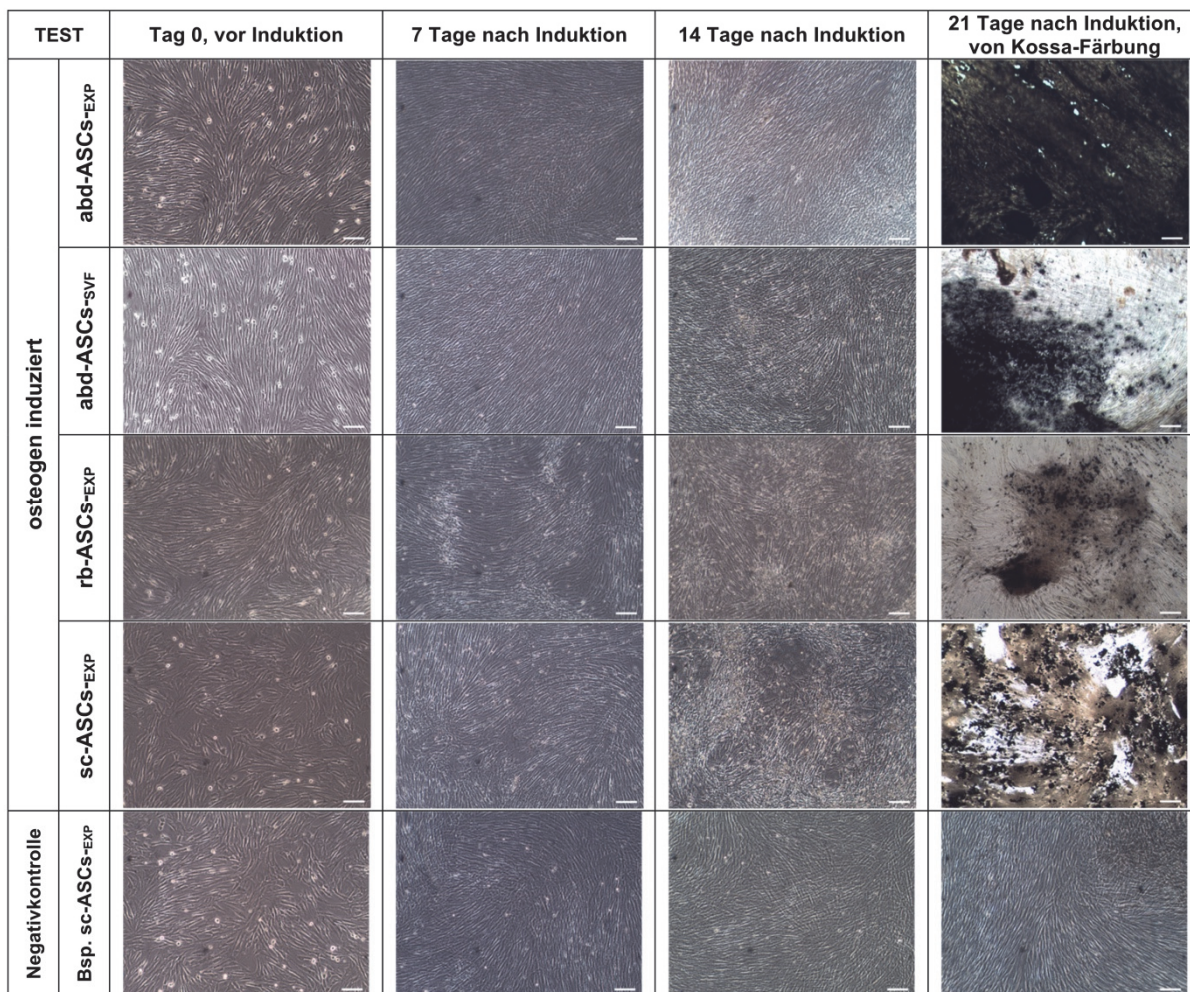


Abb. 22: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung equiner Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung equiner Präadipozyten (abd-ASCs^{-EXP}, abd-ASCs^{-SVF}, rb-ASCs^{-EXP} und sc-ASCs^{-EXP}) vor (Tag 0) und nach Induktion (Tag 7, 14 und 21). Induzierte Zellen wiesen gegenüber nicht-induzierten Negativkontrollen (hier am Bsp. von sc-ASCs^{-EXP} dargestellt) zwei Wochen nach Induktion helleuchtende, punktförmige, extrazelluläre Ablagerungen auf, die sich zunehmend in schwärzliche Ablagerungen umwandelten. Der Nachweis der Kalziumphosphatablagerungen an Tag 21 erfolgte mithilfe der Von Kossa-Färbung. Maßstabsbalken: 100 µm (10x Objektiv).

4.3.2.2. Messung der Alkalischen-Phosphatase-Aktivität

Bei der Bewertung des osteogenen Differenzierungspotentials über die Bestimmung der ALP-Aktivität konnte bei Vergleich der abd-ASCs^{-EXP}, rb-ASCs^{-EXP} und sc-ASCs^{-EXP} bei den induzierten Zellen kein signifikanter Lokalisationseffekt nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,06$), d.h. signifikante Unterschiede der ALP-Aktivität bei den einzelnen Lokalisationen lagen nicht vor. Es wurde kein signifikanter Isolationsmethodeneffekt bei Vergleich der abd-ASCs^{-EXP} und abd-ASCs^{-SVF} festgestellt (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,38$), d.h. abd-ASCs^{-EXP} unterschieden sich nicht signifikant von abd-ASCs^{-SVF}. In Bezug auf den Behandlungseffekt erwies sich die Enzymaktivität der ALP bei allen induzierten Proben,

abgesehen von einem Tier, gegenüber den NK als leicht erhöht, wobei eine signifikant erhöhte ALP-Aktivität nur bei sc-ASCs-_{EXP} ind vs. NK (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,033$) festgestellt werden konnte, nicht aber bei abd-ASCs-_{EXP} ($p = 0,21$), abd-ASCs-_{SVF} ($p = 0,18$) und rb-ASCs-_{EXP} ($p = 0,41$). In **Abb. 23** sind die Enzymaktivitäten der induzierten Zellen und NK dargestellt.

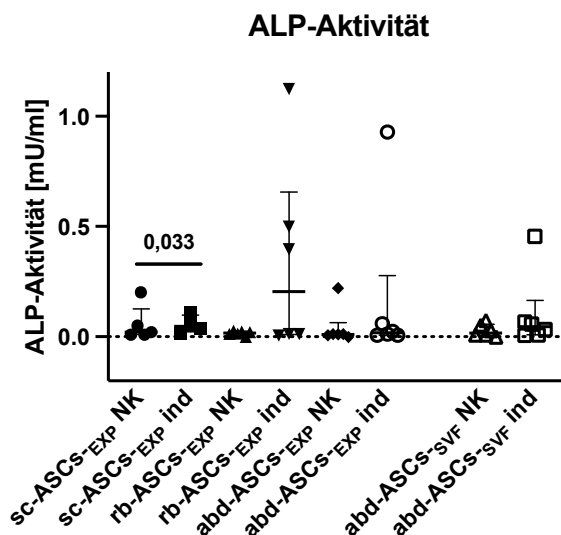


Abb. 23: Darstellung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität der osteogen induzierten equinen Präadipozyten an Tag 14.

Für abd-ASCs-_{EXP}, abd-ASCs-_{SVF}, rb-ASCs-_{EXP} und sc-ASCs-_{EXP} (Abszisse) sind die ALP-Aktivitäten (Ordinate) von $n = 6$ Donoren nach osteogener Induktion (ind) und für die nicht-induzierten Negativkontrollen (NK) aufgezeigt. Dargestellt sind die Mediane mit dem Interquartilsabstand als Fehlerbalken. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4.3.2.3. Messung des Index der osteogenen Differenzierung

Zur Semiquantifizierung der Kalziumphosphatablagerungen wurde an Tag 21 nach der Von Kossa-Färbung und der photometrischen Messung der Extinktionen der Index der osteogenen Differenzierung (IOD) ermittelt. Die Resultate sind in **Abb. 24** dargestellt. Es wurde ein signifikanter Lokalisationseffekt festgestellt (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,049$). Abd-ASCs-_{EXP} wiesen gegenüber rb-ASCs-_{EXP} einen signifikant höheren IOD auf ($p = 0,047$). Die anderen Lokalisationen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (rb-ASCs-_{EXP} vs. sc-ASCs-_{EXP}: $> 0,99$; abd-ASCs-_{EXP} vs. sc-ASCs-_{EXP}: $p = 0,33$). Abd-ASCs der EXP-Methode wiesen einen signifikant höheren IOD als abd-ASCs der SVF-Methode auf (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,005$).

Index der osteogenen Differenzierung (IOD)

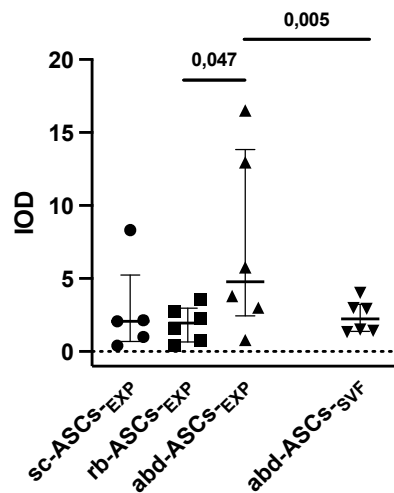


Abb. 24: Darstellung der Indizes der osteogenen Differenzierung (IOD) der osteogen induzierten und nach Von Kossa angefärbten equinen Präadipozyten.

In den Versuch wurden Präadipozyten (abd-ASCs-EXP, abd-ASCs-SVF, rb-ASCs-EXP und sc-ASCs-EXP) von $n = 6$ Tieren einbezogen. Im Dotplot sind die für die verschiedenen Zellen (Abszisse) berechneten IOD-Werte (Ordinate) dargestellt. Aufgezeigt werden der Median und der Interquartilsabstand (Fehlerbalken). Als statistische Tests wurden der Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4.3.3. Chondrogene Differenzierung

4.3.3.1. Makroskopische Beurteilung

Die chondrogen induzierten Zellpellets wiesen über die dreiwöchige Induktionszeit eine Strukturveränderung (Scheibenform bis i.d.R. Tag 3, Kugelform ab i.d.R. Tag 4) sowie Zunahme der Dichte, Festigkeit und Größe auf. Die Radiusgröße des Pellets wurde an Tag 21 auf ca. $1 \times 1 \times 1$ mm geschätzt. Die als Monolayer kultivierten nicht-induzierten NK behielten die charakteristische Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie bei und bildeten „Türmchen“.

4.3.3.1.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In allen untersuchten histologischen Schnittpräparaten konnte subjektiv durchlichtmikroskopisch ein Prozess der Chondrogenese beobachtet werden. Es wurden neben spindelförmigen Zellen auch Chondroblasten und Chondrozyten mit ihren typischen Lakunen beobachtet, die von einer interzellulären Matrix (Knorpelgrundsubstanz) umgeben waren. Diese wurde teilweise von Kollagenfasern durchzogen. Die induzierten Zellpellets ähnelten streckenweise hyalinem Knorpel. Während sich die Zellkerne bläulich anfärbten, stellten sich die Kollagenfasern, das Zytoplasma und die Zellwände rötlich dar (**Abb. 25**). Pyknotische bzw. nekrotische Zellen wurden nicht beobachtet. Die Zelldichte war moderat bis hoch.

4.3.3.1.2. Messung der gebildeten Mukopolysaccharide

Die in der gebildeten Knorpelmatrix von den Chondroblasten produzierten sauren Mukopolysaccharide färbten sich nach der Alcianblau-Färbung bläulich an und die Zellkerne nach der Kernechtrot-Färbung rötlich. Es konnten bei allen Proben (abd-ASCs-^{EXP}, abd-ASCs-^{SVF}, rb-ASCs-^{EXP} und sc-ASCs-^{SVF}) eine Anreicherung saurer Mukopolysaccharide nachgewiesen werden, wobei keine Kondition subjektiv durchlichtmikroskopisch hinsichtlich des chondrogenen Differenzierungspotentials (blaue Farbintensität, Menge der akkumulierten Matrix und Zellmorphologie) präferiert werden konnte (**Abb. 25**).

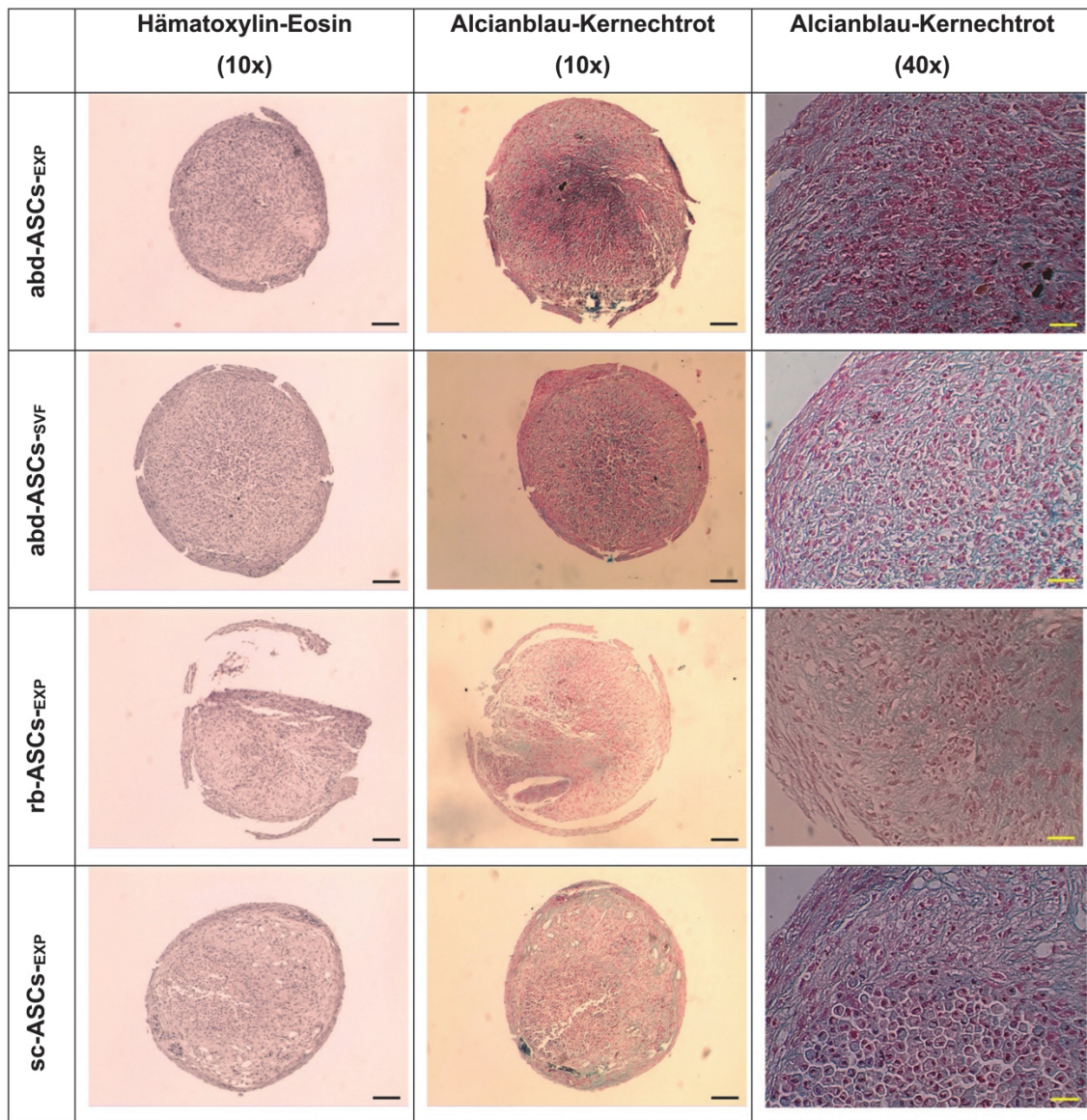


Abb. 25: Durchlichtmikroskopische Aufnahmen der chondrogen induzierten equinen Präadipozyten eines repräsentativen Tieres.

Dargestellt sind die an Tag 21 mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Alcianblau (AB)-Kernechtrot (KR) angefärbten chondrogen induzierten equinen Präadipozyten (abd-ASCs-^{EXP}, abd-ASCs-^{SVF}, rb-ASCs-^{EXP} und sc-ASCs-^{SVF}). Die Mukopolysaccharide wurden mithilfe der AB-Färbung nachgewiesen. Maßstabsbalken (schwarz): 100 µm (10x Objektiv), Maßstabsbalken (gelb): 25 µm (40x Objektiv).

4.3.3.1.3. Modifizierter „Bern-Score“

In Bezug auf die Bewertung der chondrogenen Differenzierung mithilfe des modifizierten „Bern-Scores“ erwiesen sich bei Vergleich der abd-, rb- und sc-ASCs-_{EXP} weder die Fettgewebelokalisation als signifikant unterschiedlich (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,15$) noch bei Vergleich der abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} die Isolationsmethode (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,66$). Es konnte in Übereinstimmung zur subjektiv durchlichtmikroskopischen Beobachtung keine Isolationsmethode und Lokalisation hinsichtlich des chondrogenen Differenzierungspotentials präferiert werden (**Abb. 26**).

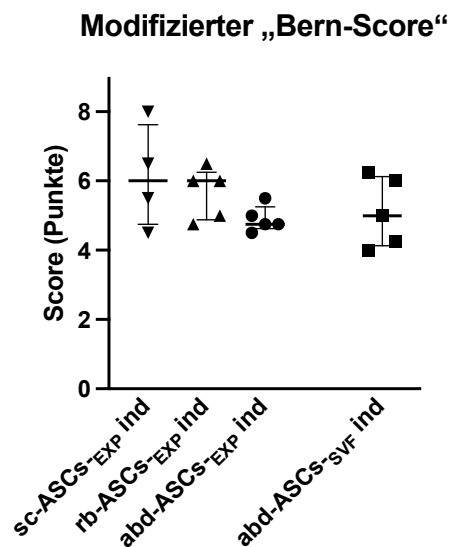


Abb. 26: Bewertung der chondrogenen Differenzierung equiner Präadipozyten mithilfe des modifizierten „Bern-Scores“ (nach Grogan et al. 2006).

Aus ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} der abdominalen (abd), retrobulbären (rb) und subkutanen (sc)-Lokalisation wurden Zellpellets hergestellt, diese chondrogen induziert und an Tag 21 die Chondrogenese über ein Punktevergabesystem bewertet. In den Versuch wurden $n = 6$ Donortiere einbezogen, wobei die Anfertigung histologischer Schnittpräparate aufgrund der kleinen Größe der Zellpellets nicht bei allen Proben möglich war. Auf der Ordinate ist die durchschnittliche Gesamtpunktzahl für die verschiedenen Präadipozyten auf der Abszisse dargestellt. Zudem werden der Median und der Interquartilsabstand (Fehlerbalken) aufgezeigt ($n = 4$ bis 5).

4.4. Immunologische Methoden zur Immunphänotypisierung equiner ASCs

Die durchflusszytometrische Untersuchung bestätigte die Anwesenheit der MSC-assoziierten Oberflächenmarkermoleküle CD29 (Mittelwert \pm SD, abd-ASCs-EXP: $99,7 \pm 0,42\%$; abd-ASCs-SVF: $100 \pm 0,00\%$), CD44 (abd-ASCs-EXP: $99,9 \pm 0,26\%$; abd-ASCs-SVF: $99,9 \pm 0,05\%$) und CD90 (abd-ASCs-EXP: $96,7 \pm 4,20$; abd-ASCs-SVF: $96,4 \pm 3,23\%$) und das Fehlen der negativen Marker CD34 (abd-ASCs-EXP: $0,44 \pm 0,46\%$; abd-ASCs-SVF: $0,38 \pm 0,30\%$) und CD45 (abd-ASCs-EXP: $1,42 \pm 0,41\%$; abd-ASCs-SVF: $1,40 \pm 0,64\%$) auf der Oberfläche der abd-ASCs-EXP und abd-ASCs-SVF. CD105 wurde in der vorliegenden Studie nicht exprimiert (abd-ASCs-EXP: $1,68 \pm 2,01\%$; abd-ASCs-SVF: $1,18 \pm 0,77\%$). Die Zellviabilität war vergleichbar zwischen abd-ASCs-EXP und abd-ASCs-SVF und betrug $70,4 \pm 10,8\%$ (abd-ASCs-EXP) bzw. $69,3 \pm 7,75\%$ (abd-ASCs-SVF). In Bezug auf die Homogenität der ASCs-Population konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen abd-ASCs-EXP und abd-ASCs-SVF hinsichtlich der Oberflächenmarkerexpression festgestellt werden (CD29: $p = 0,31$, CD34: $p = 0,42$; CD44: $p = 0,42$; CD45: $p = 0,10$; CD90: $p = 0,15$; CD105: $p > 0,99$; Zellviabilität: $p > 0,99$).

Equine PBMC und BAL-Makrophagen (Positivkontrollen) bestätigten die erwarteten Bindungsmuster für CD29 (Mittelwert \pm SD, PBMC: $36,8 \pm 16,1\%$, BAL: $31,9 \pm 3,5\%$), CD44 (PBMC: $94,3 \pm 7,4\%$, BAL: $91,6 \pm 2,4\%$), CD45 (PBMC: $22,3 \pm 12,9\%$, BAL: $18,6 \pm 3,5\%$) und CD90 (PBMC: $29,1 \pm 17,0\%$, BAL: $17,9 \pm 12,5\%$), während hingegen CD34 (PBMC: $0,34 \pm 0,51\%$, BAL: $0,0 \pm 0,0\%$) und CD105 (PBMC: $0,20 \pm 0,45\%$, BAL: $0,9 \pm 0,0\%$) nicht auf der Oberfläche von PBMC und BAL detektiert werden konnten. Zudem konnten durch die Verwendung von Isotypkontrollen unspezifische Hintergrundstrahlungen der Primärantikörper ausgeschlossen werden. Die FACS-Resultate sind in **Abb. 27** dargestellt.

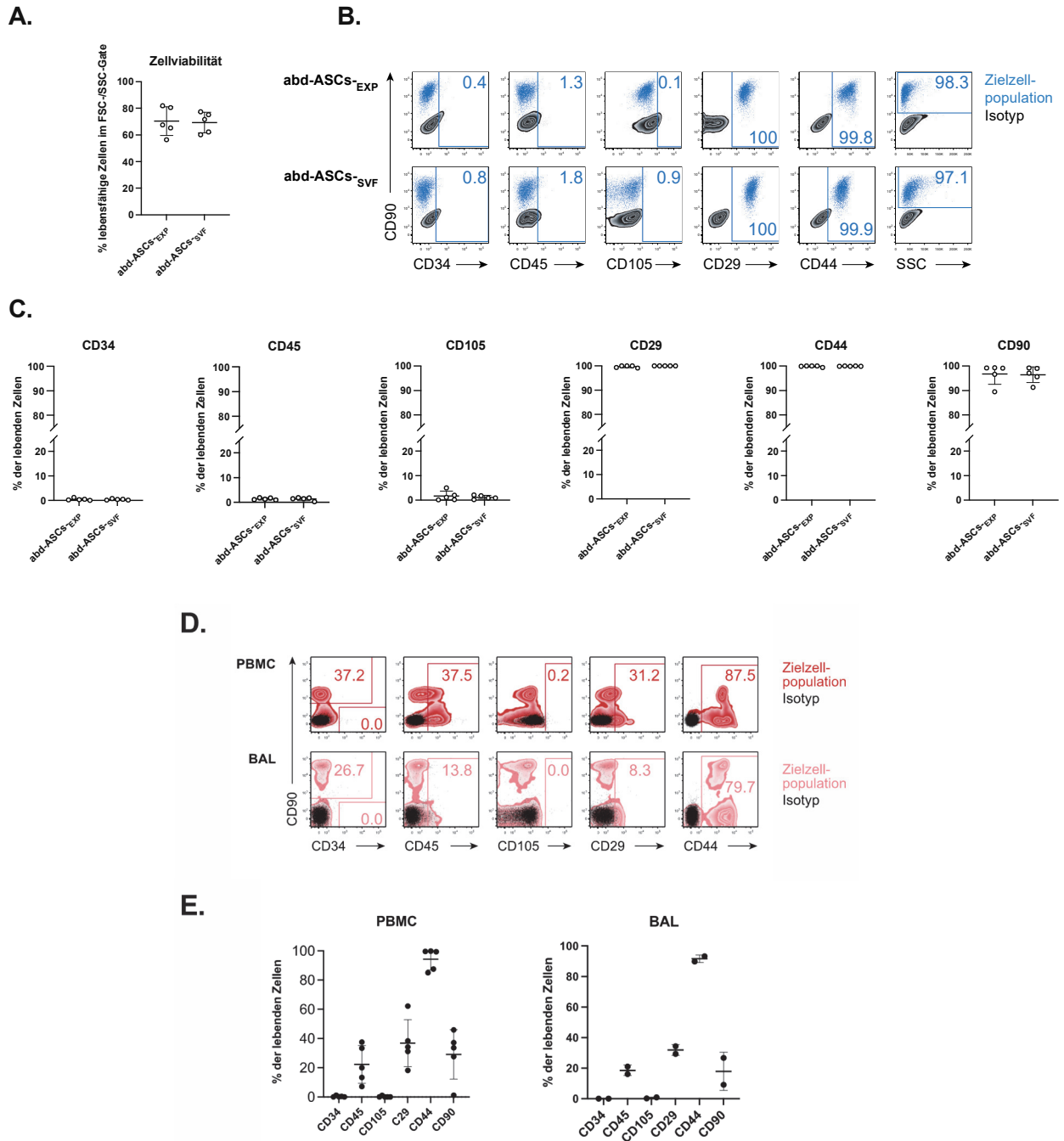


Abb. 27: Charakterisierung equiner Präadipozyten mittels Durchflusszytometrie.

A. Viabilität der mittels des Kollagenaseverdaus (SVF) und des Explantatverfahrens (EXP) gewonnenen Präadipozyten aus abdominalem Fettgewebe (abd-ASCs). **B.** Oberflächenmarkerexpression von abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF}. Es werden repräsentativ „Overlay-Plots“ der vollständig gefärbten Zellen (Zielzellpopulation: blaue Punktewolke) sowie der Isotypkontrollen (schwarzes Plot) dargestellt. Die Prozentzahlen zeigen die Höhe der Expression der Oberflächenmarker. **C.** CD-Markerexpression der abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF}. Die Daten wurden aus drei (abd-ASCs-_{EXP}) und zwei (abd-ASCs-_{SVF}) unabhängigen Versuchen gepoolt, wobei jeweils ein bis drei Donoren untersucht wurden. **D.** Als Positivkontrollen wurden zur Untersuchung der Antikörperbindung mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von $n = 5$ Donoren (Graphik oben) sowie mittels bronchoalveolärer Lavage (BAL) gewonnene Makrophagen von $n = 2$ Donoren untersucht. Die „Overlay-Plots“ zeigen die Fluoreszenzsignale auf, die mithilfe von Isotypkontrollen (schwarze Punktewolken) und vollständig gefärbten Zellen (rote Punktewolken) detektiert wurden. **E.** Die Dotplots stellen die CD-Markerexpression der PBMC von $n = 5$ Donoren und der BAL-Makrophagen von $n = 2$ Donoren dar. **Abkürzungen:** FSC: Vorwärtstreuung, SSC: Seitwärtstreuung.

4.5. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs

4.5.1. Zellmorphologische Ergebnisse

4.5.1.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin

Die in 10 μ M 5-AZA für 48 h inkubierten equinen abd-ASCs-SVF wiesen zum Zeitpunkt T3 weder zellmorphologische Veränderungen in Richtung eines kardiomyozytären Phänotyps (stab- bzw. kugelförmige Zellmorphologie, myotubenähnliche Strukturen, Zell-Zell-Verbindungen und Zwei- oder Mehrkernbildung) (**Abb. 28**) noch spontane Schlagaktivitäten auf. Abd-ASCs-SVF von zwei der fünf Donoren behielten unabhängig von der 5-AZA-Exposition ihre Fibroblasten-ähnliche, spindelförmige Zellmorphologie bei und zeigten eine mäßige, beginnende „Türmchen“-Bildung aufgrund eines überkonfluenten Zellwachstums. Bei den drei übrigen der fünf Donoren wurden eine teilweise stark ausgeprägte „Türmchen“-Bildung sowie teils starke Zellablösung und Zelltod der in unbeschichteten Zellkulturflaschen kultivierten Zellen beobachtet. Als Indikatoren für diese Zellablösung wurden durchlichtmikroskopisch atypische kleine Zellen mit einem hellleuchtenden Kern sowie atypische Mitosen-ähnliche Zellen festgestellt. Subjektiv betrachtet konnten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Zellmorphologie bei den induzierten und nicht-induzierten abd-ASCs-SVF festgestellt werden.

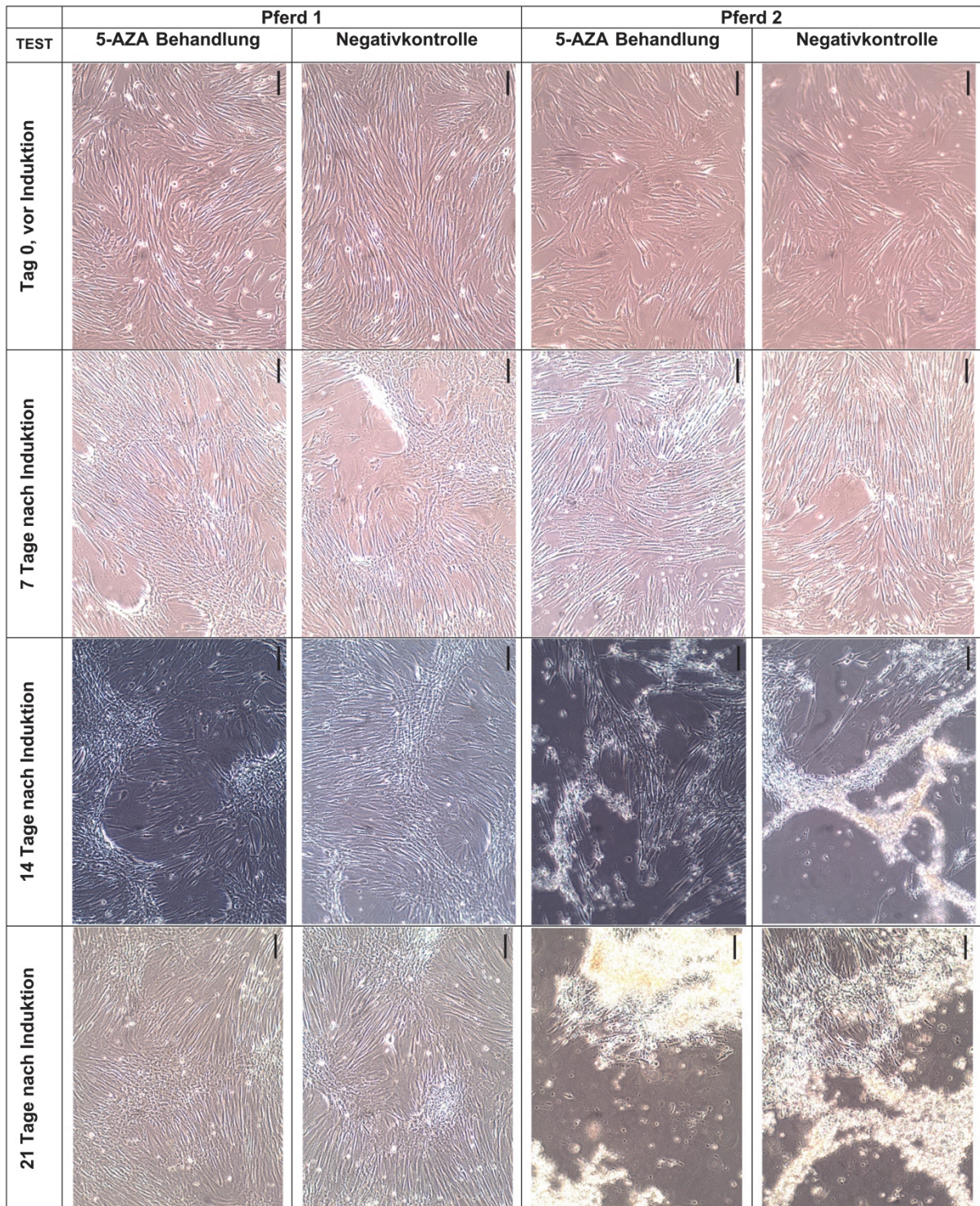


Abb. 28: Zellmorphologie der mit 5-Azacytidin kardiomyogen induzierten equinen Präadipozyten.

Equine Präadipozyten (abd-ASCs_{svf}) von zwei repräsentativen Pferden wurden mit 10 µM 5-Azacytidin (5-AZA) für 48 h induziert. Die Zellmorphologie ist zu den Zeitpunkten vor (Tag 0) und 7, 14 und 21 Tage nach Induktion dargestellt. Unterschiede zwischen den induzierten und nicht-induzierten Zellen waren zu keinem Zeitpunkt ersichtlich. Während Pferd 1 zu jedem Zeitpunkt die charakteristische Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie sowie eine Woche nach Induktion eine mäßige „Türmchen“-Bildung aufwies, wurden bei Pferd 2 ab Tag 14 atypische kleine Zellen, die auf eine deutliche Zellablösung hindeuten, beobachtet. Maßstabsbalken: 100 µm (10x Objektiv).

4.5.1.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1

Nach aufeinanderfolgender Inkubation mit Act A (24 h), BMP-4 (96 h) und DKK-1 (48 h) konnten weder eine veränderte Zellmorphologie noch eine spontane Schlagaktivität bei abd-ASCs-SVF beobachtet werden, auch nicht nach Variation der Konzentrationen der Induktionsfaktoren in den beiden Teilversuchen. Zu keinem Zeitpunkt konnten Unterschiede zwischen den induzierten und nicht-induzierten Zellen festgestellt werden. Die Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie veränderte sich nicht und es kam über die dreiwöchige Induktionszeit aufgrund des überkonfluenten Wachstums i.d.R. zur „Türmchen“-Bildung, die bei den $n = 5$ Donortieren unterschiedlich stark ausgeprägt war (1. Teilversuch: geringgradig: $n = 1$, mittelgradig: $n = 3$, hochgradig: $n = 1$; 2. Teilversuch: geringgradig: $n = 3$, mittelgradig: $n = 1$, hochgradig: $n = 1$). Bei Einsatz von Laminin als Beschichtung konnten, abgesehen von je einem Tier im ersten und zweiten Teilversuch, keine Zellablösung und darauf hinweisende atypische kleine Zellen mit einem helleuchtenden Kern beobachtet werden. **Abb. 29** und **Abb. 30** zeigen für zwei repräsentative Tiere die Zellmorphologie zu den Zeitpunkten T0 und T3 im ersten und zweiten Teilversuch auf.

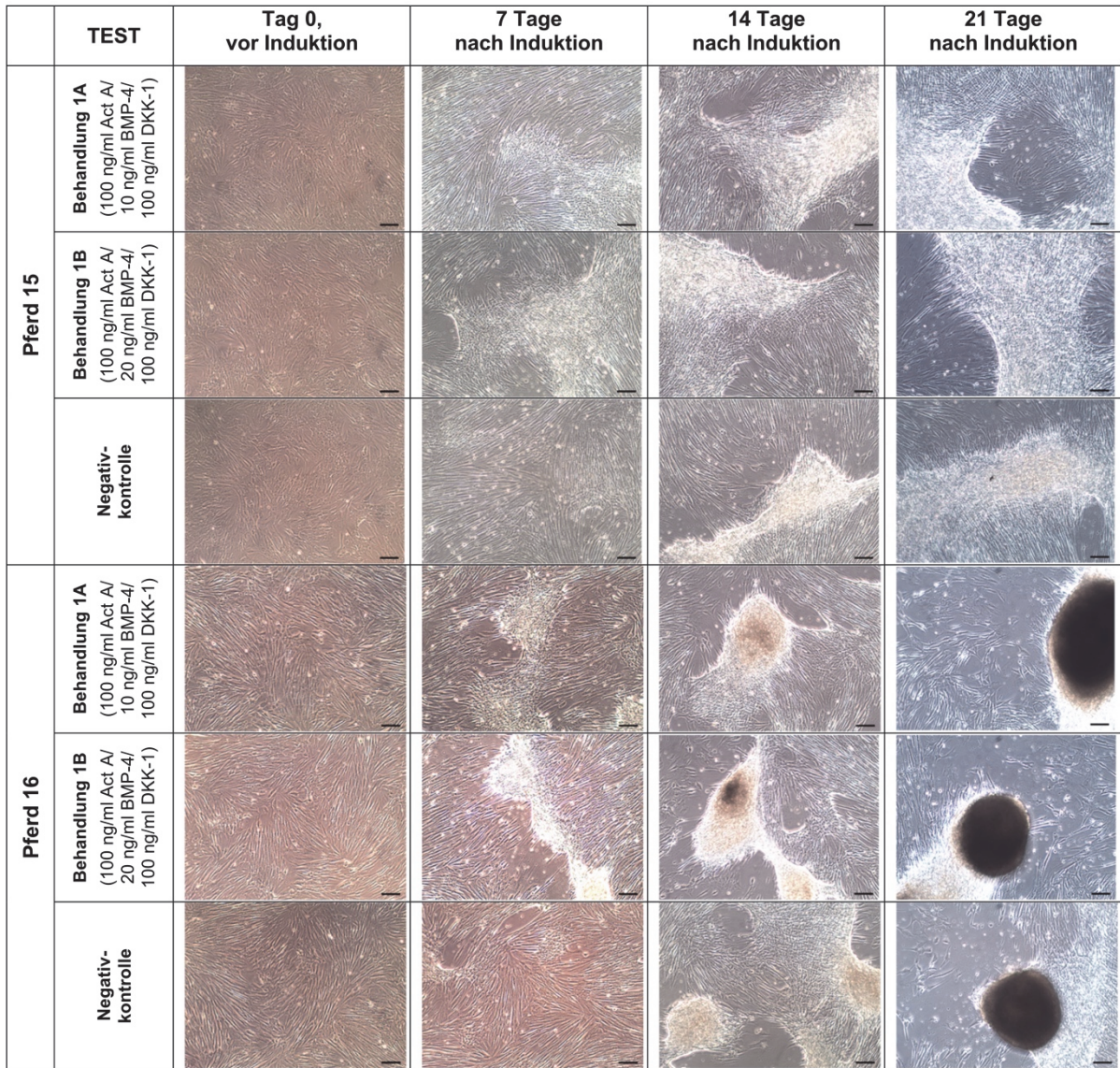


Abb. 29: Zellmorphologie der mithilfe von Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 induzierten equinen Präadipozyten (1. Teilversuch).

Die Zellmorphologie von zwei repräsentativen Pferden ist vor (Tag 0) und 7, 14 und 21 Tage nach der kardiomyogenen Induktion dargestellt, wobei sich zwischen den verschiedenen Behandlungen (Protokolle 1A und 1B) und der Negativkontrolle keine relevanten Unterschiede feststellen ließen. Eine kardiomyogene Differenzierung wurde nicht erzielt. Die Zellen behielten ihre Fibroblasten-ähnliche Zellmorphologie und bildeten „Türmchen“, die bei Tier 16 insbesondere zum Zeitpunkt T3 deutlich ausgeprägter gegenüber Tier 15 waren. Maßstab: 100 µm (10x Objektiv). **Abkürzungen:** Act A: Activin A, BMP-4: knochenmorphogenetisches Protein-4, DKK-1: Dickkopf-1.

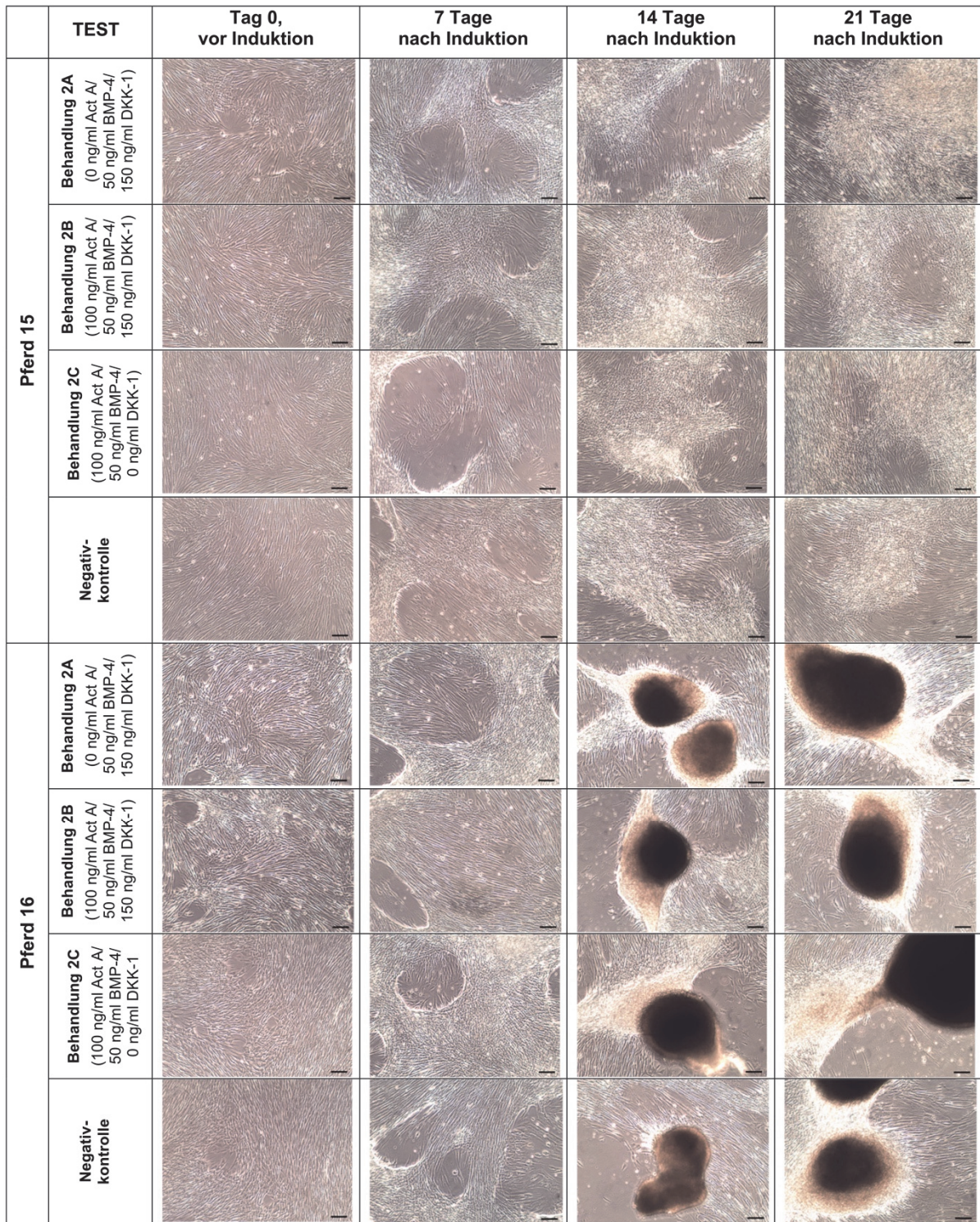


Abb. 30: Zellmorphologie der equinen Präadipozyten vor und nach Induktion mit den Faktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1 (2. Teilversuch).

Durchlichtmikroskopiebilder der kardiomyogen induzierten Präadipozyten sind für zwei repräsentative Pferde an den Tagen 0, 7, 14 und 21 dargestellt, wobei ersichtlich wird, dass die Zellen ungeachtet der Induktion (Protokolle 2A, 2B und 2C) ihre spindelförmige Morphologie beibehielten sowie eine geringgradige (Tier 15) bzw. hochgradige (Tier 16) „Türmchen“-Bildung aufwiesen. Maßstab: 100 µm (10x Objektiv). **Abkürzungen:** Act A: Activin A, BMP-4: knochenmorphogenetisches Protein-4, DKK-1: Dickkopf-1.

4.5.2. Molekularbiologische Ergebnisse

Bevor die Ergebnisse der SYBR Green RT-qPCR der kardiomyogenen Differenzierungsversuche im Einzelnen beschrieben werden, folgt anlehnend an **Kap.3.7.** eine Darstellung der Resultate der vorab durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen.

4.5.2.1. RNA-Isolierung

Bei der spektralphotometrischen Analyse der Gesamt-RNA mittels NanoPhotometer® (Fa. Implen) wurde bei allen untersuchten Proben eine durchschnittliche RNA-Konzentration von 101 ng/µl bis 2062 ng/µl (Mittelwert ± SD: 998,1 ng/µl ± 509,1) ermittelt. Die Ratio A260/280 betrug $2,04 \pm 0,04$ (Referenzbereich: 1,8–2,0) und die Ratio A260/230 $2,24 \pm 0,16$ (Referenzbereich: > 1,7). Alle Proben lagen im Referenzbereich, abgesehen von Probe Nr. 12745 (A260/230-Ratio: 1,7). Es konnten keine bis nur sehr geringe Kontaminationen mit Proteinen (Extinktionen bei 260/280 nm) sowie Phenolen (Extinktionen bei 260/230 nm) festgestellt werden. Bei der kapillarelektrophoretischen Untersuchung mittels des Agilent RNA 6000 Nanokits (Fa. Agilent) zeigten alle Proben RIN-Werte nahe 10 auf (Mittelwert ± SD: $9,62 \pm 0,68$; Soll-Wert: 6–10). Pro Probe konnten zwei ribosomale Peaks (18S und 28S) und eine flache Grundlinie zwischen 29 s und dem 18S-Peak im Elektropherogramm nachgewiesen werden, die einen erfolgreichen Gesamt-RNA-Durchlauf kennzeichneten. Die RNA-Proben wiesen auf Grundlage der photometrischen und mikroelektrophoretischen Untersuchungen eine hohe Qualität und Integrität auf und RNA-Degradation konnte ausgeschlossen werden. Eine reverse Transkription (cDNA-Synthese) wurde angeschlossen.

4.5.2.2. Gelelektrophorese nach kPCR

Mittels kPCR konnte die Funktionsfähigkeit und Produktstabilität der in der vorliegenden Arbeit hergestellten Primer nachgewiesen werden. Die erhaltenen Amplifikate wurden gelelektrophoretisch in Bezug zum Größenstandard (HyperLadder™) überprüft. Alle amplifizierte Sequenzen wiesen die zu erwartenden Basenpaar- bzw. Lauflängen auf (**Abb. 31**). Unspezifische Nebenprodukte wurden ausgeschlossen.

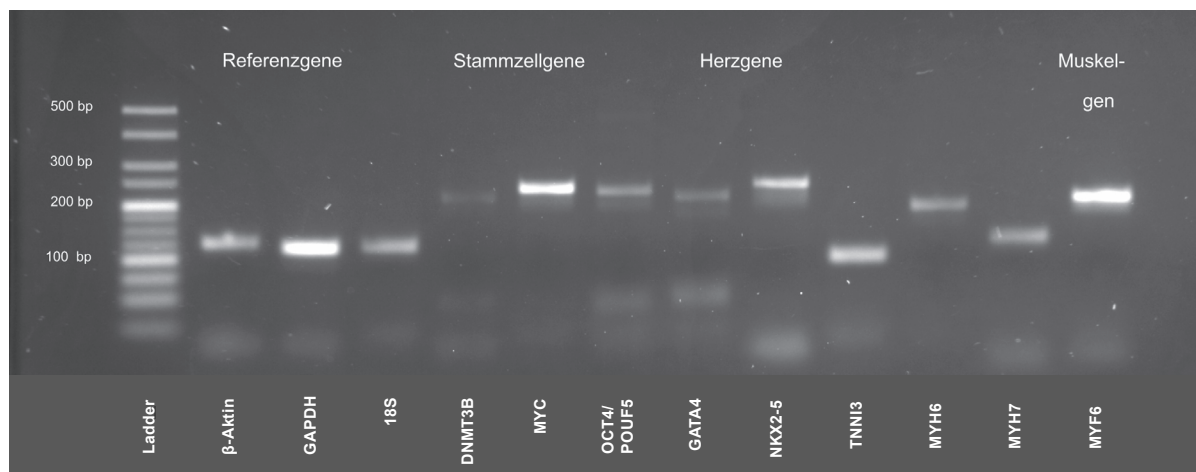


Abb. 31: Agarose-Gelelektrophorese nach kPCR.

Es wurde für drei Referenzgene (*ACTB*, *GAPDH*, *18S*), drei equine Stammzellgene (*DNMT3B*, *MYC*, *OCT4/POUF5*), fünf equine kardiale Gene (*GATA4*, *Nkx2.5*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7*) sowie ein equines Muskelgen (*MYF6*) nach der kPCR eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die reverse Transkription fand mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit (Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH) und die kPCR mit dem Taq PCR Master Mix Kit (Fa. Qiagen) statt. Es wurde ein HyperLadder™ 25–500 bp (Fa. Biorline) verwendet.

4.5.2.3. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungsergebnisse der PCR-Produkte wurden für Homologievergleiche genutzt. Im kodierenden Bereich wurden Homologien der Nukleotidprodukte von 100% bei der Spezies Pferd (*Equus caballus*) ermittelt. Das Vorhandensein von Kreuzhomologien mit anderen *Equidae*-Spezies und dem Menschen wurden überprüft und Homologien von i.d.R. über 88% nachgewiesen, abgesehen von *GATA4* und *DNMT3B* beim Menschen (0% Homologie).

4.5.2.4. Effizienzanalyse und Gradientenlauf

Im Rahmen der Effizienzanalyse konnten für alle untersuchten Gene (*ACTB*, *GAPDH*, *RN18S*, *OCT4/POUF5*, *MYC*, *DNMT3B*, *GATA4*, *NKX2-5*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7* und *MYF6*) PCR-Effizienzen von 90–110% ermittelt werden (Ausnahme *GAPDH*: 89%). Die Steigungen lagen im angestrebten Wertebereich (Werte von –3,122 bis –3,621). Aufgrund der leicht unterschiedlichen PCR-Effizienzen wurden in der RT-qPCR die Template-Konzentrationen angepasst. Die Regressionsanalyse wird für das Zielgen *TNNI3* in **Abb. 32** aufgezeigt.

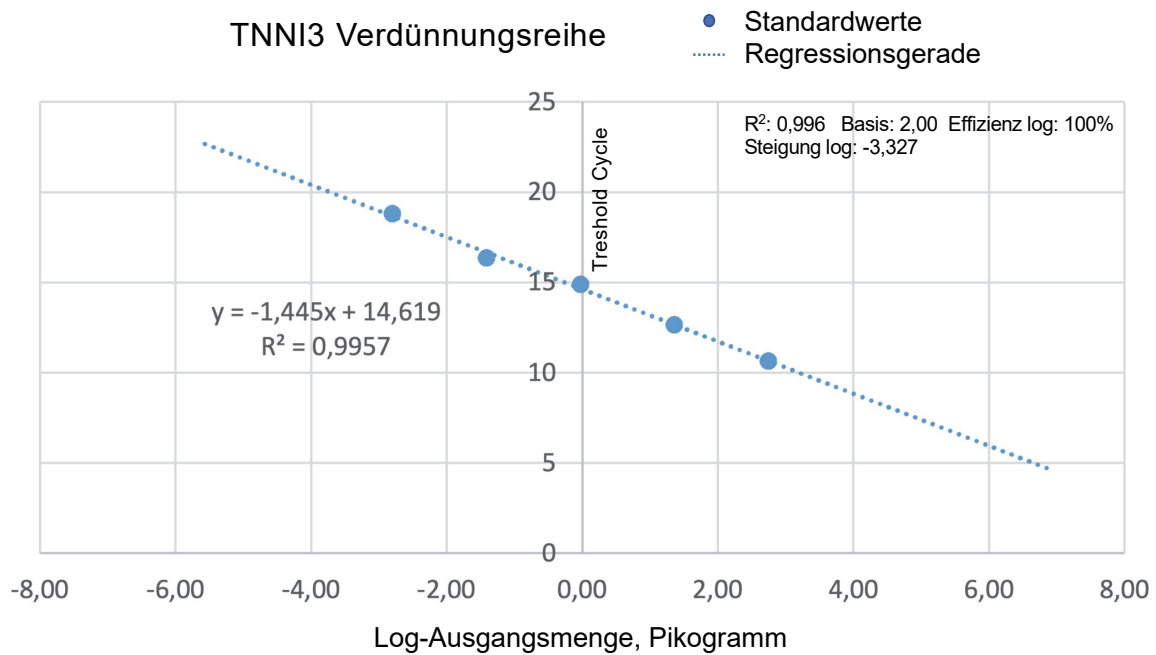


Abb. 32: Regressionsanalyse am Beispiel des Zielgens TNNI3.

Auf der Abszisse ist die relative log-Ausgangsmenge der mRNA des Zielgens (in Pikogramm) gegen den C_T -Wert auf der Ordinate aufgetragen. Die PCR-Effizienz errechnet sich aus der Steigung (slope) der Regressionsgerade (-3,327) und beträgt 100%.

Die PCR-Effizienzdaten, die berechneten T_a Opt-Werte und die für ausgewählte Zielgene (*OCT4/POUF5*, *GATA4*, *TNNI3* und *MYH7*) im jeweiligen Gradientenlauf ermittelten T_a Opt-Werte sind dem **Anhang (Kap. 9.6., Tab. 45)** zu entnehmen.

4.5.2.5. Referenzgene

Die Referenzgene *ACTB*, *GAPDH* und *RN18S* erwiesen sich auf Grundlage der Auswertung mittels geNorm als expressionsstabil. Die M-Werte (Genstabilitätswerte) betragen durchschnittlich für *ACTB* $M = 0,088$, für *GAPDH* $M = 0,068$ und für *RN18S* $M = 0,079$. Da *GAPDH* den niedrigsten M-Wert, d.h. die höchste Expressionsstabilität aufwies und der M-Wert deutlich unterhalb des von geNorm festgelegten Grenzwertes von $M = 1,5$ lag, wurde dieses Referenzgen auf jeder RT-qPCR-Platte als „IRC-GAPDH“ mitgeführt.

4.5.2.6. RT-qPCR-Kontrollen

Kontaminationen mit gDNA konnten weder innerhalb der RT-qPCR-Läufe (NTC) noch innerhalb der RNA-Extraktionen (NRT) nachgewiesen werden. Nicht kontaminierte RNA-Proben wiesen die gleiche Amplifikationskurve wie NTC- und NRT-Proben auf, da in dieser Reaktion kein DNA-Template für eine Amplifikation vorlag. Die auf jeder 96-Well-Platte mit dem Referenzgen GAPDH mitgeführte IRC wurde nach jedem Versuchsansatz auf dieses Referenzgen kalibriert, sodass Plattenunterschiede zwischen den einzelnen RT-qPCR-Läufen vermieden wurden.

4.5.2.7. Schmelzkurvenanalyse

Unspezifische PCR-Nebenprodukte mit niedrigeren Schmelzpunkten traten nicht auf und der ermittelte Schmelzpunkt konnte auf das amplifizierte Produkt zurückgeführt werden (siehe **Abb. 33**). Die Schmelzkurvenmaxima der RT-qPCR-Läufe entsprachen den zuvor mittels des „T_m Calculator(s)“ ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) (siehe **Anhang, Kap. 9.6., Tab. 45**).

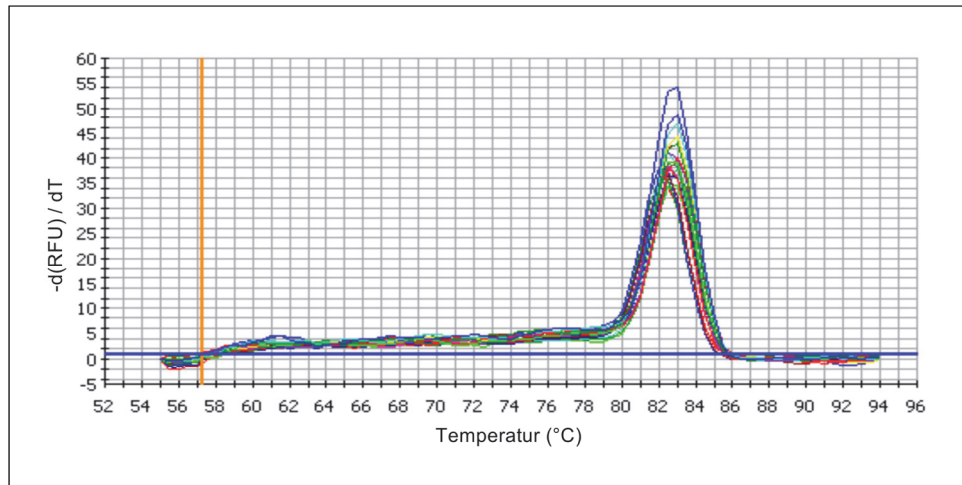


Abb. 33: Darstellung der Schmelzkurve (Dissoziationskurve) am Beispiel des Zielgens TNNI3.

Die Temperatur in °C (Abszisse) wurde gegen die relative Fluoreszenzabnahme (Ordinate) aufgetragen. Die produktspezifische Schmelztemperatur (in °C) wurde im Bereich des Peaks abgelesen und betrug 82,5°C. Die Reaktion war spezifisch, da keine weiteren Peaks vorhanden waren.

4.5.2.8. SYBR Green RT-qPCR Resultate der kardiomyogenen Differenzierungsversuche

Auf Grundlage der in den Kap. 4.5.2.1.–4.5.2.7. erhobenen Resultate wurde die SYBR Green RT-qPCR innerhalb der kardiomyogenen Differenzierungsversuche durchgeführt.

4.5.2.8.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin

Die Induktion mit 5-AZA führte bei abd-ASCs_{SVF} unter den gewählten Versuchsbedingungen wider Erwarten nicht zu einer Hochregulation der kardialen Marker *NKX2-5*, *GATA4*, *MYH6*, *MYH7* und *TNNI3* auf Grundlage des Genexpressionsprofils der PK, d.h. eine kardiomyogene Induktion wurde nicht erzielt. Auch eine Hochregulierung des Muskelmarkers *MYF6* wurde nicht beobachtet und eine myogene Differenzierung ausgeschlossen. Zum Zeitpunkt T0 konnten die Expressionen der pluripotenzassoziierten Marker *MYC* und *OCT4/POUF5* nachgewiesen werden. Sowohl in den mit 5-AZA-induzierten Zellen (*MYC*: T0 vs. T3-ind: $p < 0,001$; *OCT4/POUF5*: T0 vs. T3-ind: $p = 0,001$) als auch nicht-induzierten NK (*MYC*: T0 vs. T3-NK: $p = 0,011$; *OCT4/POUF5*: T0 vs. T3-NK: $p < 0,001$) konnten zum Zeitpunkt T3 mittels univariater Varianzanalyse eine signifikante Herunterregulierung dieser Marker beobachtet werden. In **Abb. 34** sind die C_t -Mittelwerte \pm SD der SYBR Green RT-qPCR als „Dotplots“ dargestellt und im **Anhang** in **Kap. 9.7.2.1.**, **Tab. 48** tabellarisch aufgelistet.

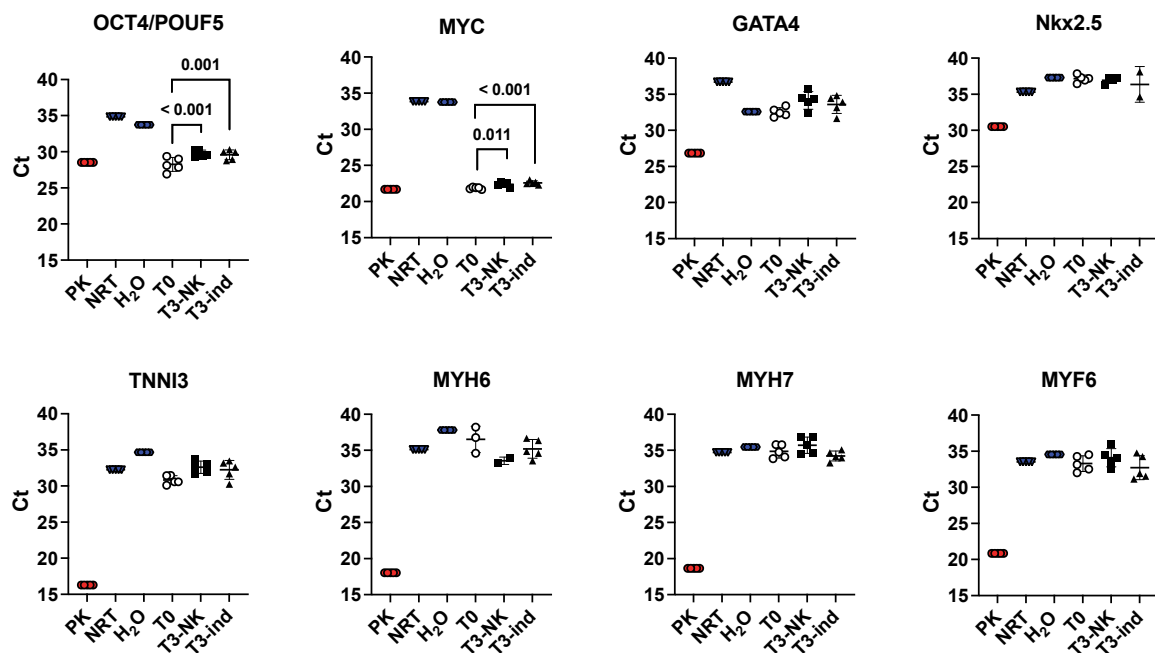


Abb. 34: Resultate der SYBR Green RT-qPCR der Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach Exposition mit 5-Azacytidin.

Dargestellt ist die Genexpression der pluripotenzassoziierten, kardialen und myogenen Marker der Präadipozyten (abd-ASCs_{SVF}) vor (T0) und nach Induktion (T3-ind: induziert, T3-NK: Negativkontrolle) mit 5-Azacytidin sowie der technischen Kontrollen (blaue Punkte: NRT und H₂O) und Positivkontrollen (rote Punkte: PK). Die Dots stellen die C_t -Mittelwerte mit Standardabweichung von $n = 5$ Donoren aus zwei Versuchsdurchläufen dar. Für die statistische Auswertung wurde eine univariate Varianzanalyse (Post-Hoc-Tests „Hochberg“ und „Tukey-HSD“) angewendet, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen wurde.

4.5.2.8.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1

In beiden Teilversuchen konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen zum Zeitpunkt T3 weder eine Aufregulation der kardialen Marker *NKX2-5*, *GATA4*, *MYH6*, *MYH7* und *TNNI3* noch des Muskelmarkers *MYF6* festgestellt werden. Die pluripotenzassoziierten Marker *MYC*, *OCT4/POUF5* und *DNMT3B* wurden zum Zeitpunkt T0 exprimiert und zum Zeitpunkt T3 signifikant herunterreguliert. Dies wurde im ersten Teilversuch unabhängig von der BMP-4-Konzentration mittels univariater Varianzanalyse für induzierte Zellen (*MYC*: T0 vs. T3-ind-1A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-1B: $p < 0,001$; *OCT4/POUF5*: T0 vs. T3-ind-1A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-1B: $p < 0,001$; *DNMT3B*: T0 vs. T3-ind-1A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-1B: $p < 0,001$) und nicht-induzierte NK (*MYC*: T0 vs. T3-NK: $p < 0,001$; *OCT4/POUF5*: T0 vs. T3-NK: $p = 0,003$; *DNMT3B*: T0 vs. T3-NK: $p < 0,001$) nachgewiesen. Zudem konnten bei *DNMT3B* signifikante Unterschiede der Genexpression zwischen der T3-NK und den induzierten Zellen festgestellt werden (*DNMT3B*: T3-NK vs. T3-ind-1A: $p = 0,038$; T3-NK vs. T3-ind-1B: $p = 0,006$). Die Dotplots (C_t -Mittelwerte \pm SD) für beide Teilversuche sind in den **Abb. 35** und **36 (Seiten 80–81)** dargestellt. Im zweiten Teilversuch wurde eine Herunterregulierung der Marker *DNMT3B* und *OCT4/POUF5* ausschließlich zwischen T0-Zellen und den T3-induzierten Zellen, nicht aber zwischen T0- und T3-NK-Zellen beobachtet (*DNMT3B*: T0 vs. T3-ind-2A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-2B: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-2C: $p = 0,004$; *OCT4/POUF5*: T0 vs. T3-ind-2A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-2C: $p = 0,046$). Bei *MYC* wurde diese Herunterregulierung gegenüber T0-Zellen sowohl bei induzierten (T0 vs. T3-ind-2A: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-2B: $p < 0,001$; T0 vs. T3-ind-2C: $p = 0,005$) als auch nicht-induzierten T3-Zellen (T0 vs. T3-NK: $p < 0,001$) beobachtet. Zudem wurde bei *MYC* eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression zwischen den Konditionen T3-ind-2A und T3-ind-2C nachgewiesen ($p = 0,026$). Bei *TNNI3* kann in den Dotplots ebenfalls eine signifikante Herunterregulierung zum Zeitpunkt T3 gegenüber T0 beobachtet werden. Da der Marker im negativen Bereich der Genregulation gegenüber der PK lag, wird auf eine weiterführende Beschreibung der Signifikanzen verzichtet. Die C_t -Mittelwerte \pm SD sind für beide Teilversuche im **Anhang in Kap. 9.7.2.2. (Tab. 49–50)** aufgelistet. Statistische Tests wurden nur durchgeführt, wenn die C_t -Mittelwerte der induzierten Zellen mehr als vier Zyklen von den C_t -Mittelwerten der technischen Kontrollproben (H₂O und NRT) entfernt lagen (**Kap. 3.8.**).

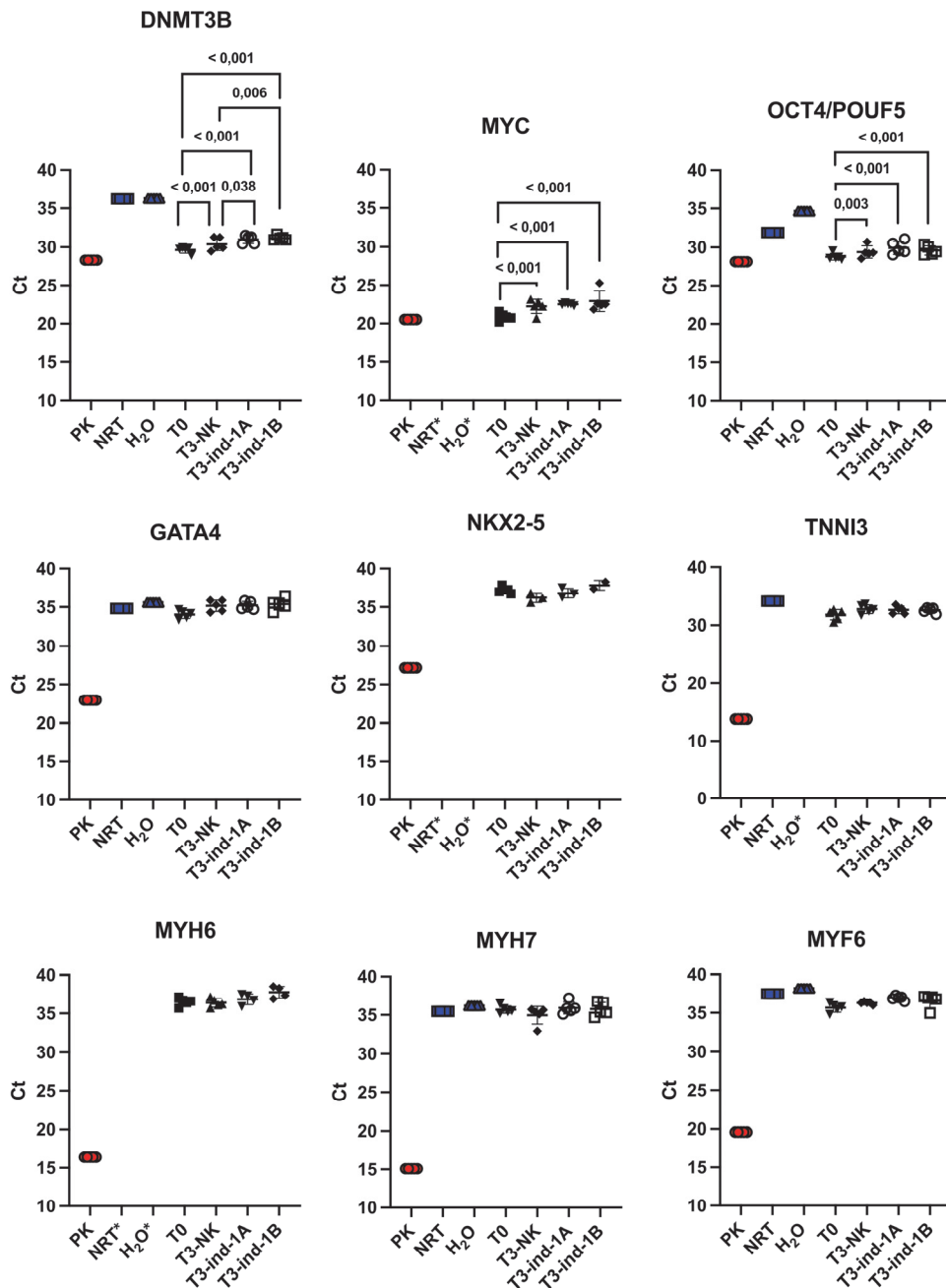


Abb. 35: Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach kardiomyogener Induktion mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 (1. Teilversuch).

Aufgezeigt sind die Genexpressionen der pluripotenzassoziierten und kardialen Marker sowie des Muskelmarkers zu den Zeitpunkten T0 (vor Induktion, T0-NK) und T3 (drei Wochen nach Induktion, T3-ind-1A: induziert mit 100 ng/ml Activin A (Act A), 10 ng/ml knochenmorphogenetischem Protein-4 (BMP-4) und 100 ng/ml Dickkopf-1 (DKK-1); T3-ind-1B: induziert mit 100 ng/ml Act A, 20 ng/ml BMP-4 und 100 ng/ml DKK-1; T3-NK: Negativkontrolle) sowie der technischen Kontrollproben (NRT und H₂O: blaue Punkte) und Positivkontrollen (PK: rote Punkte). Die Dotplots stellen die C_t-Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken) dar. Als statistische Tests wurden eine univariate Varianzanalyse sowie der „Tukey-HSD“ Post-Hoc-Test angewendet, wobei eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen wurde. **Abkürzungen:** DNMT3B: DNA Methyltransferase 3 Beta, GATA4: GATA Binding Protein 4, H₂O: Wasser, ind: induziert, MYC: MYC Protoonkogen, MYF6, Myogenic Factor 6, MYH6/7: Myosin Heavy Chain 6/7, NK: Negativkontrolle, NKX2-5: NK2 Homeobox 5, NRT: Non-Reverse-Transkriptase Kontrolle, OCT4/POUF5: Octamer-Binding Protein 4/POU Class 5 Homeobox 1, PK: Positivkontrolle, TNNI3: Troponin I3, Cardiac Type. *C_t-Mittelwert > 40.

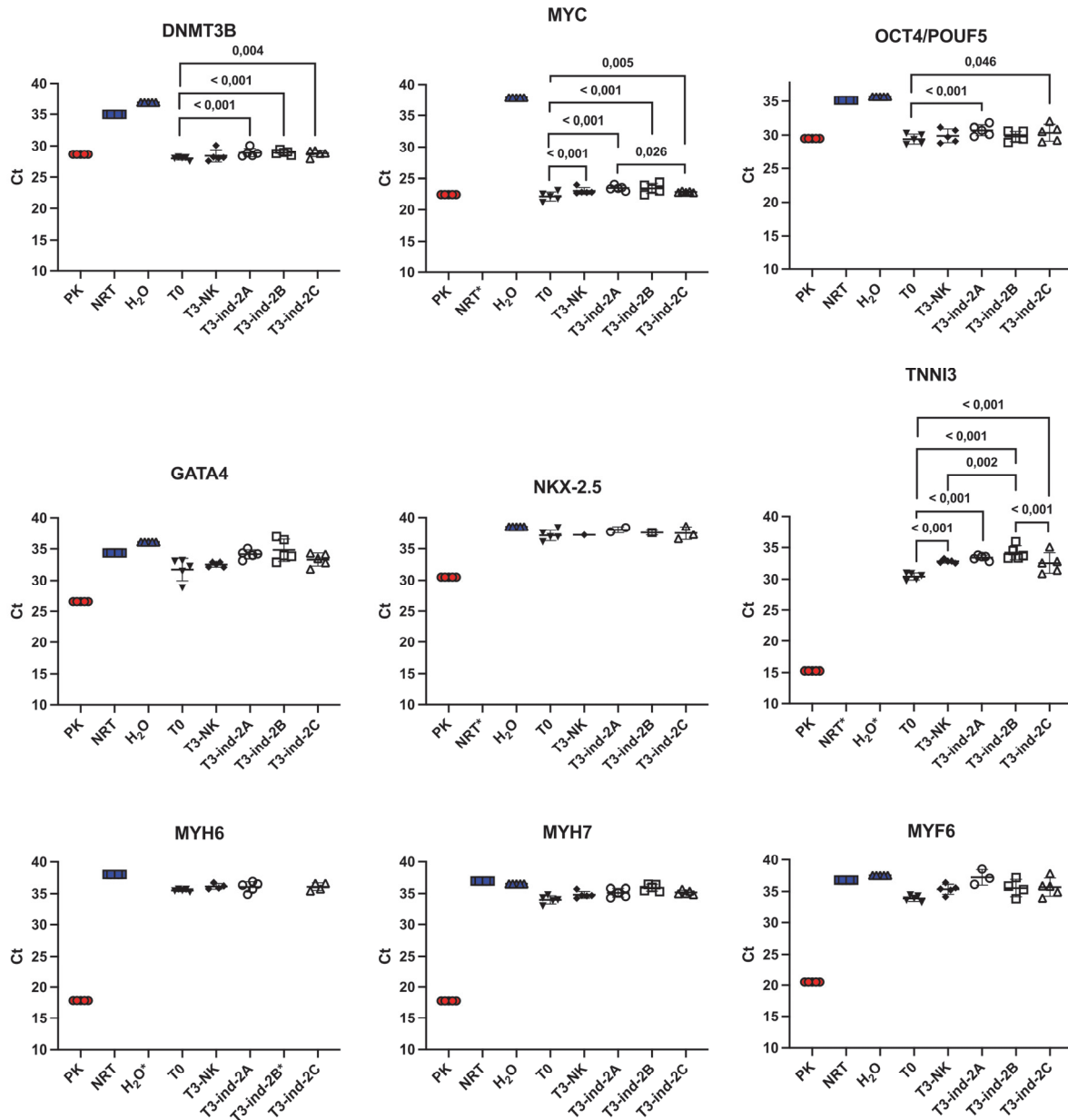


Abb. 36: Genexpressionsanalyse equiner Präadipozyten nach kardiomyogener Induktion mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1 (2. Teilversuch).

Die Genexpressionen wurden zu den Zeitpunkten T0 (Tag 0, vor Induktion) und T3 (3 Wochen nach Induktion, T3-ind-2A: induziert mit 0 ng/ml Activin A (Act A), 50 ng/ml knochenmorphogenetischem Protein-4 (BMP-4) und 150 ng/ml Dickkopf-1 (DKK-1); T3-ind-2B: induziert mit 100 ng/ml Act A, 50 ng/ml BMP-4 und 150 ng/ml DKK-1; T3-ind-2C: induziert mit 100 ng/ml Act A, 50 ng/ml BMP-4 und 0 ng/ml DKK-1; T3-NK: Negativkontrolle) untersucht. Die Genexpressionen der Positivkontrollen (PK: rote Punkte) und technischen Kontrollproben (NRT und H₂O: blaue Punkte) sind aufgezeigt. Die Dots stellen die C_t-Mittelwerte ± Standardabweichungen (Fehlerbalken) dar. Als statistischer Test wurde eine univariate Varianzanalyse (Post-Hoc „Tukey-HSD“) durchgeführt und eine statistische Signifikanz bei $p < 0,05$ angenommen. **Abkürzungen:** siehe Abb. 35. *C_t-Mittelwert > 40.

4.6. Zusammenfassung der Resultate

Studienpopulation: heterogen hinsichtlich Alter, Rasse, Geschlecht, Vorerkrankungen

Isolierung und Kultivierung equiner ASCs:

- **Isolierung** equiner ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} aus abd-, rb- und sc-Fettgewebe möglich
- **Isolierungserfolg:** signifikant niedriger bei sc-ASCs-_{SVF} gegenüber abd- und rb-ASCs-_{SVF} ($p < 0,05$); keine signifikanten Unterschiede zwischen EXP- und SVF-ASCs ($p = 0,12$)
- **Proliferationspotential:** hoch, ohne signifikante Unterschiede zwischen Isolationsmethoden ($p = 0,64$) und Lokalisationen ($p = 0,35$)
- **Serumversuch:** in 10% FKS kultivierte ASCs wiesen signifikant niedrigeres Zellwachstum gegenüber 10% HS, 20% FKS sowie 10% HS und 10% FKS auf (Serumvarianteneffekt abd-ASCs-_{EXP}: $p = 0,011$, abd-ASCs-_{SVF}: $p = 0,007$).

Tripotentes Differenzierungspotential equiner ASCs:

- **Adipogenese:** hohes Differenzierungspotential, an Tag 7 (GPDH-Assay) bei abd-ASCs-_{EXP} signifikant höher als bei rb- und sc-ASCs-_{EXP} ($p < 0,001$) und an Tag 14 (Lipid-Nuclei-Ratio) signifikant höher bei abd-ASCs-_{SVF} gegenüber abd-ASCs-_{EXP} ($p = 0,020$)
- **Osteogenese:** hohes Differenzierungspotential, an Tag 14 (ALP-Assay) signifikant höher bei sc-ASCs-_{EXP} ind gegenüber sc-ASCs-_{EXP} NK ($p = 0,033$) und an Tag 21 (IOD) bei abd-ASCs-_{EXP} signifikant höher gegenüber abd-ASCs-_{SVF} ($p = 0,005$) und gegenüber rb-ASCs-_{EXP} ($p = 0,047$)
- **Chondrogenese:** alle Proben chondrogen induzierbar, an Tag 21 (modifizierter „Bern-Score“) keine signifikanten Unterschiede zwischen Isolationsmethoden ($p = 0,66$) und Lokalisationen ($p = 0,15$) nachweisbar

Immunphänotypisierung equiner ASCs: Anwesenheit der MSC-assoziierten Marker CD29+, CD44+, CD90+, kein Nachweis von CD105+, CD34- und CD45-; keine signifikanten Unterschiede zwischen EXP- und SVF-ASCs ($p > 0,05$); hohe Zellviabilität (ca. 70%)

Kardiomyogenes Differenzierungspotential equiner ASCs:

- **5-AZA sowie Act A, BMP-4 und DKK-1:** keine kardiomyogene Differenzierung unter den gewählten Versuchsbedingungen, weder zellmorphologische Veränderungen noch Aufregulierung kardialer Marker und des Muskelmarkers

5. Diskussion

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und der Vergleich equiner Präadipozyten, die mittels zwei verschiedener Isolationsverfahren aus unterschiedlichen Fettgewebelokalisationen gewonnen wurden, und die erstmalige Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials dieser Zellen *in vitro*. Die vorliegende Arbeit liefert einen Beitrag zur Grundlagenforschung und trägt dazu bei, die Erkenntnisse im Bereich der Stammzellforschung am Großtiermodell zu erweitern. Die Identifizierung geeigneter MSCs stellt nicht nur für den Einsatz in der regenerativen Medizin, sondern auch für die Etablierung von *in-vitro*-Modellen eine wichtige Grundlage dar. Im Folgenden werden das Studiendesign, die Methodik sowie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate diskutiert und in Bezug zur aktuellen Literatur gesetzt. Zudem werden die in **Kap. 1.** aufgestellten Hypothesen überprüft.

5.1. Studienkollektiv

Das Studienkollektiv in der vorliegenden Arbeit erscheint sehr heterogen hinsichtlich Rasse, Alter, Geschlecht und Vorerkrankungen der Tiere, wobei diese Heterogenität sicherlich repräsentativ für die an Pferdekliniken euthanasierte bzw. in Pferdeschlachthöfen geschlachtete Pferdepopulation ist. Die Pferde wurden weder für den Tierversuch gezüchtet noch unter standardisierten Haltungsbedingungen gehalten und gefüttert, wie es in Studien bei Labornagern der Fall gewesen wäre. Dies begründet, dass im Rahmen der einzelnen Versuche nur eine relativ kleine Stichprobe untersucht wurde (Proliferationsassays und Serumversuche: $n = 3$; Immunphänotypisierung und kardiomyogene Differenzierungsversuche: $n = 5$; tripotente Differenzierungsversuche: $n = 6$) und stimmt mit anderen Studien beim Pferd überein (Metcalf et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Merlo et al. 2019). Durch Einbeziehen eines größeren Stichprobenumfangs ($n > 10$) hätte die Wahrscheinlichkeit, dass ein tatsächlicher Effekt übersehen wird und dass beispielsweise ein Fehler 2. Art auftritt, reduziert werden können und ein repräsentativerer Rückschluss auf die Grundgesamtheit wäre möglich (Kutschmann et al. 2006). In Folgestudien sollten überdies das Einbeziehen einer homogeneren Studienpopulation in Betracht gezogen werden, insbesondere das Alter und die Rasse betreffend. MSCs aus Geweben älterer Donortiere weisen z.B. eine verminderte Zellausbeute und Proliferationskapazität auf (Haynesworth 1994; Caplan 2009; Guercio et al. 2013). Auch der Body Condition Score (Ernährungszustand und Körperbau) der Donortiere und die daraus resultierende Prävalenz für bestimmte Erkrankungen sollten berücksichtigt werden. Es ist beispielsweise bekannt, dass leichtfuttrige Pferde besonders zu Insulindysregulation und Adipositas neigen (Lewis et al. 2017; Durham et al. 2019; Carslake et al. 2021). In der Humanmedizin zeigen MSCs von Patienten, die das metabolische Syndrom

aufweisen oder an Diabetes erkrankt sind, Anzeichen einer früheren Seneszenz. Auch das Differenzierungspotential von MSCs kann durch die genannten Faktoren beeinflusst werden. Der physiologische Status der Donoren kann ebenfalls direkte Auswirkungen auf die Charakteristika der MSCs haben (Marycz et al. 2016; Kornicka et al. 2018). Aufgrund der Heterogenität des Studienkollektivs (**Kap. 2.1.3.4.**, **Abb. 2**), die als Limitation betrachtet werden muss, wurde in der vorliegenden Studie der Fokus nicht auf das Einzeltier selbst, sondern vielmehr auf den Vergleich der MSCs aus den verschiedenen Fettgewebelokalisationen und Isolationsmethoden gelegt. Folgestudien mit einer homogeneren Donor-Zellpopulation sind anzuraten.

Das in die Versuche einbezogene Studienkollektiv war heterogen in Bezug auf das Alter, die Rasse, den Ernährungs- und Gesundheitszustand der Tiere. Zudem wurde nur eine kleine Stichprobengröße untersucht. Diese Faktoren sollten als Limitation der Arbeit berücksichtigt werden.

5.2. Fettgewebe

Die vorliegende Studie ist mit eine der ersten, die equine MSCs aus verschiedenen Fettgewebelokalisationen vergleicht. Es existieren beim Pferd einzelne Studien, in denen subkutanen, retroperitoneales, inguinale Fettgewebe, Lipoma-Fett bzw. Fettgewebe des Mesenteriums des kleinen Colons hinsichtlich des Proliferations- und Differenzierungspotentials der Zellen verglichen werden (Metcalf et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019). In der Humanmedizin liegen ebenfalls Studien vor, die Lipoma-Fett und sc-Fettgewebe verschiedener Regionen (Stojanović et al. 2018) sowie ASCs aus subkutanem, omentalem und intrathorakalem Fettgewebe (Russo et al. 2014) miteinander vergleichen. Dass Fettgewebe sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine strukturelle und funktionelle Heterogenität aufweist, wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben (Ibrahim 2010; Bourin et al. 2013; Russo et al. 2014), ebenso wie in **Kap. 2.1.3.4.** der vorliegenden Arbeit.

Fettgewebe liegt in großen Mengen vor (Yang et al. 2012), sofern die Tiere nicht kachektisch sind, und ist im Vergleich zur Gewinnung von Knochenmark und Nabelschnurblut leicht zugänglich und komplikationslos zu entnehmen (Gimble und Guilak 2003). Aufgrund der hohen Gewebegänglichkeit weisen ASCs ein großes Potential für den Einsatz in *in-vitro*-Modellen auf, wobei bei der allogenen *in-vivo*-Anwendung weitere Kriterien zu erfüllen sind, wie beispielsweise die Immunogenität der Zellen, um immunologische Abstoßungsreaktionen zu vermeiden (Tan et al. 2017).

Die subkutane Fettgewebelokalisation lateral der Schweifrübe stellt die beim Pferd häufigste Gewebequelle für die Isolierung von ASCs dar (Ranera et al. 2011; Burk et al. 2013; Barberini et al. 2014; Hillmann et al. 2016), während die abdominale Lokalisation häufiger bei Menschen (Wystrychowski et al. 2016), Hunden (Guercio et al. 2013; Bahamondes et al. 2017; Yaneselli et al. 2018) und Katzen (Kono et al. 2014) verwendet wird. Die Entnahmestellen des Fettgewebes am euthanasierten Pferd entsprechen denen am sedierten bzw. anästhesierten Tier (Vidal et al. 2007; Schröck et al. 2017). Eine Entnahme von sc-Fettgewebe wird am sedierten Pferd aufgrund der Narbenbildung von vielen Patientenbesitzern nicht toleriert („kosmetisches Problem“), daher wurde in der vorliegenden Arbeit auf Material euthanasierter und geschlachteter Tiere zurückgegriffen. Subkutanes Fettgewebe kann besonders leicht durch eine halbmondförmige Inzision gewonnen werden, wie bereits beschrieben wurde (Bravo et al. 2012; Alipour et al. 2015). Auch die Entnahme retrobulbären Fettgewebes erscheint, wie in Vorversuchen festgestellt wurde, praktikabler an frisch euthanasierten und geschlachteten Pferden zu sein, da in diesen Fällen das Fettgewebe aus beiden Augenhöhlen und nicht wie bei einer Euklektion aus nur einer *Orbita* entnommen werden kann. Ebenfalls in Vorversuchen wurde aufgezeigt, dass abd-Fettgewebe im Rahmen von Abdominalchirurgien als „Abfallprodukt“ gewonnen werden kann. Hierbei sollte eine Entnahme möglichst schnell nach Laparotomie erfolgen, um ein Trauma durch eine weitere Exploration der Bauchhöhle zu vermeiden (Arnhold et al. 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde das Fettgewebe jedes beprobten Tieres aus allen drei Lokalisationen ausschließlich *post mortem* entnommen. Die entnommenen 6 g (rb-) bis 9 g (abd- und sc-) Fettgewebe waren für die Gewinnung der Präadipozyten ausreichend. Während in der Studie von Alipour et al. (2015) sogar nur 3 bis 5 g Fettgewebe ausreichten, wurde in anderen Studien 30 bis 50 g entnommen (Alipour et al. 2015).

Die Probenentnahme erfolgte zumeist direkt im Anschluss an die Schlachtung oder kurz nach Euthanasie (nach i.d.R. 30 min), teilweise aber auch erst 8 h *post mortem*. In beiden Fällen war es möglich, ausreichend viele ASCs zu gewinnen (siehe Vitalitätsbestimmung **Kap. 4.4.**). In einer anderen Studie wurde beschrieben, dass BM-MSCs eine gute Lebensfähigkeit und Zellproliferation aufwiesen, die 30 min nach Euthanasie gewonnen wurden (Schröck et al. 2017). Möglicherweise könnten die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit darauf hindeuten, dass die Gewinnung vitaler MSCs viel länger als erwartet *post mortem* möglich ist. Hierzu sind weitere Studien nötig, die speziell dieser Fragestellung auf den Grund gehen.

MSCs verschiedener Gewebequellen haben direkt Auswirkungen auf ihre Eigenschaften *in vitro*, sei es die Proliferations- oder Differenzierungskapazität betreffend (Burk et al. 2013; Arnhold et al. 2019). Auch die Schnitttiefe bei der Gewebeentnahme soll Einfluss auf die späteren Eigenschaften der Zellen haben (Baglioni et al. 2012; Patrikoski et al. 2019; Ntege et

al. 2020). ASCs aus sc-Fettgewebe sollen beispielsweise ein höheres Proliferations- und Differenzierungspotential verglichen zu ASCs aus dem tiefer gelegenen, viszeralen Fettgewebe aufweisen (Baglioni et al. 2012). Dies konnte weder in der vorliegenden noch in anderen Studien nachgewiesen werden, wie in den **Kap. 5.5.** und **5.6.1.** weiter diskutiert wird. Gegenüber dem metabolisch aktiveren abd-Fettgewebe (Nesto 2005) handelt es sich sowohl bei sc- als auch rb-Fettgewebe um Baufett. Auf Grundlage der Studie von Baglioni et al. (2012) wurde vermutet, dass das tief in der *Orbita* gelegene rb-Fettgewebe ein geringeres Proliferations- und Differenzierungspotential aufweist (Baglioni et al. 2012) (siehe **Kap. 5.5.** und **5.6.1.**). Studien, in denen ASCs aus rb-Fettgewebe beim Pferd gewonnen und charakterisiert werden, existieren bisher nicht.

In den meisten Studien beim Pferd werden Präadipozyten aus sc-Fettgewebe gewonnen. In der vorliegenden Studie wurden zwei weitere Lokalisationen, abd- und rb-Fettgewebe, in Bezug auf die Gewinnung der Präadipozyten untersucht. Es konnten hochvitale Zellen bis 8 h *post mortem* von euthanasierten und geschlachteten Tieren gewonnen werden. Die Gewebequelle beeinflusst die Charakteristika der Zellen.

5.3. Isolierung und Kultivierung equiner Präadipozyten

Die Isolierung und Kultivierung der Zellen erfolgte gemäß den am Institut für Veterinär-Physiologie für bovine ASCs etablierten Protokollen (Sandhu et al. 2017; Jurek et al. 2020; Becker et al. 2021). In Bezug auf die Isolierungsmethode stellt der Kollagenaseverdau das am häufigsten eingesetzte Standardverfahren zur Gewinnung der ASCs dar und wird bei verschiedenen Spezies, darunter dem Pferd, oftmals durchgeführt (Vidal et al. 2007; Ranera et al. 2011; Schwarz et al. 2012; Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Es ist allerdings fraglich, inwieweit die Zellen durch den enzymatischen Verdau geschädigt werden (Igura et al. 2004). Dies könnte von der Expositionszeit, der eingesetzten Kollagenase-Konzentration und der Größe der zu verdauenden Gewebestückchen abhängen. In einer Studie von Gittel et al. (2013) wurde hingegen nachgewiesen, dass Kollagenase keine nachteiligen Effekte auf equine MSCs ausübt (Gittel et al. 2013). Es wurde gemäß anderen Studien (Murata et al. 2016; Arnhold et al. 2019; Merlo et al. 2019) eine 0,1%-Kollagenase-Lösung (Typ I) eingesetzt und die Expositionszeit auf 60 min festgelegt. Demgegenüber gibt es Forschungsgruppen, die beim Pferd mit 4 h deutlich längere Expositionszeiten wählen (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Die EXP-Methode wurde in den letzten Jahren als ein relativ einfach durchführbares Verfahren entwickelt, mithilfe dessen equine (Gittel et al. 2013), bovine (Sandhu et al. 2017) und humane MSCs (Lee et al. 2011; Salehinejad et al. 2012; Priya et al. 2014) isoliert werden können. Ob allein die randständigen Zellen des Fettgewebestückchens oder auch zentral gelegene aktiv migrieren können, wodurch die Zellausbeute beeinflusst

werden könnte, ist allerdings fraglich. Während bei den P0-ASCs-_{EXP} eine gewisse Selektion stattfindet, da nur migrierfähige Zellen das Explantat verlassen und in das umgebende Kulturmedium auswandern, stellen P0-ASCs-_{SVF} eine vergleichsweise inhomogenere Zellpopulation dar, da eine solche Selektion der Zellen nicht stattfindet (Gittel et al. 2013). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch eine homogene Markerexpression sowohl bei ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} der P3 und P4 nachgewiesen werden (**Kap. 4.4.** und **5.6.2.**). In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass eine höhere Zellzahl mittels des SVF-Verfahrens (gegenüber dem EXP-Verfahren) gewonnen werden kann (Baptista et al. 2009; Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013). Da aber die ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} der P0 durch die Plastikadhärenz noch selektiert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine genaue Bestimmung dieser primären Zellzahl verzichtet. Es wurde vielmehr ein binäres Punktevergabesystem etabliert, welches den Isolierungserfolg der ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} der abd-, rb- und sc-Fettgewebelokalisation bewertete (**Kap. 3.3.2.** und **4.2.2.**). Zudem wurde die Proliferationsfähigkeit der Zellen (P3) in der vorliegenden Arbeit untersucht (**Kap. 3.3.5.** und **4.2.3.**). Wie erwartet konnten aus allen Fettgewebelokalisationen Fibroblasten-ähnliche, plastikadhärente ASCs-_{EXP} (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013) und ASCs-_{SVF} (Lee et al. 2011; Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Arnhold et al. 2019) gewonnen werden, die morphologisch nicht zu unterscheiden waren. Zwischen ASCs der EXP- und SVF-Methode konnte in Übereinstimmung mit der Studie von Lee et al. (2011) kein signifikanter Unterschied im Isolierungserfolg festgestellt werden (Lee et al. 2011). In einer anderen Studie hingegen wurde ein solcher Unterschied nachgewiesen (Gittel et al. 2013). Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass die Herkunft des Fettgewebes den Isolierungserfolg beeinflusst, wie in Studien bei Menschen (Russo et al. 2014; Wystrychowski et al. 2016) und Hunden (Bahamondes et al. 2017; Yaneselli et al. 2018) beschrieben wurde. In der vorliegenden Studie wiesen sc-ASCs-_{SVF} gegenüber abd- und rb-ASCs-_{SVF} einen signifikant niedrigeren Isolierungserfolg auf (**Kap. 4.2.2.**). Dies bestätigte die Resultate anderer Studien bei caninen (Bahamondes et al. 2017) und humanen ASCs (Russo et al. 2014), in denen die Zellausbeute von omentalen ASCs gegenüber sc-ASCs signifikant höher war. In einer anderen Studie wiesen equine ASCs aus dem Mesenterium des kleinen Colons gegenüber sc-ASCs eine signifikant höhere Vitalität auf (Metcalf et al. 2016). Demgegenüber konnten Arnhold et al. (2019) einen signifikanten Unterschied in der Lebensfähigkeit equiner ASCs aus sc- und retroperitonealem Fettgewebe nicht nachweisen (Arnhold et al. 2019).

Die **Hypothese 1.a.** wurde angenommen. Es konnten aus allen Fettgewebelokalisationen Fibroblasten-ähnliche und plastikadhärente ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} isoliert werden. Die **Hypothesen 1.d. und 1.e.** konnten in Bezug auf den Isolierungserfolg bestätigt werden. Die beiden Isolierungsmethoden unterschieden sich nicht signifikant voneinander, während hingegen die Fettgewebelokalisation einen signifikanten Effekt aufwies. Sc-ASCs_{-SVF} wiesen gegenüber abd- und rb-ASCs_{-SVF} einen signifikant niedrigeren Isolierungserfolg auf.

5.4. Einfluss des Kulturmediums

Da die Proliferationskapazität der MSCs vom eingesetzten Zellkulturmedium und den Kulturbedingungen abhängt (Schubert et al. 2018), wurden alle in den Versuch einbezogenen Zellen in einem Standardzellkulturmedium unter Standardkulturbedingungen kultiviert (**Kap. 3.3.1.**), sodass eine Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen weitestgehend gewährleistet wurde. Dadurch sollte vermieden werden, dass unterschiedliche Labortechniken die Charakteristika der Zellen und Versuchsergebnisse beeinflussten. Die Kultivierung equiner ASCs fand analog zu anderen Studien als Monolayer-Kultur statt (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Merlo et al. 2019). Limitierend in der vorliegenden Studie war, dass zwischen den verschiedenen Versuchen nicht konsistent Zellen der gleichen Passagezahl verwendet wurden. Dies hatte laborpraktische Gründe und könnte in Folgestudien optimiert werden.

Bei Betrachtung des Kulturmediums wird als limitierender Faktor die uneinheitliche und wenig definierte Zusammensetzung des eingesetzten Serums diskutiert (Lennon et al. 1996; Naji et al. 2019). FKS wird, wie auch in der vorliegenden Studie, normalerweise als Goldstandard bei der Kultivierung equiner ASCs eingesetzt (Hagen et al. 2021; Hagen et al. 2022). In den meisten Publikationen wird eine Konzentration von 10% FKS eingesetzt (De Mattos Carvalho et al. 2009; Alipour et al. 2015; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019), in anderen Publikationen wird diese analog zu der vorliegenden Arbeit auf 20% FKS erhöht (Burk et al. 2013; Barberini et al. 2014; Hillmann et al. 2016; Merlo et al. 2019). Bei der Kultivierung equiner UCB-MSCs wird ein FKS-Gehalt von 20% FKS standardmäßig empfohlen (Koch et al. 2007; Gittel et al. 2013). Den FKS-Gehalt gilt es insbesondere bei der Auswertung von Proliferations-Assays zu berücksichtigen, da FKS eine wachstumsfördernde Wirkung aufweist (**Kap. 2.1.3.3.** und **Kap. 5.5.**). Die vorliegende Studie ist die erste, die den Effekt von 10% FKS, 20% FKS, 10% HS und der Kombination von 10% HS und 10% FKS auf die Kultivierung equiner abd-ASCs_{-SVF} und abd-ASCs_{-EXP} mithilfe eines Punktevergabesystems überprüft hat. Da die 10% FKS-Variante einen signifikant niedrigeren Gesamtscore aufwies und einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen zeigte, sollte in zukünftigen Studien der Einsatz einer 10% FKS-Konzentration überdacht werden, insbesondere auch aufgrund der auftretenden

Zellablösung, auf die im Folgenden nicht weiter eingegangen wird. Da der Einsatz von hohen FKS-Konzentrationen allerdings aufgrund ethischer Bedenken hinterfragt werden kann, wird in aktuellen Studien der Effekt tier- und serumfreier Nährmedien (Karnieli et al. 2017; Schubert et al. 2018) auf die Charakteristika equiner MSCs untersucht, z.B. des equinen Plättchenlysates (ePL). Gegenüber FKS soll ePL einen vergleichbaren Effekt auf die MSC-Expansion beim Pferd aufweisen (Hagen et al. 2021; Hagen et al. 2022). Weitere Studien hierzu sind nötig. HS wird i.d.R. nicht bei der Kultivierung equiner MSCs, sondern insbesondere für die Isolierung von Monozyten bzw. in Makrophagen-Kulturversuchen als speziesspezifisches Serum eingesetzt (Cavatorta et al. 2012; Cassano et al. 2018; Naskou et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit erwies sich der alleinige Einsatz des speziesspezifischen HS als nicht vorteilhaft verglichen zu FKS. Das zellmorphologische Bild bei den in HS kultivierten Zellen veränderte sich von einer spindelförmigen in eine rhomboidere Zellform (**Kap. 4.2.4.**). Schubert et al. (2018) beschrieben eine Veränderung der Zellmorphologie bei equinen ASCs, die in serumfreien Medien kultiviert wurden (Schubert et al. 2018). Ungeachtet dessen, dass hier ein anderer Effekt auf die Zellmorphologie erzielt wurde (längere Zellausläufer vs. rhomboide Zellform), bestätigt dies den enormen Einfluss des gewählten Serums auf equine ASCs. In einer Studie von Schwarz et al. (2012) konnte beobachtet werden, dass die in autologem Serum kultivierten equinen ASCs eine verminderte Zellexpansion aufwiesen (Schwarz et al. 2012). In der vorliegenden Studie proliferierten die in 10% HS kultivierten Zellen moderat. Die Kombination von 10% FKS und 10% HS wurde in einer Publikation von Mareschi et al. (2001) für die Kultivierung humaner BM-MSCs und UCB-MSCs beschrieben (Mareschi et al. 2001). Studien zu equinen ASCs existieren diesbezüglich nicht. In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl bei der Kombination aus 10% FKS und 10% HS als auch bei 20% FKS gute Effekte auf das Wachstumsverhalten der Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund eines überkonfluenten Wachstums konnte eine „Türmchen“-Bildung beobachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen ASCs-SVF und ASCs-EXP wurden bei keiner der untersuchten Serumvarianten in Bezug auf das Wachstumsverhalten festgestellt, wie es in anderen Studien aufgezeigt wurde (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013). Auf Grundlage der Resultate der Serumversuche wurde in der vorliegenden Arbeit in den weiteren Versuchen standardmäßig 20% FKS für die Kultivierung equiner ASCs eingesetzt, abgesehen vom 5-AZA-Induktionsversuch, der zeitlich vor den Serumversuchen stattfand.

Neben dem gewählten Serumsupplement sollte bei der Kultivierung equiner ASCs auch der Glukosegehalt des Kulturmediums Berücksichtigung finden. Während in verschiedenen Studien 1 g/l Glukose eingesetzt wurde (Paebst et al. 2014; Hillmann et al. 2016; Merlo et al. 2019), wurde in anderen Studien, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, standardmäßig ein hoher Glukosegehalt von 4,5 g/l verwendet (Alipour et al. 2015; Arévalo-Turrubiarte et al.

2019). Inwieweit Supplemente wie Antibiotika und Antimykotika Effekte auf das Proliferations- und Differenzierungspotential aufweisen (**Kap. 2.1.3.3.**), wurde nicht untersucht.

Die uneinheitlich eingesetzten Kulturmedien und -supplemente könnten zumindest anteilig die teils differierenden Resultate verschiedener Forschungsgruppen hinsichtlich des Proliferations- und Differenzierungspotentials der Zellen begründen (Antonitsis et al. 2007; Safwani et al. 2012; Wystrychowski et al. 2016; Kakkar et al. 2019).

Die **Hypothese 1.b.** wurde angenommen. Es konnten signifikante Unterschiede der verschiedenen Serumsupplemente auf das Wachstumsverhalten der Zellen nachgewiesen werden. Während FKS den Goldstandard bei der Kultivierung equiner Präadipozyten darstellt, wird das speziesspezifische HS nicht standardmäßig eingesetzt. Eine Konzentration von 10% FKS kann auf Grundlage der Resultate der vorliegenden Studie für die Kultivierung equiner Präadipozyten nicht empfohlen werden.

5.5. Proliferationspotential

Nicht nur der Einfluss verschiedener Kulturbedingungen (Schwarz et al. 2012), sondern auch das Proliferationspotential kann durch eine steigende Passagezahl, tierspezifische Faktoren wie das Alter und Vorerkrankungen sowie verschiedene Labortechniken beeinflusst werden (Czapla et al. 2019; Câmara et al. 2020; Khazaei et al. 2021). Zudem kann das Wachstumsverhalten einerseits zwischen verschiedenen Spezies, andererseits auch innerhalb einer Spezies abhängig vom Ursprungsgewebe der Zellen variieren (Burk et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Proliferationspotential der aus rb-Fettgewebe gewonnenen equinen ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} untersucht und mit dem Proliferationspotential der aus abd- und sc-Fettgewebe isolierten Zellen verglichen (**Kap. 3.3.5.** und **4.2.3.**). Das Wachstumsverhalten hat neben einer hohen Relevanz für die Etablierung von *in-vitro*-Modellen auch eine klinische Relevanz (Bobis et al. 2006; Burk et al. 2013). Ein signifikanter Unterschied des Proliferationspotentials zwischen equinen ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} konnte gemäß einer anderen Studie (Gittel et al. 2013) nicht festgestellt werden (**Kap. 5.4.**). Arnhold et al. (2019) wiesen nach, dass equine ASCs_{-SVF} aus retroperitonealem Fettgewebe ein signifikant höheres Proliferationspotential gegenüber ASCs_{-SVF} aus sc- und Lipoma-Fettgewebe aufwiesen (Arnhold et al. 2019). Auch bei der Maus konnte ein höheres Proliferationspotential bei viszeralen gegenüber sc-ASCs_{-SVF} festgestellt werden (Tang et al. 2017). Entgegen der beiden Studien bestanden in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen abd- und sc-ASCs der P3. ASCs aus dem tiefer gelegenen rb-Baufett wiesen ein vergleichbar hohes Wachstumsvermögen auf. Dass ASCs gegenüber BM-MSCs

und UCM-MSCs ein höheres Proliferationspotential aufweisen, wurde bereits in verschiedenen Studien für das Pferd (Colleoni et al. 2009; Burk et al. 2013) und die Ratte (Peng et al. 2008) beschrieben.

Die Ermittlung der Zellwachstumszahlen und der PDT für die Zellen der P3 wurde gemäß dem Protokoll von Alipour et al. (2015) durchgeführt (Alipour et al. 2015). Eine andere Möglichkeit, die PDT zu ermitteln, hätte darin bestanden, Zellen der P1 auszusäen und die Zellen bei jeweils 80% Konfluenz bis zur P7 weiter zu passagieren. Die Ermittlung der Zellzahlen findet hier passageübergreifend statt (Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Die PDT weist zwischen verschiedenen Studien Schwankungen auf. In der vorliegenden Studie betrug die PDT für equine ASCs durchschnittlich ca. 41 bis 58 h, wobei abd-ASCs-EXP die niedrigste PDT aufwiesen. In anderen Studien wurden beim Pferd PDTs von 40 bis 46 h (Alipour et al. 2015) bzw. 2,2 Tagen (ca. 53 h) nachgewiesen (Merlo et al. 2019). Schwarz et al. (2012) verglichen die Auswirkungen des Einsatzes von FKS auf die PDT und stellten fest, dass die PDT beim Hund und beim Pferd bei in FKS kultivierten ASCs niedriger gegenüber den in serumfreiem Medium kultivierten ASCs war (Hund: FKS: 48 h, serumfreies Medium: 68 h; Pferd: FKS: 54 h, serumfreies Medium: 70 h). Demgegenüber wiesen ASCs beim Schwein ein gegensätzliches Verhalten auf (PDT FKS: 65 h, serumfreies Medium: 54 h) (Schwarz et al. 2012). Eine Untersuchung des Einflusses des gewählten Kulturerums auf die PDT wurde in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt. In Folgestudien wäre anzuraten, tierspezifische Faktoren wie das Donoralter bei der Untersuchung des Proliferationspotentials zu berücksichtigen, auch wenn in einer Studie von Burk et al. (2013) als widerlegt gilt, dass die Generationszeiten, die von der PDT abhängen, und die Zellausbeuten mit dem Donoralter korrelieren (Burk et al. 2013).

Equine Präadipozyten weisen ein hohes Proliferationspotential auf, wobei in der vorliegenden Arbeit weder signifikante Unterschiede der Lokalisationen noch der Isolationsmethoden festgestellt werden konnten. In Bezug auf das Proliferationspotential wurden die **Hypothese 1.d.** angenommen und die **Hypothese 1.e.** abgelehnt.

5.6. Charakterisierung equiner Präadipozyten

Zur Charakterisierung wurden die Zellen auf die ISCT-Kriterien gemäß der Studie von Dominici et al. (2006) überprüft und konnten eindeutig als MSCs identifiziert werden (Dominici et al. 2006).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Zellen wurden auf Grundlage der Fähigkeit zur Plastikadhärenz, des tripotenten Differenzierungspotentials sowie des spezifischen Oberflächenmarkerprofils eindeutig als MSCs identifiziert. Die **Hypothese 1.c.** konnte angenommen werden.

5.6.1. Tripotente Differenzierungsversuche

Die Untersuchung des tripotenten Differenzierungspotentials diente dem Nachweis der multipotenten Eigenschaften der Zellen *in vitro*. Eine multipotente Differenzierung konnte in abd-ASCs-_{EXP}, abd-ASCs-_{SVF}, rb-ASCs-_{EXP} und sc-ASCs-_{EXP} nachgewiesen werden, wobei Unterschiede im Differenzierungspotential bei den Zellen der verschiedenen Fettgewebelokalisationen und Isolationsmethoden festgestellt wurden. Dass die Gewebeherkunft der MSCs dabei eine entscheidende Rolle spielt, wurde bereits in verschiedenen Studien beim Pferd nachgewiesen (Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019). In Bezug auf die Isolationsmethode konnten in der vorliegenden Studie entgegen Resultaten anderer Studien (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013) teils signifikante Unterschiede zwischen abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} nachgewiesen werden.

Die Resultate der osteogenen und chondrogenen Differenzierungsversuche sind von klinischer Relevanz hinsichtlich der Regeneration von Knorpel- und Knochenläsionen, auch wenn es schwierig ist, eine exakte klinische Wirkung basierend auf *in-vitro*-Studien vorherzusagen (Galipeau et al. 2016). Hier sind weitere Studien nötig.

Gemäß anderen Studien, die das tripotente Differenzierungspotential beim Pferd untersuchten (Burk et al. 2013; Alipour et al. 2015; Hillmann et al. 2016; Schubert et al. 2018), wurde auf eine Genexpressionsanalyse der chondrogenen, adipogenen und osteogenen Marker mittels RT-qPCR verzichtet, die in einzelnen Studien durchgeführt wurde (Rink et al. 2017; Arnhold et al. 2019). Die gewählten Assays, (Semi-)Quantifizierungsverfahren und histologischen Färbungen wurden zum Zwecke der vorliegenden Arbeit für eine Charakterisierung und Identifizierung equiner MSCs als ausreichend befunden.

5.6.1.1. Adipogenese

In verschiedenen Studien wird ASCs ein hohes adipogenes Differenzierungspotential zugeschrieben (Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Arnhold et al. 2019), wobei die Höhe des Differenzierungspotentials zwischen verschiedenen Spezies, Gewebelokalisationen und Passagezahlen der Zellen variieren kann (Wang et al. 2008; Zhao et al. 2012; Arnhold et al. 2019). Zur Induktion der Adipogenese wurde ein am Institut für Veterinär-Physiologie der FU Berlin bereits etabliertes Protokoll für bovine ASCs eingesetzt (Sandhu et al. 2017), das sich

beim Pferd ebenso als effektiv erwies (**Kap. 3.4.1.1.** und **Kap. 4.3.1.**). Eine direkte Vergleichsstudie zwischen bovinen und equinen ASCs wäre an dieser Stelle sicherlich interessant gewesen, gerade da diesbezüglich bisher keine Publikationen existieren. Vergleichsstudien, die humane und equine (Hillmann et al. 2016) oder humane und porcine (Noort et al. 2012) MSCs hinsichtlich ihres adipogenen Differenzierungspotentials vergleichen, existieren bereits. Equine MSCs können insgesamt etwas mehr Fetttropfchen als humane MSCs akkumulieren (Hillmann et al. 2016) und bei porcinen MSCs findet die Lipidakkumulation schneller als bei humanen MSCs statt (Noort et al. 2012).

In **Kap. 2.1.2.2.1.** wurden bereits die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Induktionsfaktoren aufgeführt. Insulin und Dexamethason stellen wichtige endokrine Regulatoren der Adipogenese dar (Ruiz-Ojeda et al. 2016; Bahmad et al. 2020). Rosiglitazon ist ein Insulinsensitizer (Wilson-Fritch et al. 2003), d.h. die Empfindlichkeit der Zellen für Insulin wird erhöht. Biotin (Vitamin B7) wird als Enzym-Kofaktor eingesetzt (Jurek et al. 2020; Becker et al. 2021). IBMX (Ruiz-Ojeda et al. 2016; Bahmad et al. 2020) und BSL (Sandhu et al. 2017) stellen weitere Induktoren der Adipogenese dar.

Während andere Studien deutlich kürzere Induktionszeiten (z.B. drei Tage) wählten und den Einsatz von Kaninchenserum für die adipogene Differenzierung präferierten (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016), konnte in der vorliegenden Studie aufgezeigt werden, dass auch der Einsatz von 10% FKS zu einer Fetttropfchenbildung führte, die allerdings erst ab dem fünften Tag beobachtet und mittels eines Punktevergabesystems semiquantifiziert wurde, während in anderen Studien bereits am dritten Tag Lipidvakuolen gebildet wurden (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Die Lipidvakuolen nahmen an Größe zu und es wurde eine Nilrot-Färbung gemäß anderen Studien (Sandhu et al. 2017; Jurek et al. 2020; Becker et al. 2021) durchgeführt, die ein etabliertes Nachweisverfahren der Adipogenese darstellt (Greenspan und Fowler 1985). Durchlichtmikroskopisch konnten bei allen Proben, abgesehen von rb-ASCs-_{EXP} eines Tieres, Lipidtröpfchen nachgewiesen werden (**Kap. 4.3.1.1.**). Diese subjektive Beobachtung bestätigte sich auch bei der Bestimmung der Lipid-Nuclei-Ratio, weshalb die Bestimmung der Fluoreszenz-*Indices* mittels des Plattenreaders als ein zuverlässiges Messverfahren angesehen wird. Die Messung der Lipid-Nuclei-Ratio wurde bereits in einigen Studien als ein etabliertes Verfahren beschrieben (Jurek et al. 2020; Becker et al. 2021). Entgegen anderer Studien (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen MSCs der EXP- und SVF-Methode in Bezug auf das adipogene Differenzierungspotential festgestellt werden (**Kap. 4.3.1.4.**).

Da die Bewertung der Adipogenese allerdings nicht alleine auf Grundlage der genannten Verfahren stattfinden sollte, wurde zur Quantifizierung zusätzlich eine

Enzymaktivitätsbestimmung (GPDH) gemäß der Studie von Becker et al. (2021) durchgeführt. GPDH katalysiert die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat und NADH, um Glycerin-3-Phosphat und NAD⁺ zu bilden, und ist essentiell für die Triglyceridbiosynthese (Becker et al. 2021). Es konnten signifikante Unterschiede der GPDH-Aktivität zwischen ASCs der verschiedenen Lokalisationen nachgewiesen werden (**Kap. 4.3.1.2.**). Signifikante Lokalisationseffekte wurden auch in der Studie von Arnhold et al. (2019) beschrieben, in der nachgewiesen wurde, dass ASCs aus retroperitonealem Fettgewebe ein höheres adipogenes Differenzierungspotential als aus sc- oder Lipoma-Fett isolierte ASCs aufwiesen (Arnhold et al. 2019). In anderen Studien hingegen konnten keine signifikanten Lokalisationseffekte nachgewiesen werden (De Schauwer et al. 2014; Merlo et al. 2019). Auch wenn bei rb- und sc-ASCs-_{EXP} an Tag 5 wenige Lipidtröpfchen beobachtet werden konnten, reichte diese niedrige Adipogenese-Aktivität offensichtlich an Tag 7 nicht aus, um einen Effekt auf die GPDH-Aktivität auszuüben. Die Sensitivität des GPDH-Assays (#ab174095, Fa. Abcam) wird laut Herstellerangaben mit 1 mU pro Well angegeben. Die GPDH-Aktivität der rb- und sc-ASCs-_{EXP} muss unter der Nachweisgrenze des Assays gelegen haben. Auf Grundlage dieser Resultate ist eine GPDH-Aktivitätsbestimmung in Folgestudien eher an Tag 14 anzuraten. Die erzielten Resultate wären dann auch besser mit den ebenfalls an Tag 14 ermittelten Resultaten der Lipid-Nuclei-Ratio vergleichbar. Neben der Gewebelokalisation kann auch das Alter des Donortieres einen Einfluss auf das adipogene Differenzierungspotential haben. Juvenile humane ASCs weisen ein höheres Differenzierungspotential als adulte humane ASCs auf (Shi et al. 2005; Mushahary et al. 2018). Zudem wurde berichtet, dass MSCs niedriger Passagezahl ein höheres Adipogenese-Potential verglichen mit Zellen höherer Passagezahl aufweisen (Wang et al. 2008; Zhao et al. 2012). In der vorliegenden Studie wurden das Alter und die Passagezahl als Einflussfaktoren nicht weiter untersucht.

Auch wenn beim Pferd die *in-vitro*-Adipogenese gegenüber der Osteo- und Chondrogenese keine klinische Relevanz aufweist, werden in der Humanmedizin Adipogenese-Modelle in verschiedenen klinischen Bereichen eingesetzt, wie z.B. bei der Erforschung von Diabetes, kardiovaskulären, psychischen Erkrankungen und Prostatakrebs (Bahmad et al. 2020).

Equine ASCs weisen ein hohes adipogenes Differenzierungspotential auf. Da teils signifikante Unterschiede zwischen ASCs der EXP- und SVF-Methode nachgewiesen werden konnten (Lipid-Nuclei-Ratio, Tag 14), wird die **Hypothese 1.d.** in Bezug auf das adipogene Differenzierungspotential abgelehnt. Demgegenüber kann die **Hypothese 1.e.** angenommen werden, da signifikante Unterschiede der aus den verschiedenen Lokalisationen gewonnenen ASCs nachgewiesen werden konnten (GPDH-Assay, Tag 7).

5.6.1.2. Osteogenese

Die Osteogenese erfolgte nach den in der Literatur beschriebenen Standardprotokollen (Alipour et al. 2015; Arnhold et al. 2019) und wurde an Tag 21 über eine Färbung nach Von Kossa, eine photometrische Messung und die Ermittlung des IOD nachgewiesen (Ostanin et al. 2008; Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Arnhold et al. 2019). Zusätzlich wurde ein ALP-Assay an Tag 14 gemäß der Studie von Arnhold et al. (2019) durchgeführt (Arnhold et al. 2019) (**Kap. 3.4.2.2.**). Als primärer Induktionsfaktor wurde Dexamethason sowie als Kofaktoren β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure eingesetzt (Giovannini et al. 2008; Alipour et al. 2015; Arnhold et al. 2019), die bei der Mineralisierung der Zellen eine wichtige Rolle spielen. Für die Bildung mineralisierter Knötchen stellen 10 nM Dexamethason eine optimale Konzentration dar (Walsh et al. 2001; Langenbach und Handschel 2013). Dexamethason induziert durch FHL2/ β -Catenin-vermittelte Signalkaskaden die RUNX-2-Expression (**Kap. 2.1.2.2.2.**), wodurch die Differenzierung von ASCs in Osteoblasten hauptsächlich reguliert wird (Zheng et al. 2017; Mollentze et al. 2021). Durch Ascorbinsäure wird vermehrt Kollagen Typ 1 sekretiert (Murad et al. 1981) und das Phosphat für die Hydroxylapatit-Mineralisierung wird durch β -Glycerophosphat bereitgestellt (Tenenbaum und Heersche 1982). Die Differenzierung von ASCs in Osteoblasten wird hauptsächlich durch RUNX-2 reguliert. Die gebildeten Osteoblasten produzieren neben ALP unter anderem auch Kollagen Typ 1 und Proteoglykane (Caetano-Lopes et al. 2007; Mollentze et al. 2021).

In verschiedenen Studien konnte die osteogene Differenzierung von MSCs unterschiedlicher Spezies und Gewebequellen nachgewiesen werden (Alipour et al. 2015; Hillmann et al. 2016; Arévalo-Turrubiate et al. 2019; Arnhold et al. 2019; Merlo et al. 2019), wobei UCB- und UCT-MSCs gegenüber ASCs, BM-MSCs und TT-MSCs ein niedrigeres Differenzierungspotential aufweisen (Burk et al. 2013). Ein besonders hohes osteogenes Potential weisen equine ASCs, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, im Vergleich zu caninen und porcinen (Schwarz et al. 2012) sowie humanen ASCs (Hillmann et al. 2016) auf. Auch die Gewebeherkunft der Zellen hat einen Einfluss auf das osteogene Differenzierungspotential. Arnhold et al. (2019) wiesen nach, dass ASCs der sc-Fettgewebelokalisation ein gegenüber retroperitonealem und Lipoma-Fett höheres osteogenes Differenzierungspotential besitzen (Arnhold et al. 2019). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Während bei der Überprüfung der ALP-Aktivität an Tag 14 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lokalisationen festgestellt werden konnten, wiesen an Tag 21 abd-ASCs-_{EXP} gegenüber abd-ASCs-_{SVF} und rb-ASCs-_{EXP} ein signifikant höheres osteogenes Differenzierungspotential auf (**Kap. 4.3.2.2–4.3.2.3.**). ALP weist eine Osteoblasten-Aktivität nach und stellt somit einen bedeutenden Marker innerhalb der Osteoblasten-Differenzierung dar (Trivedi et al. 2020). In

der vorliegenden Studie wurde eine ALP-Aktivitätsbestimmung gemäß anderen Studien durchgeführt (Arnhold et al. 2019; Westhauser et al. 2019; Trivedi et al. 2020), wobei bei allen Proben eine leicht erhöhte und bei sc-ASCs-_{EXP} eine signifikant erhöhte ALP-Aktivität nachgewiesen werden konnten, abgesehen von einem Tier (**Kap. 4.3.2.2.**). Zeitgleich konnte eine Matrixmineralisierung bei allen Proben durchlichtmikroskopisch beobachtet werden (Tag 14), wobei die von diesem einen Tier am geringsten ausgeprägt war (**Kap. 4.3.2.1.**). Der ALP-Assay (Abcam, #ab83371) weist eine Detektions-Sensitivität von ~1 µU auf und stellt damit ein hochsensitives Verfahren dar. Die ALP-Aktivität von dem genannten Tier muss unterhalb der Detektionsgrenze gelegen haben. Arnhold et al. (2019) hingegen beschrieben, dass eine Matrixmineralisierung allein bei equinen sc-ASCs-_{SVF}, nicht aber bei retroperitonealen und Lipoma-ASCs-_{SVF} nachgewiesen wurde und dass beim Hund ebenso eine höhere Matrixmineralisierung bei sc-ASCs-_{SVF} gegenüber ASCs aus viszeralem Gewebe festgestellt wurde (Yaneselli et al. 2018; Arnhold et al. 2019). In den zitierten Studien wurden allerdings ausschließlich ASCs-_{SVF} und nicht, wie in der vorliegenden Studie, ASCs-_{EXP} unterschiedlicher Gewebelokalisationen miteinander verglichen. Gittel et al. (2013) verglichen die EXP- mit der SVF-Methode, allerdings nur bei sc-ASCs, und stellten durch die Messung des IODs keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Isolierungsverfahren hinsichtlich des osteogenen Differenzierungspotentials fest (Gittel et al. 2013). Es sollte hierbei allerdings berücksichtigt werden, dass die Messung des IOD nicht das sensitivste Verfahren darstellt (Burk et al. 2013). Folgestudien wären sinnvoll, in denen das Differenzierungspotential von rb- und sc-ASCs der beiden Isolierungsmethoden miteinander verglichen werden.

Inwiefern die Passagezahl das osteogene Differenzierungspotential beeinflusst, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. In anderen Studien wird beschrieben, dass MSCs niedriger Passagezahl (P1 bis P2), verglichen mit MSCs höherer Passagezahl (P4), ein höheres Potential zur Osteogenese aufweisen (Ostanin et al. 2008; Braun et al. 2010), wobei Zellen der P9 als resistent beschrieben werden (Ostanin et al. 2008). Andere Studien zeigen auf, dass MSCs höherer Passagezahlen im Gegensatz zu Zellen niedriger Passagezahlen eine höhere ALP-Aktivität und ein somit erhöhtes osteogenes Potential aufweisen (Wang et al. 2008; Zhao et al. 2012).

Equine Präadipozyten weisen ein hohes osteogenes Differenzierungspotential auf. Die **Hypothese 1.d.** wurde in Bezug auf das osteogene Differenzierungspotential verworfen, da signifikante Unterschiede zwischen abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} nachgewiesen wurden (IOD, Tag 21). Die **Hypothese 1.e.** wurde hingegen angenommen, da signifikante Unterschiede zwischen Präadipozyten der verschiedenen Lokalisationen bestanden (IOD, Tag 21).

5.6.1.3. Chondrogenese

Die Untersuchung des chondrogenen Differenzierungspotentials *in vitro* stellt eine wichtige Grundlage für die klinische Anwendung von MSCs in der Pferdeorthopädie dar. 2019 wurde das erste auf chondrogen vorkonditionierten Stammzellen (PB-MSCs) beruhende Medikament für den Markt zugelassen („Arti-Cell® Forte“, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland) und findet zur Behandlung von Gelenkserkrankungen beim Pferd seither Einsatz (Broeckx et al. 2019; Emmerich 2020; Waselau 2021).

Die chondrogene Induktion *in vitro* erfolgte gemäß Protokollen anderer Studien (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016) (**Kap. 3.4.3.1.**). Auch wenn das 3D-Mikropellet-Kulturverfahren aufgrund der hohen Sensitivität verglichen zu den anderen Verfahren laut Prosser et al. (2019) zu favorisieren ist (Prosser et al. 2019), wurde in der vorliegenden Arbeit die Standard-3D-Micromass-Pelletkultur in 15 ml-Zentrifugenröhrchen in Übereinstimmung mit verschiedenen Studien durchgeführt (Giovannini et al. 2008; Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Zahedi et al. 2017). Zur Herstellung des Zellpellets wurden 5×10^5 Zellen gemäß anderen Studien gewählt (Kang et al. 2013; Seo et al. 2013; Zahedi et al. 2017). Die Inkubation fand in 2 ml chondrogenem Induktionsmedium für 21 Tage statt, wie in einer Studie von Zahedi et al. (2017) für equine BM-MSCs beschrieben wurde (Zahedi et al. 2017). Demgegenüber setzten andere Forschungsgruppen 1 ml (Kang et al. 2013; Seo et al. 2013) oder nur 0,5 ml chondrogenes Differenzierungsmedium ein (De Schauwer et al. 2011a; Lee et al. 2011) und mit 3×10^5 Zellen (Schröck et al. 2017) bzw. $2,5 \times 10^5$ Zellen (Zhang et al. 2010; De Schauwer et al. 2011a) teils auch niedrigere Zellzahlen.

Als chondrogenes Differenzierungsmedium kam ein Medium mit einem hohen Glukosegehalt zum Einsatz, um die feste Struktur und Kompaktheit der Zellpellets zu fördern (Prosser et al. 2019). Dieses beinhaltete TGF β 3, das einen bedeutenden chondrogenen Induktionsfaktor darstellt. Alternativ hätten TGF β 1, TGF β 2 und TGF β 5 zum Einsatz kommen können, die allesamt MSCs dazu stimulieren, extrazelluläre Matrixmoleküle wie Proteoglykan und Kollagen Typ 2 zu bilden (Chimal-Monroy und De Leon 1997; Worster et al. 2000). Auch Ascorbinsäure induziert als chondroinduktiver Faktor die Kollagenexpression (Perucca Orfei et al. 2019) und Prolin stellt eine für die Bildung von Kollagen (Dickhut et al. 2008) essentielle Aminosäure dar. Des Weiteren wurden ITS als Serumersatz (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016; BöYük und Yiğit 2022) und Dexamethason als weiterer chondroinduktiver Faktor eingesetzt (Berg et al. 2009). NK in Pelletform wurden in der vorliegenden Studie nicht mitgeführt, da eine kompakte Struktur des Zellpellets ohne den Einsatz chondrogener Induktionsfaktoren nicht erzielt werden kann und es zu Zellverlust bis zum Zerfallen des Pellets führen kann (Vidal et al. 2008; Kisiel et al. 2012), wie in Vorversuchen zu der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde (**Kap. 3.4.3.1.**).

Der Nachweis der chondrogenen Differenzierung erfolgt standardmäßig über eine histologische Färbung, in der vorliegenden Studie ausschließlich über eine Alcianblau-Färbung. Während in einigen Studien allein die Alcianblau-Färbung zum Einsatz kommt (Braun et al. 2010; Arnhold et al. 2019), werden in anderen Studien zusätzlich die Masson's Trichrom- und Safranin O-Färbung verwendet (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Eine (Semi-)Quantifizierung der Chondrogenese erweist sich gegenüber der adipogenen und osteogenen Differenzierung beim Pferd als schwierig, da es nicht die Möglichkeit einer Enzymaktivitätsbestimmung gibt und beim Pferd für immunhistochemische Untersuchungen und ELISA erst wenige pferdespezifische Antikörper kommerziell erhältlich sind. Auch fehlen hierzu weiterführende Studien spezifisch zum Pferd. Die Bewertung der chondrogenen Differenzierung findet standardmäßig über den „Bern-Score“, den Grogan et al. (2006) entwickelten, nach der Safranin O/Fast Green-Färbung statt (Grogan et al. 2006). Dieser Score wird seither standardmäßig eingesetzt (Burk et al. 2013; Gittel et al. 2013; Hillmann et al. 2016). In der vorliegenden Arbeit wurde der „Bern-Score“ insofern modifiziert, als die Bewertung der Chondrogenese direkt im Anschluss an die Alcianblau-Färbung erfolgte, während die Bewertungskriterien des „Bern-Score(s)“ die gleichen blieben (Grogan et al. 2006).

Bei allen Proben konnte eine chondrogene Differenzierung nachgewiesen werden, wobei keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Isolationsmethode und, anders als erwartet, auf die Herkunft der ASCs festgestellt wurden. Es wurde vielmehr vermutet, dass ASCs aus dem metabolisch aktiven abd-Fettgewebe ein höheres chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen, wie bereits für das adipogene und osteogene Differenzierungspotential im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgezeigt wurde (**Kap. 4.3.1.2.** und **4.3.2.3.**). Arnhold et al. (2019) wiesen nach, dass equine MSCs aus sc- und retroperitonealem Fettgewebe ein höheres chondrogenes Differenzierungspotential gegenüber ASCs aus Lipoma-Fett besitzen (Arnhold et al. 2019). Bei der Maus hingegen wurde ein höheres Potential bei sc-ASCs gegenüber viszeralen ASCs nachgewiesen (Tang et al. 2017). Gegenüber den beim Pferd erzielten Resultaten stellt sich die chondrogene Differenzierung caniner MSCs, insbesondere caniner ASCs (Strioga et al. 2012; Teunissen et al. 2021), herausfordernd dar. In mehreren Studien konnte kein ausreichender Effekt auf die Chondrogenese erzielt werden (Russell et al. 2016; Endo et al. 2019). Dass MSCs der EXP- und SVF-Methode ein vergleichbares chondrogenes Differenzierungspotential aufweisen, wie in der vorliegenden Studie aufgezeigt wurde, konnte bereits in anderen Studien für equine (Gittel et al. 2013) und humane MSCs (Lee et al. 2011) nachgewiesen werden.

Equine Präadipozyten weisen ein chondrogenes Differenzierungspotential auf. Die **Hypothese 1.d.** wurde angenommen, da keine signifikanten Unterschiede zwischen EXP- und SVF-ASCs in Bezug auf das chondrogene Differenzierungspotential nachgewiesen wurden. Die **Hypothese 1.e.** wurde hingegen abgelehnt, da keine signifikanten Unterschiede zwischen ASCs-_{EXP} der verschiedenen Fettgewebelokalisationen nachgewiesen wurden.

5.6.2. Immunphänotypische Untersuchung

Die Untersuchung des Oberflächenmarkerprofils als weiteres ISCT-Kriterium für MSCs erfolgte in Anlehnung an die Literatur (Ranera et al. 2011; Paebst et al. 2014) (**Kap. 2.1.2.1.**). Das gesamte von der ISCT vorgeschlagene Markerpanel (Dominici et al. 2006), wie es beispielsweise in einer Studie für equine ASCs, BM-MSCs, UCB- und UCT-MSCs (Paebst et al. 2014) oder in einer anderen Studie für equine und humane ASCs und TT-MSCs (Hillmann et al. 2016) untersucht wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit übereinstimmend mit verschiedenen anderen Publikationen beim Pferd nicht überprüft (De Mattos Carvalho et al. 2009; Alipour et al. 2015; Pall et al. 2016; Arnhold et al. 2019). Es wurde die Expression der für das Pferd bedeutenden Inklusionsmarker CD29, CD44, CD90 und CD105 und Exklusionsmarker CD45 und CD34 überprüft. CD34 soll ausschließlich auf kultivierten MSCs nicht exprimiert werden, während hingegen eine Expression auf nicht-kultivierten Zellen beschrieben wurde (Kaiser et al. 2007; Lin et al. 2012). Wie in **Kap. 2.1.2.1.** bereits aufgezeigt wurde, variiert das Antigenprofil des Pferdes gegenüber dem von der ISCT für humane MSCs beschriebenen. In der Studie von Paebst et al. (2014) wurden beispielsweise einzig die zusätzlich untersuchten Oberflächenmarker CD29 (ca. 51%) und CD44 (ca. 97%) von equinen MSCs aus Fettgewebe stabil exprimiert. Des Weiteren wurde CD90 (ca. 24%) nachgewiesen (Paebst et al. 2014). Dies stimmt mit verschiedenen Studien zu MSCs beim Pferd überein, wobei der Anteil der angefärbten Zellen zwischen verschiedenen Studien und in Abhängigkeit von der Gewebeherkunft der Zellen variierte (De Mattos Carvalho et al. 2009; De Schauwer et al. 2011b; Barberini et al. 2014; Paebst et al. 2014; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019). Arévalo-Turrubiarte et al. (2019) wiesen z.B. für CD90 eine deutlich höhere CD-Markereexpression für sc-Fettgewebe von der Schweifwurzelregion (ca. 97%) und der Nackenregion (ca. 85%) gegenüber der Studie von Paebst et al. (2014) nach, in der ebenfalls sc-ASCs der Schweifwurzelregion durchflusszytometrisch untersucht wurden (ca. 24%) (Paebst et al. 2014; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019). De Schauwer et al. (2014) zeigten auf, dass die CD29-Expression bei UCB- und UCM-MSCs (ca. 100% und 98%) deutlich höher gegenüber der von Paebst et al. (2014) für ASCs ermittelten war (ca. 38% und 51%) (De Schauwer et al. 2014; Paebst et al. 2014). Dies macht deutlich, dass die MSC-Herkunft einen entscheidenden

Einfluss auf die Oberflächenmarkerexpression aufweist. In der vorliegenden Studie konnten insgesamt sehr hohe und homogene CD-Markerexpressionen für die Inklusionsmarker CD29, CD44 und CD90 bei abd-ASCs nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} konnte nicht nachgewiesen werden, wie bereits eine andere Studie für humane synoviale MSCs aufzeigte (Lee et al. 2011). Bei equinen MSCs konnte der Oberflächenmarker CD105 in einigen Studien zu einem hohen Anteil (78 bis 93%) (Barberini et al. 2014), in anderen zu einem moderaten Anteil (ca. 30 bis 52%) (Hillmann et al. 2016; Arnhold et al. 2019) und in wiederum anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Ranera et al. 2011). Die vorliegende Studie bestätigte das Resultat von Ranera et al. (2011) in Bezug auf die CD105-Expression. In der vorliegenden Studie konnten die Exklusionsmarker CD34 und CD45 in Übereinstimmung zu verschiedenen Studien bei equinen (De Schauwer et al. 2011b; Ranera et al. 2011; Kang et al. 2013; Paebst et al. 2014; Arnhold et al. 2019), caninen (Yaneselli et al. 2018) und humanen MSCs (De Ugarte et al. 2003) durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden. Insgesamt lässt sich sagen, dass die erzielten Resultate trotz des Fehlens eines Universalsets von MSC-Markern in guter Übereinstimmung zur Literatur sind. Beim Pferd besteht allerdings die Schwierigkeit, dass nur wenige pferdespezifische Antikörper kommerziell erhältlich sind und Antikörper gegen andere Spezies teilweise nicht kreuzreagieren (Ibrahim et al. 2007; Ranera et al. 2011; Burk et al. 2013). Daher war eine Etablierung des Antikörperpanels als Vorarbeit notwendig (nicht weiter beschrieben).

Beachtet werden sollte bei der Untersuchung der Oberflächenmarker (analog zu den vorherigen Versuchen), dass auch eine Interspezies- und Interdonorvariabilität sowie die Passagezahl die CD-Markerexpression beeinflussen kann (**Kap. 2.1.3.4.**). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich ASCs der P3 und P4 gemäß anderer Studien durchflusszytometrisch untersucht (De Schauwer et al. 2011b; Ranera et al. 2011; Paebst et al. 2014). Unterschiede in den eingesetzten Antikörpern (Hersteller, Klon, Verdünnung) sowie den enzymatischen Methoden, mittels derer die Zellen vor der durchflusszytometrischen Untersuchung gewonnen werden, könnten die CD-Markerexpression beeinflussen und zu unterschiedlichen Resultaten zwischen verschiedenen Forschungsgruppen führen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht.

Neben Einzel- und Kombinationsfärbungen wurden Isotypkontrollen und ungefärbte Kontrollen als NK mitgeführt. Isotypkontrollen werden zwar bisher nicht in allen Studien eingesetzt, sollten aber standardmäßig zum Ausschluss unspezifischer Hintergrundstrahlung mitgeführt werden (**Kap. 3.5.1.**), wie es auch in Studien für equine MSCs beschrieben wurde (Ranera et al. 2011; Paebst et al. 2014; Hillmann et al. 2016; Hagen et al. 2021). Neben den Isotypkontrollen wurden in der vorliegenden Arbeit Positivkontrollen (PBMC und BAL) mitgeführt, die nicht standardmäßig in Studien beim Pferd beschrieben werden. In der vorliegenden Studie wurden

pro Probe mindestens 10.000 Zellen bis maximal 100.000 Zellen („events“) als Rohdaten gemessen, wobei nicht mehr als 20.000 „events“ pro Sekunde erhoben wurden. Dies ist in guter Übereinstimmung zu anderen Studien, in denen z.B. 30.000 Zellen pro Probe (Carvalho et al. 2013) oder 10.000 bis 200.000 Zellen pro Probe (Paebst et al. 2014) erfasst wurden.

Eine molekularbiologische Untersuchung hätte zur Überprüfung der durchflusszytometrischen CD-Marker-Analyse sicherlich durchgeführt werden können, so wie es in verschiedenen Studien beschrieben wurde (Ranera et al. 2011; Metcalf et al. 2016; Mohanty et al. 2016; Zahedi et al. 2017; Merlo et al. 2019). Aufgrund der erzielten Resultate und in Übereinstimmung mit anderen Studien beim Pferd (De Schauwer et al. 2011b; Kang et al. 2013; Hillmann et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019) wurde eine solche molekularbiologische Untersuchung allerdings nicht durchgeführt und die immunphänotypische Analyse als MSC-Nachweis auf Grundlage der ISCT-Kriterien (Dominici et al. 2006) als ausreichend bewertet (**Kap. 2.1.2.**).

Die Zellviabilität für ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} war nahezu vergleichbar (ca. 70%). Beide Verfahren (EXP und SVF) sind folglich beim Pferd zur Isolierung vitaler Zellen gleichermaßen geeignet, wie es bereits in anderen Studien beschrieben wurde (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013; Priya et al. 2014; Sandhu et al. 2017).

Equine abd-ASCs sind positiv für CD29, CD44, CD90 und negativ für CD34 und CD45. CD105 konnte in der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen abd-ASCs-_{EXP} und abd-ASCs-_{SVF} nachgewiesen werden, sodass die **Hypothese 1.d.** hinsichtlich des Oberflächenmarkerprofils angenommen wurde.

5.7. Kardiomyogene Differenzierungsversuche

Das kardiomyogene Differenzierungspotential wurde ausschließlich bei equinen abd-ASCs-_{SVF} überprüft, da abd-ASCs in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Isolierungserfolgs, des Proliferations- und tripotenten Differenzierungspotentials gute Erfolge erzielten (**Kap. 4.2.2.–4.2.3.** und **Kap. 4.3.**) und bei anderen Spezies i.d.R. ASCs-_{SVF} für die kardiomyogene Differenzierung verwendet wurden (Van Dijk et al. 2008; Choi et al. 2010; Yang et al. 2012; Ibarra-Ibarra et al. 2019).

Der Erfolg der kardiomyogenen Differenzierung hängt sowohl bei MSCs als auch bei ESCs und iPSCs nicht nur vom gewählten Induktionsprotokoll, den Differenzierungsmedien, Inkubationszeiten und eingesetzten Faktorkonzentrationen ab, sondern auch von der Differenzierungskapazität der Zellen (multipotent vs. pluripotent, **Kap. 2.1.1.**) und dem gewählten 2D- bzw. 3D-Zellkulturmodell (Mummery et al. 2012; Denning et al. 2016). Auch die

starke Passageabhängigkeit der Zellen auf den Differenzierungserfolg ist wiederum zu berücksichtigen. Zellen aus P2 bis P6 weisen das größte Differenzierungspotential auf, während dieses hingegen in späteren Passagen abnimmt (Xu et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Zellen der P3 bis P6 kardiomyogen induziert.

Im Folgenden wird zunächst die molekularbiologische Untersuchung als integraler Bestandteil der Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs diskutiert. Bevor die Genexpressionsanalyse innerhalb der kardialen Differenzierungsversuche mittels der SYBR Green RT-qPCR durchgeführt werden konnte, erfolgte die in **Kap. 3.7.5.2.** beschriebene RT-qPCR-Etablierung gemäß der guten wissenschaftlichen Praxis auf Grundlage der „Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments“ (MIQE-Richtlinien), in denen Mindestinformationen zur Bewertung eines RT-qPCR-Experiments beschrieben sind (Bustin et al. 2009). Von der Probengewinnung über die Probenlagerung und -aufarbeitung bis hin zur Datenanalyse sind einheitliche Richtlinien und Methoden notwendig. Diese dienen der Standardisierung und Reproduzierbarkeit von RT-qPCR-Resultaten sowohl innerhalb eines Experimentes als auch zwischen verschiedenen Studien und wurden in der vorliegenden Studie berücksichtigt.

Die RT-qPCR-Etablierung erfolgte auf Grundlage der MIQE-Richtlinien nach Bustin et al. (2009).

Da die Untersuchung der Expression nur eines Gens als nicht ausreichend erachtet wurde, wurden repräsentativ mehrere pluripotenzassoziierte (*OCT4/POUF5*, *MYC*, *DNMT3B*) und kardiale Marker (*GATA4*, *NKX2-5*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7*) getestet. Eine Genexpressionsanalyse fand neben Tag 0 (T0) ausschließlich zum Zeitpunkt T3 gemäß anderen Studien (Wystrychowski et al. 2016; Hasani et al. 2020) statt und nicht zusätzlich zu den Zeitpunkten T1 und T2, wie es von Choi et al. (2010) beschrieben wurde (Choi et al. 2010). Dies kann damit begründet werden, dass keine zellmorphologischen Veränderungen in Richtung eines kardiomyozytären Phänotyps über den gesamten Induktionszeitraum beobachtet wurden und eine Aufregulierung der Genexpression kardialer Marker als unwahrscheinlich betrachtet wurde. Weder nach Behandlung mit 5-AZA noch mit unterschiedlichen Konzentrationen der Faktoren Act A, BMP-4 und DKK-1 konnte zum Zeitpunkt T3 eine Aufregulierung der kardialen Marker gegenüber der NK beobachtet werden, im Gegensatz zu Studien, die eine solche beschreiben (Yang et al. 2012; Carvalho et al. 2013; Jiang et al. 2018; Kakkar et al. 2019). Nicht einmal die frühkardialen Marker *GATA4* und *NKX2-5* wurden hochreguliert, die als Schlüsselregulatoren innerhalb der embryonalen Kardiomyogenese essentiell sind (Jamali et al. 2001; Maitra et al. 2009) (**Kap. 2.3.1.1.**). Dass die Promoter *GATA4* und *NKX2-5* nicht auf eine Demethylierung durch 5-AZA reagiert haben,

halten Choi et al. (2010) für nicht überraschend, da die Promoter dieser Gene nicht direkt auf eine solche Demethylierung reagieren (Choi et al. 2010). Wystrychowsky et al. (2016) wiesen eine höhere Expression von *GATA4* in epikardialen ASCs nach, die möglicherweise bei diesen Zellen auf ein gegenüber perikardialen und omentalen ASCs höheres Differenzierungspotential hindeutet (Wystrychowski et al. 2016).

Des Weiteren wurden die Genexpressionen der Transkriptionsfaktoren *OCT4/POUF5*, *MYC* und *DNMT3B* zu den Zeitpunkten T0 und T3 untersucht. Diese Faktoren sind mit der Pluripotenz und Fähigkeit zur Selbsterneuerung von ESCs assoziiert (Nichols et al. 1998; Watanabe et al. 2002; Calloni et al. 2013). Während bei equinen ASCs und BM-MSCs bereits *OCT4/POUF5* und *DNMT3B* neben *SOX2* und *NANOG* nachgewiesen wurden (Ranera et al. 2012; Esteves et al. 2014), konnte die Genexpression von *MYC* beim Pferd meines Wissens in Studien bisher nicht bestätigt werden. Demgegenüber wurde eine überraschend hohe *MYC*-Expression bei humanen ASCs in einer Studie von Kozłowska et al. (2019) nachgewiesen, die passageabhängig variierte. Während die *MYC*-Expression bei Zellen der P1 hoch war, nahm sie in P5 ab und in P10 wieder zu (Kozłowska et al. 2019). Im Allgemeinen existieren in der Humanmedizin hinsichtlich der Expression der pluripotenzassoziierten Marker teils kontroverse Ansichten. Während Kozłowska et al. (2019) für ASCs und BM-MSCs die Expression von *OCT4/POUF5* und *SOX2* in Langzeitkulturen beschrieben (Kozłowska et al. 2019), wurden in einer Studie von Pierantozzi et al. (2011) allein *NANOG*, nicht aber *OCT4/POUF5* und *SOX2* nachgewiesen (Pierantozzi et al. 2011). Riekstina et al. (2009) wiesen für BM-MSCs *OCT4/POUF5*, *NANOG* und *SSEA-4* nach, während ASCs zusätzlich *SOX2* exprimierten (Riekstina et al. 2009). In der vorliegenden Studie konnte die Expression der pluripotenzassoziierten Marker *OCT4/POUF5*, *DNMT3B* und *MYC* zum Zeitpunkt T0 bei equinen abd-ASCs_{-SVF} bestätigt werden.

Werden MSCs zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien induziert, kommt es zu einer Herunterregulierung der pluripotenzassoziierten ESCs-Marker, wie in Studien bei Nagern und dem Menschen beschrieben wurde (Safwani et al. 2012; Calloni et al. 2013). Die Effizienz der kardiomyogenen Differenzierung kann folglich auch über diese pluripotenzassoziierten Marker bestimmt werden. Im Rahmen aller Induktionsversuche konnte eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression nach dreiwöchiger Induktionszeit (zum Zeitpunkt T3) sowohl bei induzierten als auch i.d.R. bei nicht-induzierten Zellen beobachtet werden (ausgenommen 2. Teilversuch der Induktion mit Act A, BMP-4 und DKK-1: *DNMT3B* und *OCT4/POUF5*, T0 vs. T3-NK). Da von dieser Herunterregulierung i.d.R. nicht nur die induzierten Zellen betroffen waren, konnte ausgeschlossen werden, dass eine Differenzierungsaktivität stattgefunden hat. Vielmehr könnte diese Herunterregulierung auf eine verringerte Zellvitalität und das Auftreten von Seneszenz der Zellen zum Zeitpunkt T3

hindeuten, obwohl in Studien für humane ASCs eine gute Lebensfähigkeit bis P7 (Kern et al. 2006) und für canine ASCs eine solche bis P4 bzw. P10 beschrieben wurde (Guercio et al. 2013; Bahamondes et al. 2017).

Abseits der Untersuchung der kardialen und pluripotenzassoziierten Marker wurde zudem die Genexpression eines myogenen Markers untersucht, da in einer früheren Studie beschrieben wurde, dass 5-AZA eine myogene Differenzierung von MSCs bewirken kann (Wakitani et al. 1995). Neben Myogenin (*MYOG*), *MyoD* und *MYF5* zählt auch *MYF6* zu den myogenen Faktoren, die in Zellen nicht-muskulären Ursprungs Myoblastenmerkmale induzieren können (Braun et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression des terminalen, myogenen Differenzierungsmarkers *MYF6* zum Ausschluss einer myogenen Differenzierung untersucht. An dieser Stelle hätte in Erwägung gezogen werden können, zusätzlich frühere myogene Differenzierungsmarker, wie *MYF5* und *MyoD*, zu untersuchen (Braun et al. 1989; Bentzinger et al. 2012).

Für die kardiomyogenen Differenzierungsversuche wurde auf eine SYBR Green RT-qPCR zurückgegriffen, die zwar weniger spezifisch als eine Sonden-(TaqMan®)-PCR ist (Ponchel et al. 2003), aber für die Zwecke der Studie als ausreichend befunden wurde. Dies konnte damit begründet werden, dass in erster Linie aufgezeigt werden sollte, ob eine Aufregulierung kardialer Marker nach der Induktion zum Zeitpunkt T3 stattfindet oder nicht. Da eine solche Aufregulierung nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der Einsatz eines spezifischeren Quantifizierungsverfahrens (Sonden-PCR) nicht weiter in Betracht gezogen. Außerdem konnte eine ausreichende Spezifität des RT-qPCR-Assays anhand der im Anschluss an die SYBR Green RT-qPCR durchgeführten Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen und so ein Vorhandensein von beispielsweise Primer-Dimeren, die zu falsch positiven Resultaten führen (Bustin et al. 2009), vermieden werden (**Kap. 4.5.2.7.**).

Die SYBR Green RT-qPCR-Daten wurden überprüft, indem die Rohdaten analysiert und auf ihre Qualität überprüft wurden. Hierbei wurde auf Konzentrationsunterschiede aufgrund von Pipettierfehlern und (stochastischen) Schwankungen in den C_t -Werten geachtet. Oberhalb des messbaren Bereichs liegende C_t -Werte ($C_t > 40$, „out of range“) wurden aus den weiteren Berechnungen als „missing values“ ausgeschlossen. Die Messungen fanden in Tripletts statt und die Versuche wurden im Duplikat ausgeführt, um eine möglichst große Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit der Daten gewährleisten zu können.

Wäre in der vorliegenden Arbeit eine relative Quantifizierung nach Livak zum Einsatz gekommen (Livak und Schmittgen 2001; Schmittgen und Livak 2008) (**Kap. 3.7.6.3.**), hätte diese bei Vorliegen ungleicher Effizienzen zu einer ungenauen Berechnung der relativen Konzentrationen führen können (Bustin et al. 2009). In diesem Fall wäre sicherlich das „qBase-

Modell“ zum Einsatz gekommen, welches eine Effizienzkorrektur beinhaltet und, gegenüber der Methode nach Pfaffl (Pfaffl 2001), den Einsatz mehrerer Referenzgene berücksichtigen kann (Hellemans et al. 2007).

Nach der kardiomyogenen Induktion mit 5-AZA sowie Act A, BMP-4 und DKK-1 konnte im Rahmen der Genexpressionsanalyse weder eine Aufregulierung der kardialen Marker *GATA4*, *NKX2-5*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7* noch des Muskelmarkers *MYF6* im Vergleich zu den Positivkontrollen nachgewiesen werden. Die **Hypothesen 2.a. und 2.b.** ließen sich somit für die gewählten Versuchsbedingungen nicht bestätigen.

Im Folgenden werden die Effekte der Induktionsfaktoren 5-AZA (**Kap. 5.7.1.**) sowie Act A, BMP-4 und DKK-1 (**Kap. 5.7.2.**) auf das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs vertiefend diskutiert.

5.7.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin

Insgesamt liegen widersprüchliche Berichte über den Effekt von 5-AZA in Bezug auf das kardiomyogene Differenzierungspotential von Präadipozyten vor. Während mehrere Studien eine erfolgreiche Differenzierung von MSCs in CLCs bei Spezies wie Nagern (Makino et al. 1999; Carvalho et al. 2013; Jiang et al. 2018), Kaninchen (Rangappa et al. 2003; Zhang et al. 2007), Schafen (Soltani et al. 2015) und dem Menschen (Antonitsis et al. 2007; Yang et al. 2012; Fathy et al. 2019) beschrieben, berichteten andere Studien analog zur vorliegenden Studie von einer nicht stattgefundenen kardiomyogenen Differenzierung (Balana et al. 2006; Lee et al. 2009; Safwani et al. 2012; Wystrychowski et al. 2016). Weder eine Exposition mit 5 bis 10 μM 5-AZA für 24 h noch eine wiederholte Exposition konnten eine Hochregulation der Expression kardialer Marker bewirken (Lee et al. 2009; Safwani et al. 2012; Wystrychowski et al. 2016).

Ursächlich für die unterschiedlichen Resultate zwischen verschiedenen Studien könnte die unspezifische Wirkung von 5-AZA sein (Balana et al. 2006), die auch zu einer unspezifischen Aktivierung der Genexpression führt. Bei Nagern wurden hinsichtlich der kardiomyogenen Differenzierung deutlich bessere Resultate erzielt, wie in mehreren Studien mit denselben oder anderen Induktionsprotokollen nachgewiesen wurde (Rangappa et al. 2003; Jumabay et al. 2010; Carvalho et al. 2013; Jiang et al. 2018).

Der Nachweis einer kardiomyogenen Differenzierung fand, wie bereits in den **Kap 2.3.2.** und **2.3.3.** und in anderen Studien beschrieben wurde, über das Auftreten zellmorphologischer Veränderungen (Rangappa et al. 2003; Yang et al. 2012; Carvalho et al. 2013; Kakkar et al. 2019), die erhöhte Expression myokardialer Markergene (Yang et al. 2012; Kakkar et al. 2019) sowie ein funktioneller Nachweis über eine spontane Schlagaktivität der Zellen statt

(Rangappa et al. 2003). Auch das Vorhandensein herzspezifischer Ionenkanäle wurde in einigen Studien nachgewiesen (Yang et al. 2012; Kakkar et al. 2019).

Um zu überprüfen, inwieweit die beschriebenen Veränderungen auch bei equinen abd-ASCs-SVF auftraten, wurden die Zellen gemäß dem Protokoll von Yang et al. (2012) für 48 h 10 µM 5-AZA exponiert (Yang et al. 2012). Da in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, dass 5-AZA eine zytotoxische Wirkung aufweist und bei längerer oder wiederholter Exposition die Zellproliferation beeinträchtigen und zur Zellablösung sowie zum Zelltod führen kann (Taylor et al. 1996; Rangappa et al. 2003; Lee et al. 2009), wurden eine kurze Expositionszeit gewählt und auf den Einsatz einer höheren Faktorkonzentration verzichtet. In anderen Studien wurde die Expositionszeit sogar auf 24 h verkürzt (Tomita et al. 1999; Antonitsis et al. 2007), ebenso wie in der Studie von Kakkar et al. (2019), in der eine Exposition mit 6 µM 5-AZA als ausreichend beschrieben wurde (Kakkar et al. 2019). Da 5-AZA unter den gewählten Versuchsbedingungen entgegen anderer Studien (Rangappa et al. 2003; Yang et al. 2012; Carvalho et al. 2013) keinen Effekt aufwies, wurden weder verschiedene Konzentrationen noch Expositionszeiten untersucht und auf eine Kombination von 5-AZA mit weiteren Induktionsfaktoren, wie z.B. BMP-4 (Jiang et al. 2018), verzichtet. Einen limitierenden Faktor in der vorliegenden Studie stellt sicherlich die Differenzierung der Zellen als Monolayer-Kultur und das Fehlen einer Beschichtung dar. In der vorliegenden Studie konnte unabhängig von der 5-AZA-Exposition eine Zellablösung bei drei von fünf Tieren beobachtet werden, die nicht auf die Zytotoxizität von 5-AZA, sondern vielmehr auf das Fehlen einer Beschichtung zurückgeführt werden kann. Demgegenüber erwies sich in anderen Studien der Einsatz von unbeschichteten Kulturgefäßen bei der kardiomyogenen Induktion muriner (Carvalho et al. 2013) und humaner (Yang et al. 2012) ASCs mit 5-AZA als erfolgreich.

5-AZA stellt den am häufigsten beschriebenen kardiomyogenen Induktionsfaktor dar. Die **Hypothesen 2.a. und 2.b.** müssen für die experimentellen Bedingungen der vorliegenden Arbeit abgelehnt werden, da unter diesen kein Effekt von 5-AZA auf equine abd-ASCs-SVF erzielt werden konnte.

5.7.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1

In Bezug auf die Faktoren Act A, BMP-4 und DKK-1 existieren vergleichsweise wenige Publikationen, in denen die kardiomyogene Differenzierung von ASCs untersucht wurde. Das in der vorliegenden Studie gewählte Induktionsprotokoll kam bisher bei MSCs in der Literatur noch nicht zum Einsatz. Es existieren hingegen Studien, in denen BMP-4 alleine (Khaleghi et al. 2014; Jiang et al. 2018; Hasani et al. 2020) oder in Kombination mit anderen Induktionsfaktoren, wie 5-AZA (Jiang et al. 2018), bFGF (Hasani et al. 2020) oder VEGF

(Ibarra-Ibarra et al. 2019), bei Nagern (Jiang et al. 2018; Ibarra-Ibarra et al. 2019) und dem Menschen (Hasani et al. 2020) eingesetzt wurden. Beispielsweise induzierten Ibarra-Ibarra et al. (2019) murine ASCs mit BMP-4 und VEGF über vier Tage und setzten zusätzlich ein Methylcellulosemedium ein, das mit den Zytokinen IL-3 und IL-6 angereichert war (Ibarra-Ibarra et al. 2019). Ein solches angereichertes Medium wurde in der vorliegenden Studie nicht verwendet. Palpant et al. (2007) exponierten murine SVF-Zellen mit DKK-1, woraufhin eine Erhöhung des Differenzierungspotentials und das Auftreten kontrahierender CLCs beobachtet wurde (Palpant et al. 2007). Kanonische Wnt-Antagonisten, wie DKK-1 (**Kap. 2.3.1.2.**), sollen zu einer frühen kardialen Genexpression von *GATA4* und *NKX2-5* führen (Palpant et al. 2007).

Gegenüber MSCs kommen die Faktoren Act A, BMP-4 und DKK-1 bei der kardiomyogenen Induktion von pluripotenten ESCs und iPSCs deutlich häufiger zum Einsatz (Laflamme et al. 2007; Paige et al. 2010; Uosaki et al. 2011). Hier wurden oftmals komplexere Induktionsprotokolle angewendet, in denen die pluripotenten Stammzellen beispielsweise zunächst in Mouse Embryonic Fibroblast Conditioned Medium (MEF-CM), das mit bFGF angereichert war, in mit Matrigel beschichteten Kulturgefäßen kultiviert wurden, bevor das MEF-CM durch ein RPMI-B27-Medium ersetzt und die kardiomyogene Induktion angeschlossen wurde. Hier kamen 10 ng/ml (Laflamme et al. 2007) bzw. sogar 100 ng/ml Act A (Paige et al. 2010) für 24 h und 10 ng/ml BMP-4 für 4 Tage zum Einsatz. Während DKK-1 an Tag 2 bis 3 der Induktion die Kardiomyogenese inhibiert (Kattman et al. 2011), wirkt es später aktivierend (**Kap. 2.3.1.2.**) und wird oftmals an Tag 5 bis 11 (Paige et al. 2010) oder, wie in der vorliegenden Studie, an Tag 5 bis 7 (Uosaki et al. 2011) eingesetzt. Als Beschichtung wird insbesondere Matrigel verwendet, das hauptsächlich aus den EZM-Proteinen Laminin, Enactin und Kollagen IV besteht und verschiedene Wachstumsfaktoren, wie bFGF, TGF- β und den Platelet-derived growth factor beinhaltet. Matrigel soll die EZM in Stammzellkulturen nachahmen, die Pluripotenz von Stammzellen aufrechterhalten (Hughes et al. 2010) und die kardiomyogene Differenzierung fördern (Moon et al. 2013). Van Dijk et al. (2008) stellten die Hypothese auf, dass auch das Anheften von ASCs an die EZM-Moleküle, die physiologisch im gesunden Herzen vorhanden sind und beim Myokardinfarkt aufreguliert werden, die Stammzelldifferenzierung erhöhen würde. Laminin stellt, als Bestandteil von Matrigel, ein solches EZM-Molekül dar und spielt eine Rolle bei der Differenzierung von ASCs zu Kardiomyozyten, insbesondere während der späten Differenzierung (Van Dijk et al. 2008). Allerdings verhalf der Einsatz von Laminin in der vorliegenden Studie nicht dazu, eine kardiomyogene Differenzierung zu erreichen. Lediglich das Auftreten von Zellablösung konnte durch den Einsatz einer Beschichtung (gegenüber dem 5-AZA-Induktionsversuch) größtenteils eingedämmt werden.

Während in einigen Studien der die Kardiomyogenese-fördernde Effekt von BMPs beschrieben wurde (Takei et al. 2009; Grajales et al. 2012; Khaleghi et al. 2014), wiesen andere Forschungsgruppen nach, dass eine transiente Inhibition der BMP-Signalgebung die kardiomyogene Differenzierung *in vitro* induziert (Yuasa et al. 2005; Jumabay et al. 2010).

Auch wenn Act A, BMP-4 und DKK-1 innerhalb der embryonalen Kardiomyogenese wichtige Transduktionsfaktoren darstellen, konnten in der vorliegenden Arbeit keine Effekte auf das kardiomyogene Differenzierungspotential equiner abd-ASCs_{SVF} erzielt werden, auch nicht durch den Einsatz eines Laminin-beschichteten Kultursystems. Die **Hypothesen 2.a. und 2.b.** ließen sich mit den gewählten Protokollen somit nicht beweisen.

Trotz der vielfältigen in der Literatur beschriebenen Differenzierungsprotokolle ist es bisher nicht gelungen, den für die *in-vitro*-Kardiomyogenese optimalen Induktor zu finden (Kakkar et al. 2019), auch nicht in der vorliegenden Studie beim Pferd. Auch die Frage nach der am besten geeigneten MSC-Gewebequelle bleibt ungeklärt (Kakkar et al. 2019). Soltani et al. (2022) beschreiben die Notwendigkeit zukünftiger Forschungsstudien, die das kardiomyogene Differenzierungspotential von MSCs *in vitro* weiter untersuchen (Soltani und Mahdavi 2022).

5.8. Schlussfolgerungen und Ausblick

Wie bereits diskutiert wurde, sind MSCs nicht nur für die Anwendung in der regenerativen Medizin, sondern insbesondere auch für die Etablierung von *in-vitro*-Modellen geeignet. MSCs aus Fettgewebe sind heutzutage bei verschiedenen Spezies gut erforscht und weisen aufgrund ihrer Gewebeverfügbarkeit, ihrer guten Proliferations- und Differenzierungskapazitäten einige Vorteile gegenüber MSCs anderer Gewebequellen auf. Ungeachtet dessen bleiben bis heute Fragen in Bezug auf ihre Charakteristika, Wirkmechanismen, Wachstumseigenschaften und insbesondere ihr Differenzierungspotential *in vitro* offen. Erschwert wird dies zusätzlich dadurch, dass verschiedene Forschungsgruppen unterschiedliche Laborprotokolle verwenden, die zu verschiedenen Resultaten führen können. Hier sollten (soweit möglich) einheitlichere Standards in Bezug auf die Versuchsbedingungen und -protokolle auch zwischen verschiedenen Forschungsgruppen festgelegt werden.

Die vorliegende *in-vitro*-Studie trägt dazu bei, das Grundlagenwissen über equine ASCs zu erweitern, insbesondere hinsichtlich unterschiedlicher Fettgewebelokalisationen und Isolationsmethoden. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden zwei Themen schwerpunktmäßig untersucht, die Charakterisierung und der Vergleich der Zellen sowie die Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials. *In-vitro*-Studien können auch dazu beitragen, wichtige Erkenntnisse für *in-vivo*-Anwendungen zu liefern. Weitere Studien, in

denen insbesondere die (parakrinen) Wirkmechanismen von MSCs am Großtiermodell untersucht werden, sind nötig.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten hochvitale MSCs aus verschiedenen Fettgewebelokalisationen isoliert und kultiviert werden, die ein hohes Proliferations- und tripotentes Differenzierungspotential aufwiesen, wie es auf Grundlage verschiedener Studien erwartet wurde (Ranera et al. 2011; Burk et al. 2013; Hillmann et al. 2016). Eine wichtige Grundlage für die vorliegende Arbeit stellten die bereits beschriebenen Studien dar, in denen equine MSCs, die aus verschiedenen Fettgewebelokalisationen (Metcalf et al. 2016; Arévalo-Turrubiarte et al. 2019; Arnhold et al. 2019) bzw. mittels der beiden Isolierungsverfahren (Lee et al. 2011; Gittel et al. 2013) gewonnen wurden, hinsichtlich ihrer Charakteristika untersucht und verglichen wurden. Weitere Studien, die equine ASCs_{SVF} mit ASCs_{EXP} vergleichen, würden weitere Erkenntnisse über den Einfluss des gewählten Isolierungsverfahrens auf die Zellen liefern. Ein solcher Einfluss konnte in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf das tripotente Differenzierungspotential der Zellen nachgewiesen werden (**Kap. 4.3.1.4.** und **Kap. 4.3.2.3.**).

In Folgestudien sollten zudem eine homogenere Studienpopulation und insgesamt jüngere Donortiere einbezogen werden. Auch eine weitergehende Untersuchung des Multilinienspotentials equiner ASCs über das klassische tripotente Differenzierungspotential hinaus wäre anzuraten, um das Grundlagenwissen über equine MSCs zu erweitern.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die isolierten Zellen immunphänotypische und molekularbiologische Eigenschaften von MSCs auf. Die kardiomyogene Differenzierung erwies sich allerdings unter Einsatz verschiedener Induktionsprotokolle unter den gewählten Versuchsbedingungen als nicht erfolgreich. Weitere Induktionsfaktoren und -medien sowie Beschichtungsoptionen in Bezug auf das kardiomyogene Differenzierungspotential equiner ASCs zu untersuchen, wäre auf Grundlage der vorliegenden Arbeit allerdings nicht anzuraten. Vielmehr wird für Folgestudien empfohlen, pluripotente Stammzellen anstelle von multipotenten MSCs einzusetzen, die aufgrund ihres Pluripotenz-Verhaltens ein höheres kardiomyogenes Differenzierungspotential aufweisen, auch wenn es schwierig sein kann, die Pluripotenzbedingungen *in vitro* aufrecht zu erhalten (Bressan et al. 2020) (**Kap. 2.1.1.**). Aufgrund der in **Kap. 2.1.1.** beschriebenen Nachteile von ESCs wäre insbesondere der Einsatz von iPSCs anzuraten. iPSCs können durch Reprogrammierung aus Fibroblasten (Nagy et al. 2011; Breton et al. 2013), Keratinozyten (Sharma et al. 2014) und ASCs (Lee et al. 2016) durch beispielsweise den Einsatz viraler Vektoren, die für *OCT4/POUF5*, *SOX2*, *Klf4* und *MYC* kodieren, hergestellt und anschließend kardiomyogen induziert werden. Für die kardiomyogene Differenzierung sollte der Einsatz komplexerer 3D-Zellkulturmodelle (z.B.

embryonale Körperchen oder Organoid-Kulturen) in Erwägung gezogen werden, welche die physiologischen *in-vivo*-Bedingungen weitestgehend nachahmen können.

Wenn auf diese Weise ein speziesspezifisches *in-vitro*-Kardiomyozytenmodell etabliert werden könnte, wäre es möglich, das Vorhandensein herzspezifischer Ionenkanäle bzw. die kardiale Elektrophysiologie des Pferdes besser erforschen zu können, da in diesem Modell gleichzeitig mehrere für diese Spezies physiologische Ionenkanäle exprimiert werden. Zudem könnten neue in der Humanmedizin eingesetzte Medikamente *in vitro* vorselektiert werden, beispielsweise gegen das Vorhofflimmern des Pferdes, bevor es zu *in-vivo*-Anwendungen beim erkrankten Pferd kommt.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit liefern einen Erkenntnisgewinn in Bezug auf das Multilinienspotential equiner MSCs und sollen zukünftigen Studien, die das kardiomyogene Differenzierungspotential bei verschiedenen Spezies untersuchen, als Grundlage dienen.

Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft weitere bedeutende Erkenntnisse in Bezug auf die Stammzellforschung zu erwarten sind. MSCs stellen ein weites Forschungsfeld dar und sind beim Pferd in Bezug auf ihre klinische Anwendbarkeit bei orthopädischen Fragestellungen aktuell sehr gefragt. Die aus *in-vitro*-Studien im Großtiermodell gewonnenen Erkenntnisse (Grundlagenforschung) können auch für Fragestellungen in Bezug auf die Anwendung von MSCs in der Humanmedizin relevant sein.

6. Zusammenfassung

Charakterisierung equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe und Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials

Adulte, multipotente mesenchymale Stammzellen (MSCs) stellen nicht nur für die regenerative Medizin, sondern auch für die Etablierung von *in-vitro*-Modellen einen wichtigen Forschungsschwerpunkt dar. MSCs aus Fettgewebe (ASCs) eignen sich hierfür besonders und haben das Potential, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, darunter in Kardiomyozyten-ähnliche Zellen (CLCs), wie in Studien bei Menschen, Kaninchen und Nagern beschrieben wurde.

Ziel der Untersuchungen war es, (1) die mittels zwei Isolierungsverfahren aus unterschiedlichen Fettgewebelokalisationen gewonnenen MSCs hinsichtlich ihrer *in-vitro*-Charakteristika zu vergleichen. Im zweiten Teil der Studie (2) sollte das kardiomyogene Differenzierungspotential der Zellen erstmals beim Pferd *in vitro* untersucht werden, um das Grundlagenwissen in Bezug auf die Etablierung eines pferdespezifischen *in-vitro*-Kardiomyozytenmodells zu erweitern.

In die *in-vitro*-Studie wurden $n = 16$ Pferde einbezogen, von denen *post mortem* MSCs aus abdominalem (abd), retrobulbärem (rb) und subkutanem (sc) Fettgewebe mittels des Explantat-Verfahrens (ASCs-_{EXP}) und nach Kollagenaseverdau (ASCs-_{SVF}) gewonnen wurden. Nach Evaluierung des Isolierungserfolgs ($n = 16$), des Proliferationspotentials ($n = 3$) sowie des für das Zellwachstum am besten geeigneten Serumsupplements ($n = 3$) wurden die Zellen auf ihre Charakteristika als MSCs überprüft, wozu die Fähigkeit zur Plastikadhärenz, die Untersuchung des tripotenten Differenzierungspotentials über 7, 14 bzw. 21 Tage ($n = 6$) und das spezifische Oberflächenmarkerprofil ($n = 5$) zählten. Es folgte die Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials von abd-ASCs-_{SVF} ($n = 5$) mithilfe des Induktionsfaktors 5-Azacytidin (5-AZA) sowie der Faktoren Activin A (Act A), knochenmorphogenetisches Protein-4 (BMP-4) und Dickkopf-1 (DKK-1). Eine Untersuchung zellmorphologischer Veränderungen sowie Analyse der Expression kardialer und pluripotenzassoziierten Marker sowie eines Muskelmarkers mittels SYBR Green RT-qPCR wurden an Tag 0 (T0) und 3 Wochen nach Induktion (T3) abgeschlossen.

Plastikadhärente, Fibroblasten-ähnliche ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} konnten aus abd-, rb- und sc-Fettgewebe gewonnen werden. Während sich abd- und rb-ASCs hinsichtlich des Isolierungserfolgs annähernd gleich verhielten, wiesen sc-ASCs einen signifikant niedrigeren Isolierungserfolg auf. In Bezug auf die Zellproliferation wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lokalisationen und Isolationsmethoden festgestellt, jedoch ein

signifikanter Effekt des Serumsupplements. Das höchste adipogene Differenzierungspotential wiesen abd-ASCs_{-EXP} gegenüber rb- und sc-ASCs_{-EXP} an Tag 7 und abd-ASCs_{-SVF} gegenüber abd-ASCs_{-EXP} an Tag 14 auf. Das osteogene Differenzierungspotential erwies sich an Tag 14 zwischen ASCs der verschiedenen Lokalisationen und Isolierungsverfahren annähernd gleich. An Tag 21 wiesen abd-ASCs_{-EXP} gegenüber abd-ASCs_{-SVF} und rb-ASCs_{-EXP} ein höheres osteogenes Differenzierungspotential auf. Das chondrogene Differenzierungspotential war bei allen Zellen unabhängig von der Gewebequelle und Isolationsmethode vergleichbar. Die untersuchten Zellen waren positiv für CD29, CD44, CD90 sowie negativ für CD34 und CD45 und exprimierten die pluripotenzassoziierten Marker *OCT4/POUF5*, *MYC* und *DNMT3B*. Eine kardiomyogene Differenzierung konnte weder mithilfe von 5-AZA noch mithilfe unterschiedlicher Konzentrationen von Act A, BMP-4 und DKK-1 nachgewiesen werden. Es wurden weder zellmorphologische Veränderungen, eine spontane Schlagaktivität noch eine Aufregulierung der kardialen Marker *NKX2-5*, *GATA4*, *TNNI3*, *MYH6*, *MYH7* sowie des Muskelmarkers *MYF6* zum Zeitpunkt T3 im Vergleich zu den Positivkontrollen mittels SYBR Green RT-qPCR nachgewiesen.

Die vorliegende Studie vergleicht die mittels der beiden Isolierungsverfahren aus den drei Fettgewebelokalisationen isolierten equinen MSCs in Bezug auf ihre Charakteristika *in vitro*, wobei eine Isolierung equiner rb-ASCs zuvor noch nicht beschrieben wurde. Auch wenn eine kardiomyogene Differenzierung von MSCs bei verschiedenen Spezies *in vitro* nachgewiesen wurde, lagen hierzu bisher keine Studien zum Pferd vor. In der vorliegenden Studie wird erstmals der Effekt des in der Literatur am häufigsten eingesetzten kardiomyogenen Induktors 5-AZA sowie der an der embryonalen Kardiomyogenese beteiligten Faktoren Act A, BMP-4 und DKK-1 untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass equine ASCs_{-EXP} und ASCs_{-SVF} aus allen untersuchten Fettgewebelokalisationen gewonnen und aufgrund ihrer Charakteristika eindeutig als MSCs identifiziert werden konnten. Die Zellen wiesen ein hohes Proliferations- und tripotentes Differenzierungspotential auf. Eine kardiomyogene Differenzierung equiner abd-ASCs_{-SVF} konnte allerdings unter Einsatz der gewählten Induktionsfaktoren und Versuchsbedingungen nicht erreicht werden. Die vorliegende Studie trägt dazu bei, das Grundlagenwissen über die *in-vitro*-Charakteristika equiner ASCs zu erweitern. Weitere Vergleichsstudien, in denen der Einfluss der Isolationsmethode auf equine MSCs verschiedener Herkünfte überprüft wird, sind anzuraten. In Bezug auf die kardiomyogenen Differenzierungsversuche ist der Einsatz pluripotenter Stammzellen anstelle der multipotenten MSCs in Erwägung zu ziehen, da diese ein höheres Differenzierungspotential aufweisen.

7. Summary

Characterisation of equine multipotent mesenchymal stem cells from adipose tissue and investigation of cardiomyogenic differentiation potential

Adult multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) represent an important research focus not only for regenerative medicine, but also for the establishment of *in vitro* models. For this, especially MSCs from adipose tissue (ASCs) are suitable. ASCs have the potential to differentiate *in vitro* into different cell types, including cardiomyocyte-like cells (CLCs), as could be demonstrated in studies for humans, rabbits and rodents.

The study's aims were (1) to obtain MSCs from distinct equine adipose tissue localizations using two isolation procedures and compare their *in vitro* characteristics. In addition, (2) cardiomyogenic differentiation potential of the cells should be investigated, in order to expand the basic knowledge regarding the development of an equine-specific *in vitro* cardiomyocyte model.

The *in vitro* study included $n = 16$ horses. MSCs from abdominal (abd), retrobulbar (rb) and subcutaneous (sc) adipose tissue were isolated by explant technique (ASCs-_{EXP}) and collagenase digestion (ASCs-_{SVF}). The isolation success ($n = 16$), proliferation potential ($n = 3$) and serum supplement most suited for cell growth ($n = 3$) were investigated. Furthermore, cells were examined for MSCs characteristics by investigating the ability to plastic adherence, trilineage differentiation potential for 7, 14 or 21 days ($n = 6$) and specific surface marker profile ($n = 5$). This was followed by the examination of the cardiomyogenic differentiation potential of abd-ASCs-_{SVF} ($n = 5$) by means of the induction factor 5-azacytidine (5-AZA) as well as the factors activin A (Act A), bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) and Dickkopf-1 (DKK-1). Investigation of cell morphologic changes and the expression of cardiac markers, pluripotency-associated markers and one muscle marker using SYBR Green RT-qPCR was carried out on day 0 (timepoint T0) and three weeks after induction (T3).

Plastic adherent, fibroblast-like ASCs-_{EXP} and ASCs-_{SVF} could be harvested from abd, rb and sc adipose tissue. The isolation success of abd- and rb-ASCs was nearly comparable, but significant lower in sc-ASCs. Regarding cell proliferation no significant differences between localizations and isolation techniques were demonstrated. However, a significant effect of the serum supplement was shown. Abd-ASCs-_{EXP} presented the highest adipogenic differentiation potential compared with rb- and sc-ASCs-_{EXP} on day 7 and abd-ASCs-_{SVF} compared with abd-ASCs-_{EXP} on day 14. The osteogenic differentiation potential was nearly comparable on day 14 regarding ASCs of different localizations and isolation procedures. However, on day 21 abd-ASCs-_{EXP} showed a higher osteogenic differentiation potential compared to abd-ASCs-_{SVF}

and rb-ASCs_{-EXP}. The chondrogenic differentiation potential was nearly comparable for all cells, independent of the tissue source and isolation procedure. The examined cells were positive for CD29, CD44, CD90 and negative for CD34 and CD45 and expressed the pluripotency associated markers *OCT4/POUF5*, *MYC* and *DNMT3B*. Cardiomyogenic differentiation could not be proved, neither by using 5-AZA nor different concentrations of Act A, BMP-4 and DKK-1. There were neither changes of cell morphology nor a spontaneous beating activity. An upregulation of the cardiac markers *NKX2-5*, *GATA4*, *TNNI3*, *MYH6* and *MYH7* as well as the muscle marker *MYF6* on time point T3 compared to positive controls could not be demonstrated by means of SYBR Green RT-qPCR.

This study compared MSCs, which were harvested by the two isolation procedures from three adipose tissue localizations, regarding their *in vitro* characteristics, whereby isolation of equine rb-ASCs has not been published before. Although cardiomyogenic differentiation of MSCs has been demonstrated for different mammal species including humans, no studies have been available for equine MSCs until today. This is the first study that investigated the effect of the most frequently used cardiomyogenic induction factor 5-AZA as well as the factors Act A, BMP-4 and DKK-1 participating in embryonic cardiomyogenesis.

It was demonstrated, that equine ASCs_{-EXP} and ASCs_{-SVF} could be harvested from all examined adipose tissue sources and could be clearly identified as MSCs. Moreover, the cells showed a high proliferation and trilineage differentiation potential. However, a cardiomyogenic differentiation of equine abd-ASCs_{-SVF} could not be reached by using the selected induction factors and experimental conditions. The present study contributes to expand the basic knowledge of *in vitro* characteristics of equine ASCs. More comparative studies are needed to further investigate the influence of the isolation technique of equine MSCs harvested by different sources. With regard to the cardiomyogenic induction experiments, the use of pluripotent stem cells instead of multipotent MSCs should be considered, because pluripotent stem cells have a higher differentiation potential.

8. Literaturverzeichnis

Abu-Issa, R. and M. L. Kirby (2007):
Heart field: from mesoderm to heart tube.
Annu Rev Cell Dev Biol 23: 45-68.

Afflerbach, A.-K., M. D. Kiri, T. Detinis and B. M. Maoz (2020):
Mesenchymal stem cells as a promising cell source for integration in novel in vitro models.
Biomolecules 10: 1306.

Aherne, W. and D. Hull (1966):
Brown adipose tissue and heat production in the newborn infant.
J Pathol Bacteriol 91: 223-234.

Ai, D., X. Fu, J. Wang, M. F. Lu, L. Chen, A. Baldini, W. H. Klein and J. F. Martin (2007):
Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth.
Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9319-9324. DOI: 10.1073/pnas.0701212104.

Ai, Z., A. Fischer, D. C. Spray, A. M. Brown and G. I. Fishman (2000):
Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes.
J Clin Invest 105: 161-171.

Alipour, F., A. Parham, H. K. Mehrjerdi and H. Dehghani (2015):
Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics,
gene expression profile and differentiation potentials.
Cell J 16: 456-465. DOI: 10.22074/cellj.2015.491.

Altinova, A. E. (2022):
Beige Adipocyte as the Flame of White Adipose Tissue: Regulation of Browning and Impact
of Obesity.
J Clin Endocrinol Metab 107: e1778-e1788. DOI: 10.1210/clinem/dgab921.

Antonitsis, P., E. Ioannidou-Papagiannaki, A. Kaidoglou and C. Papakonstantinou (2007):
In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells.
The role of 5-azacytidine.
Interact Cardiovasc Thorac Surg 6: 593-597. DOI: 10.1510/icvts.2007.157875.

Arévalo-Turrubiarte, M., C. Olmeo, P. Accornero, M. Baratta and E. Martignani (2019):
Analysis of mesenchymal cells (MSCs) from bone marrow, synovial fluid and mesenteric,
neck and tail adipose tissue sources from equines.
Stem Cell Res 37: 101442. DOI: 10.1016/j.scr.2019.101442.

Armiñán, A., C. Gandía, M. Bartual, J. M. García-Verdugo, E. Lledó, V. Mirabet, M. Llop, J.
Barea, J. A. Montero and P. Sepúlveda (2009):
Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-
specific mesenchymal stem cells.
Stem Cells Dev 18: 907-918.

Arnhold, S., M. I. Elashry, M. C. Klymiuk and F. Geburek (2019):
Investigation of stemness and multipotency of equine adipose-derived mesenchymal stem
cells (ASCs) from different fat sources in comparison with lipoma.
Stem Cell Res Ther 10: 309. DOI: 10.1186/s13287-019-1429-0.

Assmus, B., V. Schächinger, C. Teupe, M. Britten, R. Lehmann, N. Döbert, F. Grünwald, A. Aicher, C. Urbich, H. Martin, D. Hoelzer, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2002):
Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI).

Circulation 106: 3009-3017. DOI: 10.1161/01.cir.0000043246.74879.cd.

Avior, Y., I. Sagi and N. Benvenisty (2016):

Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery.

Nat Rev Mol Cell Biol 17: 170-182. DOI: 10.1038/nrm.2015.27.

Badura-Lotter, G. (2005):

Forschung an embryonalen Stammzellen: Zwischen biomedizinischer Ambition und ethischer Reflexion.

Frankfurt / New York, Campus Verlag, ISBN: 3593376989.

Baglioni, S., G. Cantini, G. Poli, M. Francalanci, R. Squecco, A. Di Franco, E. Borgogni, S. Frontera, G. Nesi and F. Liotta (2012):

Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell.

PLoS One 7: e36569. DOI: 10.1371/journal.pone.0036569.

Bahamondes, F., E. Flores, G. Cattaneo, F. Bruna and P. Conget (2017):

Omental adipose tissue is a more suitable source of canine Mesenchymal stem cells.

BMC Vet Res 13: 166. DOI: 10.1186/s12917-017-1053-0.

Bahmad, H. F., R. Daouk, J. Azar, J. Sapudom, J. C. Teo, W. Abou-Kheir and M. Al-Sayegh (2020):

Modeling adipogenesis: current and future perspective.

Cells 9: 2326.

Baksh, D., L. Song and R. S. Tuan (2004):

Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy.

J Cell Mol Med 8: 301-316. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x.

Balana, B., C. Nicoletti, I. Zahanich, E. M. Graf, T. Christ, S. Boxberger and U. Ravens (2006):

5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells.

Cell Res 16: 949-960.

Balza, R. O. and R. P. Misra (2006):

Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes.

J Biol Chem 281: 6498-6510. DOI: 10.1074/jbc.M509487200.

Baptista, L. S., R. J. C. do Amaral, R. B. Carias, M. Aniceto, C. Claudio-da-Silva and R. Borojevic (2009):

An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples.

Cytotherapy 11: 706-715. DOI: 10.3109/14653240902981144.

- Barberini, D. J., N. P. Freitas, M. S. Magnoni, L. Maia, A. J. Listoni, M. C. Heckler, M. J. Sudano, M. A. Golim, F. da Cruz Landim-Alvarenga and R. M. Amorim (2014):
Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential.
Stem Cell Res Ther 5: 25. DOI: 10.1186/s12914-014-0114-4.
- Barrow, J. R., W. D. Howell, M. Rule, S. Hayashi, K. R. Thomas, M. R. Capecchi and A. P. McMahon (2007):
Wnt3 signaling in the epiblast is required for proper orientation of the anteroposterior axis.
Dev Biol 312: 312-320. DOI: 10.1016/j.ydbio.2007.09.030.
- Becker, S. K., G. Sponder, M. A. Sandhu, S. Trappe, M. Kolisek and J. R. Aschenbach (2021):
The combined influence of magnesium and insulin on central metabolic functions and expression of genes involved in magnesium homeostasis of cultured bovine adipocytes.
Int J Mol Sci 22: 5897.
- Beliën, H., L. Evens, M. Hendriks, V. Bito and A. Bronckaers (2022):
Combining stem cells in myocardial infarction: The road to superior repair?
Med Res Rev 42: 343-373. DOI: 10.1002/med.21839.
- Ben-Haim, N., C. Lu, M. Guzman-Ayala, L. Pescatore, D. Mesnard, M. Bischofberger, F. Naef, E. J. Robertson and D. B. Constam (2006):
The nodal precursor acting via activin receptors induces mesoderm by maintaining a source of its convertases and BMP4.
Dev Cell 11: 313-323. DOI: 10.1016/j.devcel.2006.07.005.
- Bender, R., S. Lange and A. Ziegler (2007):
Multiples testen.
Dtsch Med Wochenschr 132: e26-e29. DOI: 10.1055/s-2007-959035.
- Bennett, C. N., S. E. Ross, K. A. Longo, L. Bajnok, N. Hemati, K. W. Johnson, S. D. Harrison and O. A. MacDougald (2002):
Regulation of Wnt signaling during adipogenesis.
J Biol Chem 277: 30998-31004. DOI: 10.1074/jbc.M204527200.
- Bentzinger, C. F., Y. X. Wang and M. A. Rudnicki (2012):
Building muscle: molecular regulation of myogenesis.
Cold Spring Harb Perspect Biol 4: a008342. DOI: 10.1101/cshperspect.a008342.
- Berg, L. C., T. G. Koch, T. Heerkens, K. Besonov, P. D. Thomsen and D. Betts (2009):
Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood.
Vet Comp Orthop Traumatol 22: 363-370. DOI: 10.3415/VCOT-08-10-0107.
- Bernardo, M. E., N. Zaffaroni, F. Novara, A. M. Cometa, M. A. Avanzini, A. Moretta, D. Montagna, R. Maccario, R. Villa, M. G. Daidone, O. Zuffardi and F. Locatelli (2007):
Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms.
Cancer Res 67: 9142-9149. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4690.
- Bettger, W. J. and W. L. McKeehan (1986):
Mechanisms of Cellular Nutrition.
Physiol Rev 66: 1-35.

- Bhavsar, P. K., N. J. Brand, M. H. Yacoub and P. J. Barton (1996):
Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3).
Genomics 35: 11-23.
- Bobis, S., D. Jarocha and M. Majka (2006):
Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications.
Folia Histochem Cytobiol 44: 215-230.
- Bonab, M. M., K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh and B. Nikbin (2006):
Aging of mesenchymal stem cell in vitro.
BMC Cell Biol 7: 14. DOI: 10.1186/1471-2121-7-14.
- Bork, S., S. Pfister, H. Witt, P. Horn, B. Korn, A. D. Ho and W. Wagner (2010):
DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells.
Aging Cell 9: 54-63. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2009.00535.x.
- Bourin, P., B. A. Bunnell, L. Casteilla, M. Dominici, A. J. Katz, K. L. March, H. Redl, J. P. Rubin, K. Yoshimura and J. M. Gimble (2013):
Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT).
Cytotherapy 15: 641-648. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
- Böyük, G. and A. A. Yiğit (2022):
Effects of medium supplements on viability and functionality in long-term cultured islet cells.
J Appl Biol Sci 16: 353-365. DOI: 10.5281/zenodo.6590591.
- Braun, J., A. Hack, M. Weis-Klemm, S. Conrad, S. Treml, K. Kohler, U. Walliser, T. Skutella and W. K. Aicher (2010):
Evaluation of the osteogenic and chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.
Am J Vet Res 71: 1228-1236. DOI: 10.2460/ajvr.71.10.1228.
- Braun, T., E. Bober, B. Winter, N. Rosenthal and H. Arnold (1990):
Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12.
EMBO J 9: 821-831.
- Braun, T., G. Buschhausen-Denker, E. Bober, E. Tannich and H. Arnold (1989):
A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts.
EMBO J 8: 701-709.
- Bravo, M., J. Moraes, C. Dummont, R. Filgueiras, H. Hashimoto and R. GODOY (2012):
Isolation, expansion and characterization of equine adipose tissue derived stem cells/Isolamento, expansão e caracterização de células-tronco do tecido adiposo de equinos.
Ars Vet 28: 066-074.
- entnommen aus Alipour et al. (2015)

- Bressan, F. F., V. Bassanezze, L. V. de Figueiredo Pessôa, C. B. Sacramento, T. M. Malta, S. Kashima, P. Fantinato Neto, R. D. F. Strefezzi, N. C. G. Pieri and J. E. Krieger (2020): Generation of induced pluripotent stem cells from large domestic animals. *Stem Cell Res Ther* 11: 247. DOI: 10.1186/s13287-020-01716-5.
- Breton, A., R. Sharma, A. C. Diaz, A. G. Parham, A. Graham, C. Neil, C. B. Whitelaw, E. Milne and F. X. Donadeu (2013): Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. *Stem Cells Dev* 22: 611-621. DOI: 10.1089/scd.2012.0052.
- Broeckx, S., A. Martens, A. Bertone, L. Van Brantegem, L. Duchateau, L. Van Hecke, M. Dumoulin, M. Oosterlinck, K. Chiers and H. Hussein (2019): The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study. *Equine Vet J* 51: 787-794. DOI: 10.1111/evj.13089.
- Buckingham, M., S. Meilhac and S. Zaffran (2005): Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6: 826-835.
- Bukowska, J., A. Z. Szóstek-Mioduchowska, M. Kopcewicz, K. Walendzik, S. Machcińska and B. Gawrońska-Kozak (2021): Adipose-derived stromal/stem cells from large animal models: from basic to applied science. *Stem Cell Rev Rep* 17: 719-738. DOI: 10.1007/s12015-020-10049-y.
- Burk, J., I. Ribitsch, C. Gittel, H. Juelke, C. Kasper, C. Staszyc and W. Brehm (2013): Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J* 195: 98-106. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.004.
- Bustin, S. A., V. Benes, J. A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl and G. L. Shipley (2009): The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55: 611 - 622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Butler, M. and H. Jenkins (1989): Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *J Biotechnol* 12: 97-110.
- Caetano-Lopes, J., H. Canhao and J. E. Fonseca (2007): Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 32: 103-110.
- Callis, T. E., D. Cao and D.-Z. Wang (2005): Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardin transactivation of cardiac genes. *Circ Res* 97: 992-1000. DOI: 10.1161/01.RES.0000190670.92879.7d.
- Calloe, K., S. Rognant, S. Friis, C. Shaughnessy, D. A. Klaerke and D. S. Trachsel (2019): Compounds commonly used in equine medicine inhibits the voltage-gated potassium channel Kv11.1. *Res Vet Sci* 123: 239-246. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.01.009.

- Calloni, R., E. A. A. Cordero, J. A. P. Henriques and D. Bonatto (2013):
Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells.
Stem Cells Dev 22: 1455-1476. DOI: 10.1089/scd.2012.0637.
- Câmara, D. A. D., J. A. Shibli, E. A. Müller, P. L. De-Sá-Junior, A. S. Porcacchia, A. Blay and N. F. Lizier (2020):
Adipose tissue-derived stem cells: the biologic basis and future directions for tissue engineering.
Materials 13: 3210. DOI: 10.3390/ma13143210.
- Cao, C., L. Li, H. Li, X. He, G. Wu and X. Yu (2018):
Cyclic biaxial tensile strain promotes bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells by miRNA-27a.
Int J Biochem Cell Biol 99: 125-132. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.04.004.
entnommen aus Gupta et al. (2021)
- Caplan, A. (2009):
Why are MSCs therapeutic? New data: new insight.
J Pathol 217: 318-324.
- Caplan, A. I. (1991):
Mesenchymal stem cells.
J Orthop Res 9: 641-650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
- Carslake, H. B., G. L. Pinchbeck and C. M. McGowan (2021):
Equine metabolic syndrome in UK native ponies and cobs is highly prevalent with modifiable risk factors.
Equine Vet J 53: 923-934. DOI: 10.1111/evj.13378.
- Carvalho, P. H., A. P. F. Daibert, B. S. Monteiro, B. S. Okano, J. L. Carvalho, D. N. Q. d. Cunha, L. S. C. Favarato, V. G. Pereira, L. E. F. Augusto and R. J. D. Carlo (2013):
Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes.
Arq Bras Cardiol 100: 82-89. DOI: 10.1590/s0066-782x2012005000114.
- Cassano, J. M., L. V. Schnabel, M. B. Goodale and L. A. Fortier (2018):
Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment.
Stem Cell Res Ther 9: 82.
- Cavatorta, D. J., H. N. Erb and M. J. Felipe (2012):
Activation-induced FoxP3 expression regulates cytokine production in conventional T cells stimulated with autologous dendritic cells.
Clin Vaccine Immunol 19: 1583-1592. DOI: 10.1128/CVI.00308-12.
- Cequier, A., C. Sanz, C. Rodellar and L. Barrachina (2021):
The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horses.
Animals 11: 931.
- Chaudhary, D., R. N. Trivedi, A. Kathuria, T. K. Goswami, R. Khandia and A. Munjal (2018):
In vitro and in vivo immunomodulating properties of mesenchymal stem cells.
Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov 12: 59-68.

Chen, C., Q. Yan, Y. Yan, M. Ma, Y. He, X. Shui, Z. Yang, X. Lan, Y. Tang and W. Lei (2018):

MicroRNA-1 Regulates the Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells into Cardiomyocyte-Like Cells.

Stem Cells Int 2018: 7494530. DOI: 10.1155/2018/7494530.

Chen, S., Z. Liu, N. Tian, J. Zhang, F. Yei, B. Duan, Z. Zhu, S. Lin and T. W. Kwan (2006): Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. J Invasive Cardiol 18: 552-556.

Chien, K. R., J. Frisén, R. Fritsche-Danielson, D. A. Melton, C. E. Murry and I. L. Weissman (2019):

Regenerating the field of cardiovascular cell therapy.

Nat Biotechnol 37: 232-237. DOI: 10.1038/s41587-019-0042-1.

Chimal-Monroy, J. and L. D. De Leon (1997):

Differential effects of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 and beta 5 on chondrogenesis in mouse limb bud mesenchymal cells.

Int J Dev Biol 41: 91-102.

Chiou, M., Y. Xu and M. T. Longaker (2006):

Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells.

Biochem Biophys Res Commun 343: 644-652. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.02.171.

Cho, J., P. Rameshwar and J. Sadoshima (2009):

Distinct roles of glycogen synthase kinase (GSK)-3 α and GSK-3 β in mediating cardiomyocyte differentiation in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells.

J Biol Chem 284: 36647-36658. DOI: 10.1074/jbc.M109.019109.

Choi, Y. S., G. J. Disting, S. Stubbs, S. Arunothayaraj, X. L. Han, P. Collas, W. A. Morrison and R. J. Dilley (2010):

Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes.

J Cell Mol Med 14: 878-889. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01009.x.

Choudhery, M. S., M. Badowski, A. Muise, J. Pierce and D. T. Harris (2014):

Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation.

J Transl Med 12: 8. DOI: 10.1186/1479-5876-12-8.

Choudhery, M. S., R. Mahmood, D. T. Harris and F. J. Ahmad (2022):

Minimum criteria for defining induced mesenchymal stem cells.

Cell Biol Int 46: 986-989. DOI: 10.1002/cbin.11790.

Coelho, M., T. Oliveira and R. Fernandes (2013):

Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ.

Arch Med Sci 9: 191-200. DOI: 10.5114/aoms.2013.33181.

Cohen, E. D., Z. Wang, J. J. Lepore, M. M. Lu, M. M. Taketo, D. J. Epstein and E. E. Morrisey (2007):

Wnt/ β -catenin signaling promotes expansion of Isl-1-positive cardiac progenitor cells through regulation of FGF signaling.

The Journal of Clinical Investigation 117: 1794-1804.

Colleoni, S., E. Bottani, I. Tessaro, G. Mari, B. Merlo, N. Romagnoli, A. Spadari, C. Galli and G. Lazzari (2009):

Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor.

Vet Res Commun 33: 811-821.

Cornell, R. A., T. J. Musci and D. Kimelman (1995):

FGF is a prospective competence factor for early activin-type signals in *Xenopus* mesoderm induction.

Development 121: 2429-2437. DOI: 10.1242/dev.121.8.2429.

Courouce, A., O. Geffroy, E. Barrey, B. Auvinet and R. J. Rose (1999):

Comparison of exercise tests in French trotters under training track, racetrack and treadmill conditions.

Equine Vet J Suppl. 30: 528-532.

Cousin, B., S. Cinti, M. Morroni, S. Raimbault, D. Ricquier, L. Penicaud and L. Castella (1992):

Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization.

J Cell Sci 103: 931-942.

Crowder, S. W., Y. Liang, R. Rath, A. M. Park, S. Maltais, P. N. Pintauro, W. Hofmeister, C. C. Lim, X. Wang and H. J. Sung (2013):

Poly(ϵ -caprolactone)-carbon nanotube composite scaffolds for enhanced cardiac differentiation of human mesenchymal stem cells.

Nanomedicine (Lond) 8: 1763-1776. DOI: 10.2217/nnm.12.204.

Czapla, J., S. Matuszczak, K. Kulik, E. Wiśniewska, E. Pilny, M. Jarosz-Biej, R. Smolarczyk, T. Sirek, M. O. Zembala and M. Zembala (2019):

The effect of culture media on large-scale expansion and characteristic of adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells.

Stem Cell Res Ther 10: 253. DOI: 10.1186/s13287-019-1331-9.

de Bakker, E., B. Van Ryssen, C. De Schauwer and E. Meyer (2013):

Canine mesenchymal stem cells: state of the art, perspectives as therapy for dogs and as a model for man.

Vet Q 33: 225-233. DOI: 10.1080/01652176.2013.873963.

de Mattos Carvalho, A., A. L. G. Alves, M. A. Golim, A. Moroz, C. A. Hussni, P. G. G. de Oliveira and E. Deffune (2009):

Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue.

Vet Immunol Immunopathol 132: 303-306. DOI: 10.1016/j.vetimm.2009.06.014.

De Schauwer, C., K. Goossens, S. Piepers, M. K. Hoogewijs, J. L. J. Govaere, K. Smits, E. Meyer, A. Van Soom and G. R. Van de Walle (2014):

Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources.

Stem Cell Res Ther 5: 6.

- De Schauwer, C., E. Meyer, P. Cornillie, S. De Vlieghe, G. R. van de Walle, M. Hoogewijs, H. Declercq, J. Govaere, K. Demeyere and M. Cornelissen (2011a):
Optimization of the isolation, culture, and characterization of equine umbilical cord blood mesenchymal stromal cells.
Tissue Eng Part C Methods 17: 1061-1070. DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0052.
- De Schauwer, C., E. Meyer, G. R. Van de Walle and A. Van Soom (2011b):
Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity.
Theriogenology 75: 1431-1443. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.008.
- De Ugarte, D. A., Z. Alfonso, P. A. Zuk, A. Elbarbary, M. Zhu, P. Ashjian, P. Benhaim, M. H. Hedrick and J. K. Fraser (2003):
Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow.
Immunol Lett 89: 267-270. DOI: 10.1016/s0165-2478(03)00108-1.
entnommen aus Ranera et al. (2011)
- Del Bue, M., S. Riccò, R. Ramoni, V. Conti, G. Gnudi and S. Grolli (2008):
Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo.
Vet Res Commun 32 Suppl 1: S51-55. DOI: 10.1007/s11259-008-9093-3.
- Denning, C., V. Borgdorff, J. Crutchley, K. S. A. Firth, V. George, S. Kalra, A. Kondrashov, M. D. Hoang, D. Mosqueira and A. Patel (2016):
Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: from laboratory curiosity to industrial biomedical platform.
Biochim Biophys Acta Mol Cell Res 1863: 1728-1748. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.10.014.
- Depoil, D., S. Fleire, B. L. Treanor, M. Weber, N. E. Harwood, K. L. Marchbank, V. L. Tybulewicz and F. D. Batista (2008):
CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor–antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand.
Nat Immunol 9: 63-72. DOI: 10.1038/ni1547.
- Dhar, M., N. Neilsen, K. Beatty, S. Eaker, H. Adair and D. Geiser (2012):
Equine peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: isolation, identification, trilineage differentiation and effect of hyperbaric oxygen treatment.
Equine Vet J 44: 600-605. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00536.x.
- Dickhut, A., E. Gottwald, E. Steck, C. Heisel and W. Richter (2008):
Chondrogenesis of mesenchymal stem cells in gel-like biomaterials in vitro and in vivo.
Front Biosci 13: 4517-4528.
- Ding, S. and P. G. Schultz (2004):
A role for chemistry in stem cell biology.
Nat Biotechnol 22: 833-840.
- Ditschkowski, M., E. Kreuzfelder, V. Rebmann, S. Ferencik, M. Majetschak, E. N. Schmid, U. Obertacke, H. Hirche, U. F. Schade and H. Grosse-Wilde (1999):
HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma.
Ann Surg 229: 246-254.

Dominici, M. L. B. K., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop and E. M. Horwitz (2006):
Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.
Cytotherapy 8: 315-317.

Donadeu, F. X. (2014):
Equine induced pluripotent stem cells or how to turn skin cells into neurons: Horse tissues a la carte?
Equine Vet J 46: 534-537. DOI: 10.1111/evj.12300.

Durham, A. E., N. Frank, C. M. McGowan, N. J. Menzies-Gow, E. Roelfsema, I. Vervuert, K. Feige and K. Fey (2019):
ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome.
J Vet Intern Med 33: 335-349. DOI: 10.1111/jvim.15423.

Emmerich, I. U. (2020):
Neue Arzneimittel für Pferde und landwirtschaftliche Nutztiere 2019.
Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 48: 118-123. DOI: 10.1055/a-1122-7849.

Endo, K., N. Fujita, T. Nakagawa and R. Nishimura (2019):
Comparison of the effect of growth factors on chondrogenesis of canine mesenchymal stem cells.
J Vet Med Sci 81: 1211-1218. DOI: 10.1292/jvms.18-0551.

Engin, F., Z. Yao, T. Yang, G. Zhou, T. Bertin, M. M. Jiang, Y. Chen, L. Wang, H. Zheng and R. E. Sutton (2008):
Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis.
Nat Med 14: 299-305. DOI: 10.1038/nm1712.

England, J. and S. Loughna (2013):
Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart.
Cell Mol Life Sci 70: 1221-1239. DOI: 10.1007/s00018-012-1131-1.

Engle, S. J. and D. Puppala (2013):
Integrating human pluripotent stem cells into drug development.
Cell Stem Cell 12: 669-677.

English, K., B. P Mahon and K. J Wood (2014):
Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation.
Curr Drug Deliv 11: 561-571.

Epstein, J. A. (2019):
A Time to Press Reset and Regenerate Cardiac Stem Cell Biology.
JAMA Cardiol 4: 95-96. DOI: 10.1001/jamacardio.2018.4435.

Esteves, C. L., R. Sharma, L. Dawson, S. E. Taylor, G. Pearson, J. A. Keen, K. McDonald, C. Aurich and F. X. Donadeu (2014):
Expression of putative markers of pluripotency in equine embryonic and adult tissues.
Vet J 202: 533-535. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.08.026.

Evans, S. M., D. Yelon, F. L. Conlon and M. L. Kirby (2010):
Myocardial lineage development.
Circ Res 107: 1428-1444.

- Farzaneh, M. (2021):
Concise Review; Effects of Antibiotics and Antimycotics on the Biological Properties of Human Pluripotent and Multipotent Stem Cells.
Curr Stem Cell Res Ther 16: 400-405. DOI: 10.2174/1574888x16999201203214425.
- Fathy, W. M., I. A. Ahmedy, S. M. Motawe and R. A. El Morsy (2019):
Use of azacytidine in differentiation of mesenchymal stem cells.
Menoufia Med J 32: 978-982. DOI: 10.4103/mmj.mmj_893_17.
- Fekete, N., M. T. Rojewski, R. Lotfi and H. Schrezenmeier (2014):
Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells.
Tissue Eng Part C Methods 20: 129-139. DOI: 10.1089/ten.TEC.2013.0061.
- Finley, M. R., J. D. Lillich, R. F. J. Gilmour and L. C. Freeman (2003):
Structural and functional basis for the long QT syndrome: relevance to veterinary patients.
J Vet Intern Med 17: 473-488.
- Foley, A. C. and M. Mercola (2005):
Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex.
Genes & Development 19: 387-396.
- Fozzard, H. A. and G. W. Beeler Jr (1975):
The voltage clamp and cardiac electrophysiology.
Circ Res 37: 403-413.
- Franz, M. R., C. D. Swerdlow, L. B. Liem and J. Schaefer (1988):
Cycle length dependence of human action potential duration in vivo. Effects of single extrastimuli, sudden sustained rate acceleration and deceleration, and different steady-state frequencies.
J Clin Invest 82: 972-979.
- Freshney, R. (1994):
Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.
3. Aufl., Inc. New York: Wiley-Liss.
entnommen aus Gstraunthaler, Gerhard (2003)
- Freshney, R. I. (2010):
Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.
6. Aufl., Inc. Hoboken, New Jersey / Canada, John Wiley & Sons, ISBN: 978-0-470-52812-9.
- Friedenstein, A., R. Chailakhjan and K. Lalykina (1970):
The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.
Cell Prolif 3: 393-403.
- Friedenstein, A. J., K. V. Petrakova, A. I. Kurolesova and G. P. Frolova (1968):
Heterotopic transplants of bone marrow.
Transplantation 6: 230-247.
- Friedman, M. S., M. W. Long and K. D. Hankenson (2006):
Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6.
J Cell Biochem 98: 538-554. DOI: 10.1002/jcb.20719.

- Fuchs, E., T. Tumber and G. Guasch (2004):
Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.
Cell 116: 769-778.
- Gale, A. L., R. L. Linardi, G. McClung, R. M. Mammone and K. F. Orved (2019):
Comparison of the chondrogenic differentiation potential of equine synovial membrane-derived and bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Front Vet Sci 6: 178.
- Galipeau, J., M. Krampera, J. Barrett, F. Dazzi, R. J. Deans, J. DeBruijn, M. Dominici, W. E. Fibbe, A. P. Gee and J. M. Gimble (2016):
International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials.
Cytotherapy 18: 151-159. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.11.008.
- Galli, D., J. N. Domínguez, S. Zaffran, A. Munk, N. A. Brown and M. E. Buckingham (2008):
Atrial myocardium derives from the posterior region of the second heart field, which acquires left-right identity as Pitx2c is expressed.
Development 135: 1157-1167. DOI: 10.1242/dev.014563.
- Gang, E. J., D. Bosnakovski, C. A. Figueiredo, J. W. Visser and R. C. Perlingeiro (2007):
SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow.
Blood 109: 1743-1751. DOI: 10.1182/blood-2005-11-010504.
- Gang, E. J., J. A. Jeong, S. H. Hong, S. H. Hwang, S. W. Kim, I. H. Yang, C. Ahn, H. Han and H. Kim (2004):
Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood.
Stem Cells 22: 617-624.
- Geburek, F. and P. Stadler (2011):
Regenerative Therapie von Sehnen-und Bänderkrankungen bei Pferden.
Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 39: 373-383.
- Geens, M., I. Mateizel, K. Sermon, M. De Rycke, C. Spits, G. Cauffman, P. Devroey, H. Tournaye, I. Liebaers and H. Van de Velde (2009):
Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos.
Hum Reprod 24: 2709-2717. DOI: 10.1093/humrep/dep262.
- Gimble, J. M. and F. Guilak (2003):
Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential.
Cytotherapy 5: 362-369.
- Giovannini, S., W. Brehm, P. Mainil-Varlet and D. Nasic (2008):
Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells.
Differentiation 76: 118-129. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2007.00207.x.
- Gittel, C., W. Brehm, J. Burk, H. Juelke, C. Staszky and I. Ribitsch (2013):
Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties.
BMC Vet Res 9: 221.

- Gorza, L., S. Schiaffino and M. Vitadello (1988):
Heart conduction system: a neural crest derivative?
Brain Res 457: 360-366. DOI: 10.1016/0006-8993(88)90707-x.
- Goyert, S. M., E. Ferrero, W. J. Rettig, A. K. Yenamandra, F. Obata and M. M. Le Beau (1988):
The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors.
Science 239: 497-500. DOI: 10.1126/science.2448876.
- Grajales, L., J. García and D. L. Geenen (2012):
Induction of cardiac myogenic lineage development differs between mesenchymal and satellite cells and is accelerated by bone morphogenetic protein-4.
J Mol Cell Cardiol 53: 382-391. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.06.003.
- Greenspan, P. and S. D. Fowler (1985):
Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red.
J Lipid Res 26: 781-789.
- Grogan, S. P., A. Barbero, V. Winkelmann, F. Rieser, J. S. Fitzsimmons, S. O’driscoll, I. Martin and P. Mainil-Varlet (2006):
Visual histological grading system for the evaluation of in vitro-generated neocartilage.
Tissue Eng 12: 2141-2149.
- Gstraunthaler, G. (2003):
Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture.
ALTEX 20: 275-281.
- Guercio, A., S. Di Bella, S. Casella, P. Di Marco, C. Russo and G. Piccione (2013):
Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site.
Cell Biol Int 37: 789-798. DOI: 10.1002/cbin.10090.
- Guo, D., J. Zhou, X. Zhao, P. Gupta, P. R. Kowey, J. Martin, Y. Wu, T. Liu and G.-X. Yan (2008):
L-type calcium current recovery versus ventricular repolarization: preserved membrane-stabilizing mechanism for different QT intervals across species.
Heart Rhythm 5: 271-279. DOI: 10.1016/j.hrthm.2007.09.025.
- Gupta, S., A. Sharma and R. S. Verma (2021):
Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regeneration: From Differentiation to Cell Delivery.
Stem Cell Rev Rep 17: 1666-1694. DOI: 10.1007/s12015-021-10168-0.
- Hackett, C. H., L. Greve, K. D. Novakofski and L. A. Fortier (2012):
Comparison of gene-specific DNA methylation patterns in equine induced pluripotent stem cell lines with cells derived from equine adult and fetal tissues.
Stem Cells Dev 21: 1803-1811. DOI: 10.1089/scd.2011.0055.
- Hagen, A., H. Holland, V.-P. Brandt, C. U. Doll, T. C. Häußler, M. Melzer, J. Moellerberndt, H. Lehmann and J. Burk (2022):
Platelet lysate for mesenchymal stromal cell culture in the canine and equine species: analogous but not the same.
Animals 12: 189.

Hagen, A., H. Lehmann, S. Aurich, N. Bauer, M. Melzer, J. Moellerberndt, V. Patané, C. Schnabel and J. Burk (2021):

Scalable production of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture.

Front Bioeng Biotechnol 8: 613621. DOI: 10.3389/fbioe.2020.613621.

Hamlin, R. L. (2010):

QRS in pigs versus in dogs.

J Pharmacol Toxicol Methods 62: 4-5. DOI: 10.1016/j.vascn.2010.04.009.

Han, Y., X. Li, Y. Zhang, Y. Han, F. Chang and J. Ding (2019):

Mesenchymal stem cells for regenerative medicine.

Cells 8: 886. DOI: 10.3390/cells8080886.

Han, Y., J. Yang, J. Fang, Y. Zhou, E. Candi, J. Wang, D. Hua, C. Shao and Y. Shi (2022):

The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases.

Signal Transduct Target Ther 7: 92. DOI: 10.1038/s41392-022-00932-0.

Hanson, J. and H. E. Huxley (1953):

Structural basis of the cross-striations in muscle.

Nature 172: 530-532.

Hansson, E. M., M. E. Lindsay and K. R. Chien (2009):

Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics.

Cell Stem Cell 5: 364-377.

Hasani, S., A. Javeri, A. Asadi and M. F. Taha (2020):

Cardiac Differentiation of Adipose Tissue-Derived Stem Cells Is Driven by BMP4 and bFGF but Counteracted by 5-Azacytidine and Valproic Acid.

Cell J 22: 273-282. DOI: 10.22074/cellj.2020.6582.

Hashimoto, J., Y. Kariya and K. Miyazaki (2006):

Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332).

Stem Cells 24: 2346-2354.

Hatami, L., M. R. Valojerdi and S. J. Mowla (2007):

Effects of oxytocin on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cells.

Int J Cardiol 117: 80-89. DOI: 10.1016/j.ijcard.2006.04.054.

Hatch, A. C., T. Ray, K. Lintecum and C. Youngbull (2014):

Continuous flow real-time PCR device using multi-channel fluorescence excitation and detection.

Lab Chip 14: 562-568. DOI: 10.1039/c3lc51236c.

Haynesworth, S. (1994):

Diminution of the number of mesenchymal stem cells as a cause for skeletal aging.

In: Musculoskeletal Soft-tissue Aging: Impact on Mobility, section 1, Buckwalter JA, Goldberg VM, Y Woo SL-Y (eds). American Academy of Orthopaedic Surgeons: Rosemont, IL, USA, 1994: 79-87.

entnommen aus Caplan, A. I. (2009)

- He, X., L. Li, M. Tang, Y. Zeng, H. Li and X. Yu (2019):
Biomimetic electrical stimulation induces rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyocyte-like cells via TGF-beta 1 in vitro.
Prog Biophys Mol Biol 148: 47-53. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.09.023.
- HE, Z., C. Fang and J. MA (1983):
Rat mesenchymal stem cells differentiate into hepatocyte-like cells induced hepatocyte growth factor plus epidermal growth factor in vitro.
Med J Chin People's Lib Army (12) 1983.
- Hellemans, J., G. Mortier, A. De Paepe, F. Speleman and J. Vandesompele (2007):
qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data.
Genome Biol 8: R19. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Hemeda, H., B. Giebel and W. Wagner (2014):
Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells.
Cytotherapy 16: 170-180. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.004.
- Heo, J. S., S. M. Choi, H. O. Kim, E. H. Kim, J. You, T. Park, E. Kim and H. S. Kim (2013):
Neural transdifferentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on hydrophobic polymer-modified surface and therapeutic effects in an animal model of ischemic stroke.
Neuroscience 238: 305-318. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2013.02.011.
- Hildreth, V., S. Webb, L. Bradshaw, N. A. Brown, R. H. Anderson and D. J. Henderson (2008):
Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart.
J Anat 212: 1-11. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2007.00833.x.
- Hillmann, A., A. B. Ahrberg, W. Brehm, S. Heller, C. Josten, F. Paebst and J. Burk (2016):
Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model.
Cell Transplant 25: 109-124. DOI: 10.3727/096368915X687822.
- Himms-Hagen, J., A. Melnyk, M. C. Zingaretti, E. Ceresi, G. Barbatelli and S. Cinti (2000):
Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes.
Am J Physiol Cell Physiol 279: C670-681. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C670.
- Holzapfel, B. and L. Wickert (2007):
Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete.
Biol. Unserer Zeit 37: 120-126.
- Hua, J., J. Gong, H. Meng, B. Xu, L. Yao, M. Qian, Z. He, S. Zou, B. Zhou and Z. Song (2013):
Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix: proliferation and multilineage differentiation as compared to mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and bone marrow.
Cell Biol Int 38: 198-210. DOI: 10.1002/cbin.10188.
- Huang, X., L. Zhong, J. Hendriks, J. N. Post and M. Karperien (2018):
The Effects of the WNT-Signaling Modulators BIO and PKF118-310 on the Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells.
Int J Mol Sci 19: 561. DOI: 10.3390/ijms19020561.

- Hughes, C. S., L. M. Postovit and G. A. Lajoie (2010):
Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture.
Proteomics 10: 1886-1890.
- Huntriss, J., M. Hinkins, B. Oliver, S. E. Harris, J. C. Beazley, A. J. Rutherford, R. G. Gosden, S. E. Lanzendorf and H. M. Picton (2004):
Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells.
Mol Reprod Dev 67: 323-336. DOI: 10.1002/mrd.20030.
- Huxley, H. E. (1965):
The mechanism of muscular contraction.
Sci Am 213: 18-27.
- Hyslop, L., M. Stojkovic, L. Armstrong, T. Walter, P. Stojkovic, S. Przyborski, M. Herbert, A. Murdoch, T. Strachan and M. Lako (2005):
Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages.
Stem Cells 23: 1035-1043. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0080.
- Iacono, E., L. Pascucci, B. Rossi, C. Bazzucchi, A. Lanci, M. Ceccoli and B. Merlo (2017):
Ultrastructural characteristics and immune profile of equine MSCs from fetal adnexa.
Reproduction 154: 509-519. DOI: 10.1530/REP-17-0032.
- Ibarra-Ibarra, B. R., M. Franco, A. Paez, E. V. López and F. Massó (2019):
Improved efficiency of cardiomyocyte-like cell differentiation from rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with a directed differentiation protocol.
Stem Cells Int 2019: 8940365. DOI: 10.1155/2019/8940365.
- Ibrahim, M. M. (2010):
Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.
Obes Rev 11: 11-18. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.
- Ibrahim, S., K. Saunders, J. H. Kydd, D. P. Lunn and F. Steinbach (2007):
Screening of anti-human leukocyte monoclonal antibodies for reactivity with equine leukocytes.
Vet Immunol Immunopathol 119: 63-80. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.06.034.
- Igura, K., X. Zhang, K. Takahashi, A. Mitsuru, S. Yamaguchi and T. Takahashi (2004):
Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta.
Cytotherapy 6: 543-553.
- Jackson, T., M. Allard, C. Sreenan, L. Doss, S. Bishop and J. Swain (1990):
The c-myc proto-oncogene regulates cardiac development in transgenic mice.
Mol Cell Biol 10: 3709-3716.
- Jamali, M., P. J. Rogerson, S. Wilton and I. S. Skerjanc (2001):
Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis.
J Biol Chem 276: 42252-42258. DOI: 10.1074/jbc.M107814200.
- Jang, S., H. H. Cho, Y. B. Cho, J. S. Park and H. S. Jeong (2010):
Functional neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin.
BMC Cell Biol 11: 25. DOI: 10.1186/1471-2121-11-25.

- Jasmin, D. C. Spray, A. C. Campos de Carvalho and R. Mendez-Otero (2010):
Chemical induction of cardiac differentiation in p19 embryonal carcinoma stem cells.
Stem Cells Dev 19: 403-412. DOI: 10.1089/scd.2009.0234.
entnommen aus Ramesh et al. (2021)
- Ji, R. P., C. K. Phoon, O. Aristizábal, K. E. McGrath, J. Palis and D. H. Turnbull (2003):
Onset of cardiac function during early mouse embryogenesis coincides with entry of primitive
erythroblasts into the embryo proper.
Circ Res 92: 133-135. DOI: 10.1161/01.res.0000056532.18710.c0.
- Jiang, A., Y. Chen, L. Shi and F. Li (2018):
Differentiation of brown adipose-derived stem cells into cardiomyocyte-like cells is regulated
by a combination of low 5-azacytidine concentration and bone morphogenetic protein 4.
Int J Clin Exp Pathol 11: 5514-5524.
- Jiang, Y. and T. Evans (1996):
TheXenopusGATA-4/5/6 Genes Are Associated with Cardiac Specification and Can
Regulate Cardiac-Specific Transcription during Embryogenesis.
Dev Biol 174: 258-270. DOI: 10.1006/dbio.1996.0071.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-
Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C.
Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002):
Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.
Nature 418: 41-49. DOI: 10.1038/nature00870.
- Jo, C. H., Y. G. Lee, W. H. Shin, H. Kim, J. W. Chai, E. C. Jeong, J. E. Kim, H. Shim, J. S.
Shin, I. S. Shin, J. C. Ra, S. Oh and K. S. Yoon (2014):
Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the
knee: a proof-of-concept clinical trial.
Stem Cells 32: 1254-1266. DOI: 10.1002/stem.1634.
- Ju, X., D. Li, N. Gao, Q. Shi and H. Hou (2008):
Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells using microfluidic chips.
Biotechnol J 3: 383-391. DOI: 10.1002/biot.200700152.
- Jumabay, M. and K. I. Bostrom (2015):
Dedifferentiated fat cells: A cell source for regenerative medicine.
World J Stem Cells 7: 1202-1214. DOI: 10.4252/wjsc.v7.i10.1202.
- Jumabay, M., R. Zhang, Y. Yao, J. I. Goldhaber and K. I. Bostrom (2010):
Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes.
Cardiovasc Res 85: 17-27. DOI: 10.1093/cvr/cvp267.
- Jurek, S., M. A. Sandhu, S. Trappe, M. C. Bermúdez-Peña, M. Kolisek, G. Sponder and J. R.
Aschenbach (2020):
Optimizing adipogenic transdifferentiation of bovine mesenchymal stem cells: a prominent
role of ascorbic acid in FABP4 induction.
Adipocyte 9: 35-50.
- Kaiser, S., B. Hackanson, M. Follo, A. Mehlhorn, K. Geiger, G. Ihorst and U. Kapp (2007):
BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype.
Cytotherapy 9: 439-450. DOI: 10.1080/14653240701358445.

- Kakkar, A., S. B. Nandy, S. Gupta, B. Bharagava, B. Airan and S. Mohanty (2019):
Adipose tissue derived mesenchymal stem cells are better respondents to TGF β 1 for in vitro generation of cardiomyocyte-like cells.
Mol Cell Biochem 460: 53-66. DOI: 10.1007/s11010-019-03570-3.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa and H. Kondoh (2000):
Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development.
Trends Genet 16: 182-187. DOI: 10.1016/s0168-9525(99)01955-1.
- Kang, J.-G., S.-B. Park, M.-S. Seo, H.-S. Kim, J.-S. Chae and K.-S. Kang (2013):
Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.
J Vet Sci 14: 367-371. DOI: 10.4142/jvs.2013.14.3.367.
- Karnieli, O., O. M. Friedner, J. G. Allickson, N. Zhang, S. Jung, D. Fiorentini, E. Abraham, S. S. Eaker, A. Chan and S. Griffiths (2017):
A consensus introduction to serum replacements and serum-free media for cellular therapies.
Cytotherapy 19: 155-169. DOI: 10.1016/j.jcyt.2016.11.011.
- Kasahara, H., S. Bartunkova, M. Schinke, M. Tanaka and S. Izumo (1998):
Cardiac and extracardiac expression of Csx/Nkx2. 5 homeodomain protein.
Circ Res 82: 936-946.
- Kattman, S. J., A. D. Witty, M. Gagliardi, N. C. Dubois, M. Niapour, A. Hotta, J. Ellis and G. Keller (2011):
Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines.
Cell Stem Cell 8: 228-240.
- Katz, T. C., M. K. Singh, K. Degenhardt, J. Rivera-Feliciano, R. L. Johnson, J. A. Epstein and C. J. Tabin (2012):
Distinct compartments of the proepicardial organ give rise to coronary vascular endothelial cells.
Dev Cell 22: 639-650. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.01.012.
- Kawano, Y. and R. Kypta (2003):
Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway.
J Cell Sci 116: 2627-2634. DOI: 10.1242/jcs.00623.
- Kelley, C., H. Blumberg, L. I. Zon and T. Evans (1993):
GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart.
Development 118: 817-827.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter and K. Bieback (2006):
Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.
Stem cells 24: 1294-1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- Khaleghi, M., M. F. Taha, N. Jafarzadeh and A. Javeri (2014):
Atrial and ventricular specification of ADSCs is stimulated by different doses of BMP4.
Biotechnol Lett 36: 2581-2589. DOI: 10.1007/s10529-014-1637-8.

- Khazaei, S., G. Keshavarz, A. Bozorgi, H. Nazari and M. Khazaei (2021):
Adipose tissue-derived stem cells: A comparative review on isolation, culture, and differentiation methods.
Cell Tissue Bank 23: 1-16. DOI: 10.1007/s10561-021-09905-z.
- Kim, S., Y. J. Sur, M.-L. Cho, E. J. Go, Y. H. Kim, A. A. Shetty and S. J. Kim (2020):
Atelocollagen promotes chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells.
Sci Rep 10: 10678. DOI: 10.1038/s41598-020-67836-3.
- Kisiel, A. H., L. A. McDuffee, E. Masaoud, T. R. Bailey, B. P. Esparza Gonzalez and R. Nino-Fong (2012):
Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum.
Am J Vet Res 73: 1305-1317.
- Klaus, A., Y. Saga, M. M. Taketo, E. Tzahor and W. Birchmeier (2007):
Distinct roles of Wnt/ β -catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis.
Proc Natl Acad Sci 104: 18531-18536. DOI: 10.1073/pnas.0703113104.
- Klingemann, H., D. Matzilevich and J. Marchand (2008):
Mesenchymal stem cells—sources and clinical applications.
Transfus Med Hemother 35: 272-277. DOI: 10.1159/000142333.
- Kocan, B., A. Maziarz, J. Tabarkiewicz, T. Ochiya and A. Banaś-Ząbczyk (2017):
Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential.
Stem Cells Int 2017: 1653254. DOI: 10.1155/2017/1653254.
- Koch, T. G., T. Heerkens, P. D. Thomsen and D. H. Betts (2007):
Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood.
BMC Biotechnology 7: 26. DOI: 10.1186/1472-6750-7-26.
- Koerner, J., D. Nestic, J. D. Romero, W. Brehm, P. Mainil-Varlet and S. P. Grogan (2006):
Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
Stem Cells 24: 1613-1619.
- Koh, S. and J. A. Piedrahita (2014):
From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals.
Theriogenology 81: 103-111.
- Kolambkar, Y. M., A. Peister, S. Soker, A. Atala and R. E. Guldberg (2007):
Chondrogenic differentiation of amniotic fluid-derived stem cells.
J Mol Histol 38: 405-413. DOI: 10.1007/s10735-007-9118-1.
- Kono, S., T. Kazama, K. Kano, K. Harada, M. Uechi and T. Matsumoto (2014):
Phenotypic and functional properties of feline dedifferentiated fat cells and adipose-derived stem cells.
Vet J 199: 88-96. DOI: 10.1016/j.tvjl.2013.10.033.
- Kopp, J. L., B. D. Ormsbee, M. Desler and A. Rizzino (2008):
Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells.
Stem Cells 26: 903-911. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0951.

- Kornicka, K., J. Houston and K. Marycz (2018):
Dysfunction of mesenchymal stem cells isolated from metabolic syndrome and type 2 diabetic patients as result of oxidative stress and autophagy may limit their potential therapeutic use.
Stem Cell Rev Rep 14: 337-345.
- Kou, L., X.-W. Lu, M.-K. Wu, H. Wang, Y.-J. Zhang, S. Sato and J.-F. Shen (2014):
The phenotype and tissue-specific nature of multipotent cells derived from human mature adipocytes.
Biochem Biophys Res Commun 444: 543-548. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.077.
- Kozłowska, U., A. Krawczyński, K. Futoma, T. Jurek, M. Rorat, D. Patrzalek and A. Klimczak (2019):
Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues.
World J Stem Cells 11: 347-374.
- Krishnamurthy, N. and R. Kurzrock (2018):
Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors.
Cancer Treat Rev 62: 50-60. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.11.002.
- Kuo, C. K. and R. S. Tuan (2008):
Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.
Tissue Eng Part A 14: 1615-1627.
- Kutschmann, M., R. Bender, U. Grouven and G. Berg (2006):
Aspekte der Fallzahlkalkulation und Powerberechnung anhand von Beispielen aus der rehabilitationswissenschaftlichen Forschung.
Rehabilitation (Stuttg) 45: 377-384. DOI: 10.1055/s-2006-940113.
- Laflamme, M. A., K. Y. Chen, A. V. Naumova, V. Muskheli, J. A. Fugate, S. K. Dupras, H. Reinecke, C. Xu, M. Hassanipour and S. Police (2007):
Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts.
Nat Biotechnol 25: 1015-1024. DOI: 10.1038/nbt1327.
- Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2014):
Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies.
Science 345: 1247125. DOI: 10.1126/science.1247125.
- Lange-Consiglio, A., B. Corradetti, A. Meucci, R. Perego, D. Bizzaro and F. Cremonesi (2013):
Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: in vitro proliferative and multilineage potential assessment.
Equine Vet J 45: 737-744. DOI: 10.1111/evj.12052.
- Langenbach, F. and J. Handschel (2013):
Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro.
Stem Cell Res Ther 4: 117.
- Latief, N., F. A. Raza, F. U. Bhatti, M. N. Tarar, S. N. Khan and S. Riazuddin (2016):
Adipose stem cells differentiated chondrocytes regenerate damaged cartilage in rat model of osteoarthritis.
Cell Biol Int 40: 579-588. DOI: 10.1002/cbin.10596.

- Lauener, R. P., R. S. Geha and D. Vercelli (1990):
Engagement of the monocyte surface antigen CD14 induces lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1-dependent homotypic adhesion.
J Immunol 145: 1390-1394.
- Lee, D.-H., S.-D. Joo, S.-B. Han, J. Im, S.-H. Lee, C. H. Sonn and K.-M. Lee (2011):
Isolation and expansion of synovial CD34⁻ CD44⁺ CD90⁺ mesenchymal stem cells: comparison of an enzymatic method and a direct explant technique.
Connect Tissue Res 52: 226-234. DOI: 10.3109/03008207.2010.516850.
- Lee, E.-M., A.-Y. Kim, E.-J. Lee, J.-K. Park, S.-I. Park, S.-G. Cho, H. K. Kim, S.-Y. Kim and K.-S. Jeong (2016):
Generation of equine-induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries.
Cell Transplant 25: 2003-2016.
- Lee, W.-C. C., J. L. Sepulveda, J. P. Rubin and K. G. Marra (2009):
Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells.
Int J Cardiol 133: 399-401. DOI: 10.1016/j.ijcard.2007.11.068.
- Lee, Y. B., E. M. Kim, H. Byun, H. K. Chang, K. Jeong, Z. M. Aman, Y. S. Choi, J. Park and H. Shin (2018):
Engineering spheroids potentiating cell-cell and cell-ECM interactions by self-assembly of stem cell microlayer.
Biomaterials 165: 105-120. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.02.049.
- Lee, Y. H., E. P. Mottillo and J. G. Granneman (2014):
Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between.
Biochim Biophys Acta 1842: 358-369. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.05.011.
- Lennon, D. P., S. E. Haynesworth, S. P. Bruder, N. Jaiswal and A. I. Caplan (1996):
Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow: identification of serum for optimal selection and proliferation.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 32: 602-611.
- Léobon, B., J. Roncalli, C. Joffre, M. Mazo, M. Boisson, C. Barreau, D. Calise, E. Arnaud, M. André and M. Pucéat (2009):
Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction.
Cardiovasc Res 83: 757-767. DOI: 10.1093/cvr/cvp167.
- Leung, V. Y., B. Gao, K. K. Leung, I. G. Melhado, S. L. Wynn, T. Y. Au, N. W. Dung, J. Y. Lau, A. C. Mak, D. Chan and K. S. Cheah (2011):
SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression.
PLoS Genet 7: e1002356. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002356.
- Levintow, L. and H. Eagle (1961):
Biochemistry of cultured mammalian cells.
Annu Rev Biochem 30: 605-640.

Lewis, S., H. Holl, C. Streeter, C. Posbergh, B. Schanbacher, N. Place, M. Mallicote, M. Long and S. Brooks (2017):

Genomewide association study reveals a risk locus for equine metabolic syndrome in the Arabian horse.

J Anim Sci 95: 1071-1079. DOI: 10.2527/jas.2016.1221.

Li, F., V. X. Truong, H. Thissen, J. E. Frith and J. S. Forsythe (2017):

Microfluidic Encapsulation of Human Mesenchymal Stem Cells for Articular Cartilage Tissue Regeneration.

ACS Appl Mater Interfaces 9: 8589-8601. DOI: 10.1021/acsami.7b00728.

Li, N., R. Yang, W. Zhang, H. Dorfman, P. Rao and R. Gorlick (2009):

Genetically transforming human mesenchymal stem cells to sarcomas: changes in cellular phenotype and multilineage differentiation potential.

Cancer 115: 4795-4806. DOI: 10.1002/cncr.24519.

Li, R., T. Wang, S. Bird, J. Zou, H. Dooley and C. J. Secombes (2013):

B cell receptor accessory molecule CD79 α : Characterisation and expression analysis in a cartilaginous fish, the spiny dogfish (*Squalus acanthias*).

Fish Shellfish Immunol 34: 1404-1415. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.02.015.

Lidell, M. E., M. J. Betz and S. Enerbäck (2014):

Two types of brown adipose tissue in humans.

Adipocyte 3: 63-66. DOI: 10.4161/adip.26896.

Lim, S. Y., P. Sivakumaran, D. E. Crombie, G. J. Dusting, A. Pébay and R. J. Dilley (2013):

Trichostatin A enhances differentiation of human induced pluripotent stem cells to cardiogenic cells for cardiac tissue engineering.

Stem Cells Transl Med 2: 715-725. DOI: 10.5966/sctm.2012-0161.

Lin, C.-S., H. Ning, G. Lin and T. F. Lue (2012):

Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells?

Cytotherapy 14: 1159-1163.

Lin, L., L. Cui, W. Zhou, D. Dufort, X. Zhang, C.-L. Cai, L. Bu, L. Yang, J. Martin and R. Kemler (2007):

β -Catenin directly regulates Islet1 expression in cardiovascular progenitors and is required for multiple aspects of cardiogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A 104: 9313-9318. DOI: 10.1073/pnas.0700923104.

Lin, P. P., M. K. Pandey, F. Jin, A. K. Raymond, H. Akiyama and G. Lozano (2009):

Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice.

Carcinogenesis 30: 1789-1795. DOI: 10.1093/carcin/bgp180.

Lindl, T. and J. Bauer (2002):

Zell- und Gewebekultur.

5. Aufl., Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, ISBN: 978-3-8274-1194-5.

entnommen aus Gstraunthaler, Gerhard (2003)

Linhares, V. L., N. A. Almeida, D. C. Menezes, D. A. Elliott, D. Lai, E. C. Beyer, A. C.

Campos de Carvalho and M. W. Costa (2004):

Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5.

Cardiovasc Res 64: 402-411.

- Liu, J., Q. Xiao, J. Xiao, C. Niu, Y. Li, X. Zhang, Z. Zhou, G. Shu and G. Yin (2022):
Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities.
Signal Transduct Target Ther 7: 3. DOI: 10.1038/s41392-021-00762-6.
- Liu, Z. J., Y. Zhuge and O. C. Velazquez (2009):
Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells.
J Cell Biochem 106: 984-991.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001):
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.
Methods 25: 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lo, B. and L. Parham (2009):
Ethical issues in stem cell research.
Endocr Rev 30: 204-213. DOI: 10.1210/er.2008-0031.
- Lompré, A. M., B. Nadal-Ginard and V. Mahdavi (1984):
Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated.
J Biol Chem 259: 6437-6446.
- Longobardi, L., L. O'Rear, S. Aakula, B. Johnstone, K. Shimer, A. Chytil, W. A. Horton, H. L. Moses and A. Spagnoli (2006):
Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- β signaling.
J Bone Miner Res 21: 626-636. DOI: 10.1359/jbmr.051213.
- Lowey, S., G. S. Waller and K. Trybus (1993):
Function of skeletal muscle myosin heavy and light chain isoforms by an in vitro motility assay.
J Biol Chem 268: 20414-20418.
- Lv, Y., C.-W. Gao, B. Liu, H.-Y. Wang and H.-P. Wang (2017):
BMP-2 combined with salvianolic acid B promotes cardiomyocyte differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells.
Kaohsiung J Med Sci 33: 477-485. DOI: 10.1016/j.kjms.2017.06.006.
- Ma, K., F. Laco, S. Ramakrishna, S. Liao and C. K. Chan (2009):
Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into multi-layered epidermis-like cells in 3D organotypic coculture.
Biomaterials 30: 3251-3258. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.025.
- Maemura, M., H. Taketsuru, Y. Nakajima, R. Shao, A. Kakihara, J. Nogami, Y. Ohkawa and Y. I. Tsukada (2021):
Totipotency of mouse zygotes extends to single blastomeres of embryos at the four-cell stage.
Sci Rep 11: 11167. DOI: 10.1038/s41598-021-90653-1.
- Maitra, M., M. K. Schluterman, H. A. Nichols, J. A. Richardson, C. W. Lo, D. Srivastava and V. Garg (2009):
Interaction of Gata4 and Gata6 with Tbx5 is critical for normal cardiac development.
Dev Biol 326: 368-377. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.11.004.

Makino, S., K. Fukuda, S. Miyoshi, F. Konishi, H. Kodama, J. Pan, M. Sano, T. Takahashi, S. Horii and H. Abe (1999):
Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.
J Clin Invest 103: 697-705.

Mareschi, K., E. Biasin, V. Piacibello, M. Aglietta, E. Madon and F. Fagioli (2001):
Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood.
Haematologica 86: 1099-1100.

Marsland, W. P. (1968):
Heart rate response to submaximal exercise in the Standardbred horse.
J Appl Physiol 24: 98-101.

Marvin, M. J., G. Di Rocco, A. Gardiner, S. M. Bush and A. B. Lassar (2001):
Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm.
Genes & Development 15: 316-327.

Marycz, K., K. Kornicka, M. Marędziak, P. Golonka and J. Nicpoń (2016):
Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by
predominance of autophagy over selective mitophagy.
J Cell Mol Med 20: 2384-2404. DOI: 10.1111/jcmm.12932.

Matsumoto, T., K. Kano, D. Kondo, N. Fukuda, Y. Iribe, N. Tanaka, Y. Matsubara, T. Sakuma, A. Satomi, M. Otaki, J. Ryu and H. Mugishima (2008):
Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential.
J Cell Physiol 215: 210-222. DOI: 10.1002/jcp.21304.

McCulley, D. J. and B. L. Black (2012):
Transcription factor pathways and congenital heart disease.
Curr Top Dev Biol 100: 253-277.

Mehlhorn, A., P. Niemeyer, K. Kaschte, L. Muller, G. Finkenzeller, D. Hartl, N. Sudkamp and H. Schmal (2007):
Differential effects of BMP-2 and TGF- β 1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells.
Cell Prolif 40: 809-823.

Meirelles, L. d. S., P. C. Chagastelles and N. B. Nardi (2006):
Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.
J Cell Sci 119: 2204-2213. DOI: 10.1242/jcs.02932.

Merlo, B., G. Teti, A. Lanci, J. Burk, E. Mazzotti, M. Falconi and E. Iacono (2019):
Comparison between adult and foetal adnexa derived equine post-natal mesenchymal stem cells.
BMC Vet Res 15: 277.

Metcalf, G. L., S. R. McClure, J. M. Hostetter, R. F. Martinez and C. Wang (2016):
Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction from the lateral tailhead, inguinal region, and mesentery of horses.
Can J Vet Res 80: 294-301.

Mitalipov, S. and D. Wolf (2009):
Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming.
Adv Biochem Eng Biotechnol 114: 185-199. DOI: 10.1007/10_2008_45.

Miyahara, Y., N. Nagaya, M. Kataoka, B. Yanagawa, K. Tanaka, H. Hao, K. Ishino, H. Ishida, T. Shimizu, K. Kangawa, S. Sano, T. Okano, S. Kitamura and H. Mori (2006):
Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction.
Nat Med 12: 459-465. DOI: 10.1038/nm1391.

Mohanty, N., B. R. Gulati, R. Kumar, S. Gera, S. Kumar, P. Kumar and P. S. Yadav (2016):
Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells derived from equine
umbilical cord blood.
Cytotechnology 68: 795-807. DOI: 10.1007/s10616-014-9831-z.

Mohanty, S., S. Bose, K. G. Jain, B. Bhargava and B. Airan (2013):
TGF β 1 contributes to cardiomyogenic-like differentiation of human bone marrow
mesenchymal stem cells.
Int J Cardiol 163: 93-99. DOI: 10.1016/j.ijcard.2011.08.003.

Mojallal, A., C. Lequeux, C. Shipkov, A. Duclos, F. Braye, R. Rohrich, S. Brown and O.
Damour (2011):
Influence of age and body mass index on the yield and proliferation capacity of adipose-
derived stem cells.
Aesthetic Plast Surg 35: 1097-1105. DOI: 10.1007/s00266-011-9743-7.

Mollentze, J., C. Durandt and M. S. Pepper (2021):
An in vitro and in vivo comparison of osteogenic differentiation of human mesenchymal
stromal/stem cells.
Stem Cells Int 2021: 9919361. DOI: 10.1155/2021/9919361.

Monteiro, I., S. Vigano, M. Faouzi, I. Treilleux, O. Michielin, C. Ménétrier-Caux, C. Caux, P.
Romero and L. de Leval (2018):
CD73 expression and clinical significance in human metastatic melanoma.
Oncotarget 9: 26659-26669.

Moon, S.-H., K. Ban, C. Kim, S.-S. Kim, J. Byun, M.-K. Song, I.-H. Park, S. P. Yu and Y.-S.
Yoon (2013):
Development of a novel two-dimensional directed differentiation system for generation of
cardiomyocytes from human pluripotent stem cells.
Int J Cardiol 168: 41-52. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.09.077.

Morris, S. A., R. T. Teo, H. Li, P. Robson, D. M. Glover and M. Zernicka-Goetz (2010):
Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse
embryo.
Proc Natl Acad Sci U S A 107: 6364-6369. DOI: 10.1073/pnas.0915063107.

Morrison, S. J. and J. Kimble (2006):
Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer.
Nature 441: 1068-1074.

Morrison, S. J., N. M. Shah and D. J. Anderson (1997):
Regulatory mechanisms in stem cell biology.
Cell 88: 287-298.

Mummery, C. L., J. Zhang, E. S. Ng, D. A. Elliott, A. G. Elefanty and T. J. Kamp (2012):
Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to
cardiomyocytes: a methods overview.
Circ Res 111: 344-358.

- Murad, S., D. Grove, K. Lindberg, G. Reynolds, A. Sivarajah and S. Pinnell (1981):
Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid.
Proc Natl Acad Sci 78: 2879-2882.
- Murata, D., A. Yamasaki, S. Matsuzaki, T. Sunaga, M. Fujiki, S. Tokunaga and K. Misumi (2016):
Characteristics and multipotency of equine dedifferentiated fat cells.
J Equine Sci 27: 57-65. DOI: 10.1294/jes.27.57.
- Mushahary, D., A. Spittler, C. Kasper, V. Weber and V. Charwat (2018):
Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells.
Cytometry A 93: 19-31. DOI: 10.1002/cyto.a.23242.
- Nagy, K., H.-K. Sung, P. Zhang, S. Laflamme, P. Vincent, S. Agha-Mohammadi, K. Woltjen, C. Monetti, I. P. Michael and L. C. Smith (2011):
Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts.
Stem Cell Rev Rep 7: 693-702.
- Naji, A., M. Eitoku, B. Favier, F. Deschaseaux, N. Rouas-Freiss and N. Suganuma (2019):
Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications.
Cell Mol Life Sci 76: 3323-3348. DOI: 10.1007/s00018-019-03125-1.
- Naskou, M. C., N. A. Norton, I. B. Copland, J. Galipeau and J. F. Peroni (2018):
Innate immune responses of equine monocytes cultured in equine platelet lysate.
Vet Immunol Immunopathol 195: 65-71. DOI: 10.1016/j.vetimm.2017.11.005.
- Neidig, L. E., F. Weinberger, N. J. Palpant, J. Mignone, A. M. Martinson, D. W. Sorensen, I. Bender, N. Nemoto, H. Reinecke and L. Pabon (2018):
Evidence for minimal cardiogenic potential of stem cell antigen 1–positive cells in the adult mouse heart.
Circulation 138: 2960-2962.
- Nesto, R. W. (2005):
Obesity: a major component of the metabolic syndrome.
Tex Heart Inst J 32: 387-389.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Schöler and A. Smith (1998):
Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.
Cell 95: 379-391.
- Noort, W., M. Oerlemans, H. Rozemuller, D. Feyen, S. Jaksani, D. Stecher, B. Naaijken, A. Martens, H. Bühring and P. Doevendans (2012):
Human versus porcine mesenchymal stromal cells: phenotype, differentiation potential, immunomodulation and cardiac improvement after transplantation.
J Cell Mol Med 16: 1827-1839.
- Nosedá, M., T. Peterkin, F. C. Simões, R. Patient and M. D. Schneider (2011):
Cardiopoietic factors: extracellular signals for cardiac lineage commitment.
Circ Res 108: 129-152.
- Ntege, E. H., H. Sunami and Y. Shimizu (2020):
Advances in regenerative therapy: a review of the literature and future directions.
Regen Ther 14: 136-153. DOI: 10.1016/j.reth.2020.01.004.

- Oosthoek, P. W., S. Virágh, W. H. Lamers and A. F. Moorman (1993):
Immunohistochemical delineation of the conduction system. II: The atrioventricular node and Purkinje fibers.
Circ Res 73: 482-491. DOI: 10.1161/01.res.73.3.482.
- Ostanin, A., Y. L. Petrovskiy, E. Y. Shevela, E. Kurganova, A. Drobinskaja, O. Dobryakova, E. Lisukova and E. Chernykh (2008):
A new approach to evaluation of osteogenic potential of mesenchymal stromal cells.
Bull Exp Biol Med 146: 534-539.
- Paebst, F., D. Piehler, W. Brehm, S. Heller, C. Schroeck, A. Tarnok and J. Burk (2014):
Comparative immunophenotyping of equine multipotent mesenchymal stromal cells: an approach toward a standardized definition.
Cytometry A 85: 678-687. DOI: 10.1002/cyto.a.22491.
- Paige, S. L., T. Osugi, O. K. Afanasiev, L. Pabon, H. Reinecke and C. E. Murry (2010):
Endogenous Wnt/ β -catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells.
PLoS One 5: e11134. DOI: 10.1371/journal.pone.0011134.
- Pal, R., M. Hanwate, M. Jan and S. Totey (2009):
Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
J Tissue Eng Regen Med 3: 163-174. DOI: 10.1002/term.143.
- Pall, E., S. Toma, C. Crecan, M. Cenariu and I. Groza (2016):
Isolation and Functional Characterization of Equine Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells.
Agric Agric Sci Proc 10: 412-416. DOI: 10.1016/j.aaspro.2016.09.083.
- Palpant, N. J., S.-I. Yasuda, O. MacDougald and J. M. Metzger (2007):
Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1⁺/c-kit⁺ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes.
J Mol Cell Cardiol 43: 362-370. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.012.
- Pan, G. J., Z. Y. Chang, H. R. Schöler and D. Pei (2002):
Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4.
Cell Res 12: 321-329. DOI: 10.1038/sj.cr.7290134.
- Pandžić Jakšić, V. and D. Grizelj (2016):
Under the surface of subcutaneous adipose tissue biology.
Acta Dermatovenerol Croat 24: 250-260.
- Paoletti, C., C. Divieto and V. Chiono (2018):
Impact of Biomaterials on Differentiation and Reprogramming Approaches for the Generation of Functional Cardiomyocytes.
Cells 7: 114. DOI: 10.3390/cells7090114.
- Park, E. J., Y. Watanabe, G. Smyth, S. Miyagawa-Tomita, E. Meyers, J. Klingensmith, T. Camenisch, M. Buckingham and A. M. Moon (2008):
An FGF autocrine loop initiated in second heart field mesoderm regulates morphogenesis at the arterial pole of the heart.
Development 135: 3599-3610. DOI: 10.1242/dev.025437.

- Patrikoski, M., B. Mannerström and S. Miettinen (2019):
Perspectives for clinical translation of adipose stromal/stem cells.
Stem Cells Int 2019: 5858247. DOI: 10.1155/2019/5858247.
- Păunescu, V., E. Deak, D. Herman, I. R. Siska, G. Tănăsie, C. Bunu, S. Anghel, C. A. Tatu, T. I. Oprea and R. Henschler (2007):
In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage.
J Cell Mol Med 11: 502-508.
- Pedersen, P. J., J. K. Kanters, R. Buhl and D. A. Klaerke (2013):
Normal electrocardiographic QT interval in race-fit Standardbred horses at rest and its rate dependence during exercise.
J Vet Cardiol 15: 23-31. DOI: 10.1016/j.jvc.2012.08.002.
- Pedersen, P. J., K. B. Thomsen, E. R. Olander, F. Hauser, L. Tejada Mde, K. L. Poulsen, S. Grubb, R. Buhl, K. Calloe and D. A. Klaerke (2015):
Molecular Cloning and Functional Expression of the Equine K⁺ Channel KV11.1 (Ether a Go-Go-Related/KCNH2 Gene) and the Regulatory Subunit KCNE2 from Equine Myocardium.
PLoS One 10: e0138320. DOI: 10.1371/journal.pone.0138320.
- Peng, L., Z. Jia, X. Yin, X. Zhang, Y. Liu, P. Chen, K. Ma and C. Zhou (2008):
Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue.
Stem Cells Dev 17: 761-773.
- Penny, J., P. Harris, K. M. Shakesheff and A. Mobasher (2012):
The biology of equine mesenchymal stem cells: phenotypic characterization, cell surface markers and multilineage differentiation.
Front Biosci 17: 892-908.
- Perottoni, S., N. G. B. Neto, C. Di Nitto, R. I. Dmitriev, M. T. Raimondi and M. G. Monaghan (2021):
Intracellular label-free detection of mesenchymal stem cell metabolism within a perivascular niche-on-a-chip.
Lab Chip 21: 1395-1408. DOI: 10.1039/d0lc01034k.
- Perucca Orfei, C., M. Viganò, J. R. Pearson, A. Colombini, P. De Luca, E. Ragni, L. Santos-Ruiz and L. De Girolamo (2019):
In vitro induction of tendon-specific markers in tendon cells, adipose- and bone marrow-derived stem cells is dependent on TGFβ₃, BMP-12 and ascorbic acid stimulation.
Int J Mol Sci 20: 149.
- Pessôa, L. V. d. F., P. R. L. Pires, M. Del Collado, N. C. G. Pieri, K. Recchia, A. F. Souza, F. Perecin, J. C. da Silveira, A. F. C. de Andrade and C. E. Ambrosio (2019):
Generation and miRNA characterization of equine induced pluripotent stem cells derived from fetal and adult multipotent tissues.
Stem Cells Int 2019. DOI: 10.1155/2019/1393791.
- Pfaffl, M. W. (2001):
A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res 29: e45. DOI: 10.1093/nar/29.9.e45.

Pierantozzi, E., B. Gava, I. Manini, F. Roviello, G. Marotta, M. Chiavarelli and V. Sorrentino (2011):
Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2.

Stem Cells Dev 20: 915-923. DOI: 10.1089/scd.2010.0353.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999):
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science 284: 143-147.

Planat-Benard, V., C. Menard, M. André, M. Puceat, A. Perez, J.-M. Garcia-Verdugo, L. Pénicaud and L. Casteilla (2004):

Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells.

Circ Res 94: 223-229. DOI: 10.1161/01.RES.0000109792.43271.47.

Ponchel, F., C. Toomes, K. Bransfield, F. T. Leong, S. H. Douglas, S. L. Field, S. M. Bell, V. Combaret, A. Puisieux and A. J. Mighell (2003):

Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions.

BMC Biotechnol 3: 18.

Potter, J. D. and J. Gergely (1974):

Troponin, triomyosin, and actin interactions in the Ca²⁺ ion regulation of muscle contraction.

Biochemistry 13: 2697-2703.

Priya, N., S. Sarcar, A. S. Majumdar and S. SundarRaj (2014):

Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate.

J Tissue Eng Regen Med 8: 706-716. DOI: 10.1002/term.1569.

Prosser, A., C. Scotchford, G. Roberts, D. Grant and V. Sottile (2019):

Integrated multi-assay culture model for stem cell chondrogenic differentiation.

Int J Mol Sci 20: 951.

Qiu, W., T. E. Andersen, J. Bollerslev, S. Mandrup, B. M. Abdallah and M. Kassem (2007):

Patients with high bone mass phenotype exhibit enhanced osteoblast differentiation and inhibition of adipogenesis of human mesenchymal stem cells.

J Bone Miner Res 22: 1720-1731.

Ramesh, S., K. Govarathanan, S. Ostrovidov, H. Zhang, Q. Hu, G. Camci-Unal, R. S. Verma and M. Ramalingam (2021):

Cardiac differentiation of mesenchymal stem cells: impact of biological and chemical inducers.

Stem Cell Rev Rep 17: 1343-1361. DOI: 10.1007/s12015-021-10165-3.

Ranera, B., J. Lyahyai, A. Romero, F. J. Vázquez, A. R. Remacha, M. L. Bernal, P. Zaragoza, C. Rodellar and I. Martín-Burriel (2011):

Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue.

Vet Immunol Immunopathol 144: 147-154. DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.06.033.

Ranera, B., A. R. Remacha, S. Álvarez-Arguedas, A. Romero, F. J. Vázquez, P. Zaragoza, I. Martín-Burriel and C. Rodellar (2012):
Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue.

BMC Vet Res 8: 142.

Rangappa, S., C. Fen, E. H. Lee, A. Bongso and E. S. K. Wei (2003):
Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes.

Ann Thorac Surg 75: 775-779.

Reiser, P. J., M. A. Portman, X.-H. Ning and C. S. Moravec (2001):
Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 280: H1814-H1820.

Riekstina, U., I. Cakstina, V. Parfejevs, M. Hoogduijn, G. Jankovskis, I. Muiznieks, R. Muceniece and J. Ancans (2009):
Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis.

Stem Cell Rev Rep 5: 378-386.

Rink, B. E., K. R. Amilon, C. L. Esteves, H. M. French, E. Watson, C. Aurich and F. X. Donadeu (2017):

Isolation and characterization of equine endometrial mesenchymal stromal cells.

Stem Cell Res Ther 8: 166.

Robertson, J. A. (2001):

Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues.

Nat Rev Genet 2: 74-78.

Rodbell, M. (1966):

Metabolism of Isolated Fat Cells: II. The similar effects of phospholipase c (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism.

J Biol Chem 241: 130-139.

Rojewski, M. T., B. M. Weber and H. Schrezenmeier (2008):

Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues.

Transfus Med Hemother 35: 168-184. DOI: 10.1159/000129013.

Ross, S. E., N. Hemati, K. A. Longo, C. N. Bennett, P. C. Lucas, R. L. Erickson and O. A. MacDougald (2000):

Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling.

Science 289: 950-953. DOI: 10.1126/science.289.5481.950.

Rossant, J. (1987):

Cell lineage analysis in mammalian embryogenesis.

Curr Top Dev Biol 23: 115-146. DOI: 10.1016/s0070-2153(08)60622-5.

entnommen aus Rossant, J. and P.P.L. Tam (2017): New Insights into Early Human Development: Lessons for Stem Cell Derivation and Differentiation. Cell Stem Cell 20: 18-28.

Ruiz-Ojeda, F. J., A. I. Rupérez, C. Gomez-Llorente, A. Gil and C. M. Aguilera (2016):

Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: a review.

Int J Mol Sci 17: 1040. DOI: 10.3390/ijms17071040.

Russell, K. A., N. H. Chow, D. Dukoff, T. W. Gibson, J. LaMarre, D. H. Betts and T. G. Koch (2016):

Characterization and immunomodulatory effects of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.

PLoS One 11: e0167442. DOI: 10.1371/journal.pone.0167442.

Russo, V., C. Yu, P. Belliveau, A. Hamilton and L. E. Flynn (2014):

Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications.

Stem Cells Transl Med 3: 206-217. DOI: 10.5966/sctm.2013-0125.

Rychlik, W., W. Spencer and R. Rhoads (1990):

Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.

Nucleic Acids Res 18: 6409-6412.

Ryu, N.-E., S.-H. Lee and H. Park (2019):

Spheroid culture system methods and applications for mesenchymal stem cells.

Cells 8: 1620.

Safwani, W. K. Z. W., S. Makpol, S. Sathapan and K. H. Chua (2012):

5-Azacytidine is insufficient for cardiogenesis in human adipose-derived stem cells.

J Negat Results Biomed 11: 3.

Sahara, M., F. Santoro and K. R. Chien (2015):

Programming and reprogramming a human heart cell.

EMBO J 34: 710-738. DOI: 10.15252/embj.201490563.

Salehinejad, P., N. B. Alitheen, A. M. Ali, A. R. Omar, M. Mohit, E. Janzamin, F. S. Samani, Z. Torshizi and S. N. Nematollahi-Mahani (2012):

Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly.

In Vitro Cell Dev Biol Anim 48: 75-83. DOI: 10.1007/s11626-011-9480-x.

Samuel, L. J. and B. V. Latinkić (2009):

Early activation of FGF and nodal pathways mediates cardiac specification independently of Wnt/beta-catenin signaling.

PLoS One 4: e7650. DOI: 10.1371/journal.pone.0007650.

Sandhu, M. A., S. Jurek, S. Trappe, M. Kolisek, G. Sponder and J. R. Aschenbach (2017):

Influence of Bovine Serum Lipids and Fetal Bovine Serum on the Expression of Cell Surface Markers in Cultured Bovine Preadipocytes.

Cells Tissues Organs 204: 13-24. DOI: 10.1159/000472708.

Sasse, S., N. Brand, P. Kyprianou, G. Dhoot, R. Wade, M. Arai, M. Periasamy, M. Yacoub and P. Barton (1993):

Troponin I gene expression during human cardiac development and in end-stage heart failure.

Circ Res 72: 932-938. DOI: 10.1161/01.res.72.5.932.

Satoh, H., K. Kishi, T. Tanaka, Y. Kubota, T. Nakajima, Y. Akasaka and T. Ishii (2004):

Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds.

Cell Transplant 13: 405-412. DOI: 10.3727/000000004783983765.

- Scheuermann, R. and E. Racila (1995):
CD19 antigen in leukemia and lymphoma diagnosis and immunotherapy.
Leuk Lymphoma 18: 385-397.
- Schmierer, B. and C. S. Hill (2007):
TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.
Nat Rev Mol Cell Biol 8: 970-982.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008):
Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method.
Nat Protoc 3: 1101-1108.
- Schröck, C., C. Eydt, F. Geburek, L. Kaiser, F. Päßt, J. Burk, C. Pfarrer and C. Staszky (2017):
Bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells from horses after euthanasia.
Vet Med Sci 3: 239-251. DOI: 10.1002/vms3.74.
- Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow and T. Ragg (2006):
The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements.
BMC Mol Biol 7: 3. DOI: 10.1186/1471-2199-7-3.
- Schubert, S., W. Brehm, A. Hillmann and J. Burk (2018):
Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture.
Cytometry A 93: 60-72. DOI: 10.1002/cyto.a.23240.
- Schultheiss, T. M., J. B. Burch and A. B. Lassar (1997):
A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis.
Genes Dev 11: 451-462.
- Schwarz, C., U. Leicht, C. Rothe, I. Drosse, V. Luibl, M. Röcken and M. Schieker (2012):
Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells.
Res Vet Sci 93: 457-462. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.08.010.
- Seo, M.-S., S.-B. Park, H.-S. Kim, J.-G. Kang, J.-S. Chae and K.-S. Kang (2013):
Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells.
J Vet Sci 14: 151-159. DOI: 10.4142/jvs.2013.14.2.151.
- Setoguchi, M., N. Nasu, S. Yoshida, Y. Higuchi, S. Akizuki and S. Yamamoto (1989):
Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones.
Biochim Biophys Acta 1008: 213-222. DOI: 10.1016/0167-4781(80)90012-3.
- Sharma, R., M. R. Livesey, D. J. Wyllie, C. Proudfoot, C. B. A. Whitelaw, D. C. Hay and F. X. Donadeu (2014):
Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells.
Stem Cells Dev 23: 1524-1534. DOI: 10.1089/scd.2013.0565.
- Sheikh, F., R. C. Lyon and J. Chen (2015):
Functions of myosin light chain-2 (MYL2) in cardiac muscle and disease.
Gene 569: 14-20. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.027.

Shen, H., M. Yang, S. Li, J. Zhang, B. Peng, C. Wang, Z. Chang, J. Ong and P. Du (2021):
Mouse totipotent stem cells captured and maintained through spliceosomal repression.
Cell 184: 2843-2859.e2820. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.020.

Shen, J. F., A. Sugawara, J. Yamashita, H. Ogura and S. Sato (2011):
Dedifferentiated fat cells: an alternative source of adult multipotent cells from the adipose
tissues.
Int J Oral Sci 3: 117-124. DOI: 10.4248/IJOS11044.

Shi, S. and S. Gronthos (2003):
Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental
pulp.
J Bone Miner Res 18: 696-704. DOI: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.

Shi, Y., S. Katsev, C. Cai and S. Evans (2000):
BMP signaling is required for heart formation in vertebrates.
Dev Biol 224: 226-237. DOI: 10.1006/dbio.2000.9802.

Shi, Y.-Y., R. P. Nacamuli, A. Salim and M. T. Longaker (2005):
The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging.
Plast Reconstr Surg 116: 1686-1696. DOI: 10.1097/01.prs.0000185606.03222.a9.

Si, Z., X. Wang, C. Sun, Y. Kang, J. Xu, X. Wang and Y. Hui (2019):
Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies.
Biomed Pharmacother 114: 108765. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108765.

Silva, F. J., D. J. Holt, V. Vargas, J. Yockman, S. Boudina, D. Atkinson, D. W. Grainger, M.
P. Revelo, W. Sherman and D. A. Bull (2014):
Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells.
Stem Cells 32: 572-581. DOI: 10.1002/stem.1595.

Smith, R. E. and J. C. Roberts (1964):
Thermogenesis of brown adipose tissue in cold-acclimated rats.
Am J Physiol 206: 143-148. DOI: 10.1152/ajplegacy.1964.206.1.143.

Smith, R. K., M. Korda, G. W. Blunn and A. E. Goodship (2003):
Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow
into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment.
Equine Vet J 35: 99-102. DOI: 10.2746/042516403775467388.

Soltani, L. and A. H. Mahdavi (2022):
Role of Signaling Pathways during Cardiomyocyte Differentiation of Mesenchymal Stem
Cells.
Cardiology 147: 216-224. DOI: 10.1159/000521313.

Soltani, L., H. Rahmani, M. Joupari, H. Ghaneialvar, M. Amirhossein and M. Shamsara
(2015):
Effects of 5-Azacytidine on Differentiation of Ovine Mesenchymal Stem Cells.
Int J Stem Cell Res Transplant 3: 96-100. DOI: 10.19070/2328-3548-1500016.

Soltani, L., H. R. Rahmani, M. Daliri Joupari, H. Ghaneialvar, A. H. Mahdavi and M.
Shamsara (2016):
Ovine fetal mesenchymal stem cell differentiation to cardiomyocytes, effects of co-culture,
role of small molecules; reversine and 5-azacytidine.
Cell Biochem Funct 34: 250-261. DOI: 10.1002/cbf.3187.

Spaas, J. H., C. De Schauwer, P. Cornillie, E. Meyer, A. Van Soom and G. R. Van de Walle (2013):

Culture and characterisation of equine peripheral blood mesenchymal stromal cells.
Vet J 195: 107-113. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.05.006.

Später, D., E. M. Hansson, L. Zangi and K. R. Chien (2014):

How to make a cardiomyocyte.
Development 141: 4418-4431. DOI: 10.1242/dev.091538.

St-Jacques, B., M. Hammerschmidt and A. P. McMahon (1999):

Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation.
Genes Dev 13: 2072-2086.

Stalsberg, H. and R. L. DeHaan (1969):

The precardiac areas and formation of the tubular heart in the chick embryo.
Dev Biol 19: 128-159. DOI: 10.1016/0012-1606(69)90052-9.

Stern, C. D., R. T. Yu, A. Kakizuka, C. R. Kintner, L. S. Mathews, W. W. Vale, R. M. Evans and K. Umesono (1995):

Activin and its receptors during gastrulation and the later phases of mesoderm development in the chick embryo.
Dev Biol 172: 192-205. DOI: 10.1006/dbio.1995.0015.

Stojanović, S., S. Najman and A. Korać (2018):

Stem Cells Derived from Lipoma and Adipose Tissue—Similar Mesenchymal Phenotype but Different Differentiation Capacity Governed by Distinct Molecular Signature.
Cells 7: 260.

Strioga, M., S. Viswanathan, A. Darinskas, O. Slaby and J. Michalek (2012):

Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells.
Stem Cells Dev 21: 2724-2752. DOI: 10.1089/scd.2011.0722.

Stucky, B. J. (2012):

SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms.
J Biomol Tech 23: 90-93.

Suchanek, J., T. Soukup, B. Visek, R. Ivancakova, L. Kucerova and J. Mokry (2009):

Dental pulp stem cells and their characterization.
Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 153: 31-35. DOI: 10.5507/bp.2009.005.

Sun, Z., J. Zhang, J. Li, M. Li, J. Ge, P. Wu, B. You and H. Qian (2021):

Roles of mesenchymal stem cell-derived exosomes in cancer development and targeted therapy.
Stem Cells Int 2021. DOI: 10.1155/2021/9962194.

Swijnenburg, R. J., S. Schrepfer, F. Cao, J. I. Pearl, X. Xie, A. J. Connolly, R. C. Robbins and J. C. Wu (2008):

In vivo imaging of embryonic stem cells reveals patterns of survival and immune rejection following transplantation.
Stem Cells Dev 17: 1023-1029. DOI: 10.1089/scd.2008.0091.

- Syska, H., S. V. Perry and I. P. Trayer (1974):
A new method of preparation of troponin I (inhibitory protein) using affinity chromatography.
Evidence for three different forms of troponin I in striated muscle.
FEBS Lett 40: 253-257. DOI: 10.1016/0014-5793(74)80238-3.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006):
Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by
defined factors.
Cell 126: 663-676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takahashi, T., B. Lord, P. C. Schulze, R. M. Fryer, S. S. Sarang, S. R. Gullans and R. T. Lee
(2003):
Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes.
Circulation 107: 1912-1916. DOI: 10.1161/01.Cir.0000064899.53876.A3.
- Takei, S., H. Ichikawa, K. Johkura, A. Mogi, H. No, S. Yoshie, D. Tomotsune and K. Sasaki
(2009):
Bone morphogenetic protein-4 promotes induction of cardiomyocytes from human embryonic
stem cells in serum-based embryoid body development.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 296: H1793-H1803. DOI: 10.1152/ajpheart.01288.2008.
- Takeuchi, J. K. and B. G. Bruneau (2009):
Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors.
Nature 459: 708-711. DOI: 10.1038/nature08039.
- Tam, P. P., M. Parameswaran, S. J. Kinder and R. P. Weinberger (1997):
The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the
role of ingression and tissue movement during gastrulation.
Development 124: 1631-1642. DOI: 10.1242/dev.124.9.1631.
- Tan, K., K. Zheng, D. Li, H. Lu, S. Wang and X. Sun (2017):
Impact of adipose tissue or umbilical cord derived mesenchymal stem cells on the
immunogenicity of human cord blood derived endothelial progenitor cells.
PLoS One 12: e0178624. DOI: 10.1371/journal.pone.0178624.
- Tan, Y., S. Ooi and L. Wang (2014):
Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and
epigenetic perspectives.
Curr Stem Cell Res Ther 9: 63-72.
- Tang, Y., Z. y. Pan, Y. Zou, Y. He, P. y. Yang, Q. q. Tang and F. Yin (2017):
A comparative assessment of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat
as a potential cell source for knee osteoarthritis treatment.
J Cell Mol Med 21: 2153-2162. DOI: 10.1111/jcmm.13138.
- Taylor, E. M., R. McFarlane and C. Price (1996):
5-Azacytidine treatment of the fission yeast leads to cytotoxicity and cell cycle arrest.
Mol Gen Genet 253: 128-137.
- Tenenbaum, H. and J. Heersche (1982):
Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro.
Calcif Tissue Int 34: 76-79.

Teunissen, M., F. Verseijden, F. Riemers, G. van Osch and M. Tryfonidou (2021):
The lower in vitro chondrogenic potential of canine adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (MSC) compared to bone marrow-derived MSC is not improved by BMP-2 or BMP-6.

Vet J 269: 105605. DOI: 10.1016/j.tvjl.2020.105605.

Tirosh-Finkel, L., H. Elhanany, A. Rinon and E. Tzahor (2006):
Mesoderm progenitor cells of common origin contribute to the head musculature and the cardiac outflow tract.

Development 133: 1943-1953. DOI: 10.1242/dev.02365.

Tomita, S., R.-K. Li, R. D. Weisel, D. A. Mickle, E.-J. Kim, T. Sakai and Z.-Q. Jia (1999):
Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.

Circulation 100: I1247-256. DOI: 10.1161/01.cir.100.suppl_2.ii-247.

Trachsel, D. S., H. J. Stage, S. Rausch, S. Trappe, K. Söllig, G. Sponder, R. Merle, J. R. Aschenbach and H. Gehlen (2022):

Comparison of Sources and Methods for the Isolation of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells and Preliminary Results on Their Reaction to Incubation with 5-Azacytidine.

Animals 12: 2049.

Trachsel, D. S., M. A. Tejada, V. Groesfjeld Christensen, P. J. Pedersen, J. K. Kanters, R. Buhl, K. Calloe and D. A. Klaerke (2018):

Effects of trimethoprim-sulfadiazine and detomidine on the function of equine Kv 11.1 channels in a two-electrode voltage-clamp (TEVC) oocyte model.

J Vet Pharmacol Ther 41: 536-545. DOI: 10.1111/jvp.12502.

Trivedi, S., K. Srivastava, A. Gupta, T. S. Saluja, S. Kumar, D. Mehrotra and S. K. Singh (2020):

A quantitative method to determine osteogenic differentiation aptness of scaffold.

J Oral Biol Craniofac Res 10: 158-160. DOI: 10.1016/j.jobcr.2020.04.006.

Ueyama, T., H. Kasahara, T. Ishiwata, Q. Nie and S. Izumo (2003):

Myocardin expression is regulated by Nkx2. 5, and its function is required for cardiomyogenesis.

Mol Cell Biol 23: 9222-9232.

Uosaki, H., H. Fukushima, A. Takeuchi, S. Matsuoka, N. Nakatsuji, S. Yamanaka and J. K. Yamashita (2011):

Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression.

PLoS One 6: e23657. DOI: 10.1371/journal.pone.0023657.

Van de Velde, H., G. Cauffman, H. Tournaye, P. Devroey and I. Liebaers (2008):

The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm.

Hum Reprod 23: 1742-1747. DOI: 10.1093/humrep/den190.

Van der Loop, F., G. Schaart, W. Langmann, F. Ramaekers and C. Viebahn (1992):

Expression and organization of muscle specific proteins during the early developmental stages of the rabbit heart.

Anat Embryol 185: 439-450.

Van Der Vekens, N., I. Hunter, J. P. Goetze, A. Decloedt, D. De Clercq and G. van Loon (2013):

Human and equine cardiovascular endocrinology: beware to compare.

Cardiovasc Endocrinol Metab 2: 67-76. DOI: 10.1097/XCE.0000000000000009.

Van Dijk, A., H. W. M. Niessen, B. Z. Doulabi, F. C. Visser and F. J. Van Milligen (2008):

Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin.

Cell Tissue Res 334: 457-467. DOI: 10.1007/s00441-008-0713-6.

Van Loon, V. J., C. J. Scheffer, H. J. Genn, A. C. Hoogendoorn and J. W. Greve (2014):

Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders.

Vet Q 34: 92-97. DOI: 10.1080/01652176.2014.949390.

van Marken Lichtenbelt, W. D., J. W. Vanhomerig, N. M. Smulders, J. M. Drossaerts, G. J. Kemerink, N. D. Bouvy, P. Schrauwen and G. J. Teule (2009):

Cold-activated brown adipose tissue in healthy men.

N Engl J Med 360: 1500-1508. DOI: 10.1056/NEJMoa0808718.

Varró, A., D. Lathrop, S. Hester, P. Nanasi and J. Papp (1993):

Ionic currents and action potentials in rabbit, rat, and guinea pig ventricular myocytes.

Basic Res Cardiol 88: 93-102.

Vidal, M. A., G. E. Kilroy, M. J. Lopez, J. R. Johnson, R. M. Moore and J. M. Gimble (2007):

Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.

Vet Surg 36: 613-622. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x.

Vidal, M. A., S. O. Robinson, M. J. Lopez, D. B. Paulsen, O. Borkhsenius, J. R. Johnson, R. M. Moore and J. M. Gimble (2008):

Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow.

Vet Surg 37: 713-724.

Vincent, S. D. and M. E. Buckingham (2010):

How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells.

Curr Top Dev Biol 90: 1-41.

Vizoso, F. J., N. Eiro, S. Cid, J. Schneider and R. Perez-Fernandez (2017):

Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine.

Int J Mol Sci 18: 1852.

Vodyanik, M. A., J. Yu, X. Zhang, S. Tian, R. Stewart, J. A. Thomson and Slukvin, II (2010):

A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells.

Cell Stem Cell 7: 718-729. DOI: 10.1016/j.stem.2010.11.011.

Wagner, W. and A. D. Ho (2007):

Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges.

Stem Cell Rev 3: 239-248. DOI: 10.1007/s12015-007-9001-1.

Wagner, W., P. Horn, M. Castoldi, A. Diehlmann, S. Bork, R. Saffrich, V. Benes, J. Blake, S. Pfister and V. Eckstein (2008):
Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process.
PloS One 3: e2213. DOI: 10.1371/journal.pone.0002213.

Wakitani, S., T. Saito and A. I. Caplan (1995):
Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine.
Muscle Nerve 18: 1417-1426.

Walsh, S., G. Jordan, C. Jefferiss, K. Stewart and J. Beresford (2001):
High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis.
Rheumatology 40: 74-83.

Wang, E. A., V. Rosen, P. Cordes, R. M. Hewick, M. J. Kriz, D. P. Luxenberg, B. S. Sibley and J. M. Wozney (1988):
Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors.
Proc Natl Acad Sci 85: 9484-9488.

Wang, K. H., A. P. Kao, H. Wangchen, F. Y. Wang, C. H. Chang, C. C. Chang and S. D. Lin (2008):
Optimizing proliferation and characterization of multipotent stem cells from porcine adipose tissue.
Biotechnol Appl Biochem 51: 159-166.

Warrick, H. M. and J. A. Spudich (1987):
Myosin structure and function in cell motility.
Annu Rev Cell Biol 3: 379-421.

Waselau, M. (2021):
Diagnose und Therapie von Kniegelenkerkrankungen—ein Update.
Pferdespiegel, Thieme 24: 99-105.

Watanabe, D., I. Suetake, T. Tada and S. Tajima (2002):
Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis.
Mech Dev 118: 187-190.

Watson, J. E., N. A. Patel, G. Carter, A. Moor, R. Patel, T. Ghansah, A. Mathur, M. M. Murr, P. Bickford and L. J. Gould (2014):
Comparison of markers and functional attributes of human adipose-derived stem cells and dedifferentiated adipocyte cells from subcutaneous fat of an obese diabetic donor.
Adv Wound Care 3: 219-228.

Wessels, A., J. L. Vermeulen, S. Virágh, F. Kálmán, W. H. Lamers and A. F. Moorman (1991):
Spatial distribution of "tissue-specific" antigens in the developing human heart and skeletal muscle. II. An immunohistochemical analysis of myosin heavy chain isoform expression patterns in the embryonic heart.
Anat Rec 229: 355-368. DOI: 10.1002/ar.1092290309.

Westhauser, F., M. Karadjian, C. Essers, A.-S. Senger, S. Hagmann, G. Schmidmaier and A. Moghaddam (2019):

Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is enhanced in a 45S5-supplemented β -TCP composite scaffold: an in-vitro comparison of Vitoss and Vitoss BA.

PLoS One 14: e0212799. DOI: 10.1371/journal.pone.0212799.

Wilkinson, J. M. and R. J. Grand (1978):

Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles.

Nature 271: 31-35. DOI: 10.1038/271031a0.

Wilson-Fritch, L., A. Burkart, G. Bell, K. Mendelson, J. Leszyk, S. Nicoloso, M. Czech and S. Corvera (2003):

Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone.

Mol Cell Biol 23: 1085-1094.

Worster, A. A., A. J. Nixon, B. D. Brower-Toland and J. Williams (2000):

Effect of transforming growth factor β 1 on chondrogenic differentiation of cultured equine mesenchymal stem cells.

Am J Vet Res 61: 1003-1010.

Wright, A., M. L. Arthaud-Day and M. L. Weiss (2021):

Therapeutic use of mesenchymal stromal cells: the need for inclusive characterization guidelines to accommodate all tissue sources and species.

Front Cell Dev Biol 9: 632717. DOI: 10.3389/fcell.2021.632717.

Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch and J. C. Mathison (1990):

CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.

Science 249: 1431-1433. DOI: 10.1126/science.1698311.

Wronska, A. and Z. Kmiec (2012):

Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots.

Acta Physiol 205: 194-208. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2012.02409.x.

Wu, J., P. Cohen and B. M. Spiegelman (2013):

Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown?

Genes Dev 27: 234-250.

Wystrychowski, W., B. Patlolla, Y. Zhuge, E. Neofytou, R. C. Robbins and R. E. Beygui (2016):

Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum.

Stem Cell Res Ther 7: 84. DOI: 10.1186/s13287-016-0343-y.

Xin, M., E. N. Olson and R. Bassel-Duby (2013):

Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair.

Nature Reviews Molecular Cell Biology 14: 529-541. DOI: 10.1038/nrm3619.

Xu, W., X. Zhang, H. Qian, W. Zhu, X. Sun, J. Hu, H. Zhou and Y. Chen (2004):

Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro.

Exp Biol Med 229: 623-631.

Yaneselli, K. M., C. P. Kuhl, P. B. Terraciano, F. S. de Oliveira, S. B. Pizzato, K. Pazza, A. B. Magrisso, V. Torman, A. Rial and M. Moreno (2018):
Comparison of the characteristics of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells extracted from different sites and at different passage numbers.
J Vet Sci 19: 13-20.

Yang, G., Z. Xiao, X. Ren, H. Long, K. Ma, H. Qian and Y. Guo (2017):
Obtaining spontaneously beating cardiomyocyte-like cells from adipose-derived stromal vascular fractions cultured on enzyme-crosslinked gelatin hydrogels.
Sci Rep 7: 41781. DOI: 10.1038/srep41781.

Yang, J., T. Song, P. Wu, Y. Chen, X. Fan, H. Chen, J. Zhang and C. Huang (2012):
Differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow to sinus node-like cells.
Mol Med Rep 5: 108-113. DOI: 10.3892/mmr.2011.611.

Yang, L., M. H. Soonpaa, E. D. Adler, T. K. Roepke, S. J. Kattman, M. Kennedy, E. Henckaerts, K. Bonham, G. W. Abbott, R. M. Linden, L. J. Field and G. M. Keller (2008):
Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population.
Nature 453: 524-528. DOI: 10.1038/nature06894.

Young, P., J. Arch and M. Ashwell (1984):
Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse.
FEBS Lett 167: 10-14.

Young, R. A. (1976):
Fat, energy and mammalian survival.
American Zoologist 16: 699-710.

Yuasa, S., Y. Itabashi, U. Koshimizu, T. Tanaka, K. Sugimura, M. Kinoshita, F. Hattori, S. I. Fukami, T. Shimazaki and H. Okano (2005):
Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells.
Nature Biotechnology 23: 607-611. DOI: 10.1038/nbt1093.

Zaffran, S., R. G. Kelly, S. M. Meilhac, M. E. Buckingham and N. A. Brown (2004):
Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field.
Circ Res 95: 261-268. DOI: 10.1161/01.RES.0000136815.73623.BE.

Zahedi, M., A. Parham, H. Dehghani and H. K. Mehrjerdi (2017):
Stemness signature of equine marrow-derived mesenchymal stem cells.
Int J Stem Cells 10: 93-102.

Zhang, D.-Z., L.-Y. Gai, H.-W. Liu, Q.-H. Jin, J.-H. Huang and X.-Y. Zhu (2007):
Transplantation of autologous adipose-derived stem cells ameliorates cardiac function in rabbits with myocardial infarction.
Chin Med J 120: 300-307.

Zhang, L., P. Su, C. Xu, J. Yang, W. Yu and D. Huang (2010):
Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems.
Biotechnol Lett 32: 1339-1346. DOI: 10.1007/s10529-010-0293-x.

- Zhao, R., A. J. Watt, M. A. Battle, J. Li, B. J. Bondow and S. A. Duncan (2008):
Loss of both GATA4 and GATA6 blocks cardiac myocyte differentiation and results in acardia
in mice.
Dev Biol 317: 614-619. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.03.013.
- Zhao, Y., S. D. Waldman and L. E. Flynn (2012):
The effect of serial passaging on the proliferation and differentiation of bovine adipose-
derived stem cells.
Cells Tissues Organs 195: 414-427. DOI: 10.1159/000329254.
- Zheng, L., Q. Tu, S. Meng, L. Zhang, L. Yu, J. Song, Y. Hu, L. Sui, J. Zhang and M. Dard
(2017):
Runx2/DICER/miRNA pathway in regulating osteogenesis.
J Cell Physiol 232: 182-191. DOI: 10.1002/jcp.25406.
- Zhou, T., Z. Yuan, J. Weng, D. Pei, X. Du, C. He and P. Lai (2021):
Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells.
J Hematol Oncol 14: 24.
- Zhu, W., H. Wang and D. Zhu (2021):
Wnt/ β -catenin signaling pathway in lung cancer.
Med Drug Discov 13: 100113. DOI: 10.1016/j.medidd.2021.100113.
- Ziegler-Heitbrock, H. and R. Ulevitch (1993):
CD14: cell surface receptor and differentiation marker.
Immunol Today 14: 121-125.
- Zoico, E., S. Rubele, A. De Caro, N. Nori, G. Mazzali, F. Fantin, A. Rossi and M. Zamboni
(2019):
Brown and beige adipose tissue and aging.
Front Endocrinol 10: 368. DOI: 10.3389/fendo.2019.00368.
- Zuk, P. A., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K.
Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick (2002):
Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.
Mol Biol Cell 13: 4279-4295. DOI: 10.1091/mbc.e02-02-0105.
- Zuker, M. (2003):
Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res 31: 3406-3415.

9. Anhang

9.1. Materialien

Tab. 14: Geräte

2300 Enspire™ Multimode Plate Reader	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Air Liquide ARPEGE 140 Flüssigstickstoffbehälter mit Rolluntersatz	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Binder CB160 Inkubator mit O2-Regelung	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Bioanalyzer 2100 Instrument	Agilent, Santa Clara, CA, USA
BR-2000 Vortexer, 120 V	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
CASY® Cell Counter, Model TT	Roche-Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Centrifuge 5418 R - Mikrozentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5804R - Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ChemiDoc™ XRS+ System Imaging System	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Einbettautomat Logos One	A. Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810 R	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Eppendorf Research® plus, variable, Einkanal, 100 - 1000 µl; 10-100 µl; 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Grant Instruments™ PMHT Thermoschüttler für Mikroröhrchen und Mikrotiterplatten (PSC24 24 x 2.0 ml)	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
iCycler iQ™ Multicolor Real-Time PCR Detection System	Fa. Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast Motic AE2000	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica DMI 6000B Epi- Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mastercycler® nexus gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Anhang

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse II nach EN 12469: 2000, Class II, Safety Cabinet, Typ S2020 1.2	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
NanoPhotometer® P-Class, P 330	Implen, München, Deutschland
pfm Waterbath 1000	pfm medical ag, Köln, Deutschland
pipetus® Akku-betriebene Pipettierhilfe alle Pipetten von 0,1 ml bis 200 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply (Elektrophorese-Netzgerät)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Retsch™ Edelstahl-Mahlkugeln, 5 mm Durchmesser	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Rotationsmikrotom HM 325	Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA
Saphir Akku-Schermaschine, 230 V	Heininger AG, Herzogenbuchsee, Schweiz
Sartorius MC-1 Serie Analysenwaage AC210S, Max 210gr, 0,1mg	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Schwingmühle MM200	Retsch, Haan, Deutschland
Sigma 3-30 KS Tischzentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Sub-Cell Model 192 Cell (horizontales Elektrophorese-System)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tristar 3 Multimode Reader	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad-Wildbad, Deutschland
UV-Transilluminator UST-20M-8R	Biostep GmbH, Burkhardtsdorf, Deutschland
Wasserbad, Serie VWB2 (VWB2 26)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Welbilt Flockeneisbereiter mit Eisspeicher Manitowoc Ice UFP-Serie, UFP 0244-AF	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zählkammer, nach Neubauer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda Königshofen, Deutschland

Tab. 15: Verbrauchsmaterialien

10 ml (12 ml) HENKE-JECT® Einmalspritze	Henke Sass Wolf, Tuttlingen, Deutschland
24-Well CytoOne® Platte, TC-behandelt	Starlab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Cell Counting Slides for TC10™/TC20™ Cell Counter, Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Corning™ Falcon™ Zellsiebe, 100 µm	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Deckgläser Stärke 1, 18 x 18 mm von Menzel	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5 ml; 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S.® Standard (Pipettenspitzen) Eppendorf Quality, 0,1 – 10 µL, 2 – 200 µL, 50 – 1,000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gewebe-Einbettkassetten, Universal, pastellgrün, mit Deckel	KABE-Labortechnik GmbH, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen max. 1,5 ml	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
LLG-Serologische Pipetten Typ 1, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Lab Logistics Group GmbH, Meckenheim, Deutschland
Microplate, 96 well, PS, V-Bottom, clear	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
NOBATOP® 12, à 200 Vliesstoffkompressen, 10 x 10 cm	Nobamed Paul Danz AG, Wetter, Deutschland
PCR-Platte 96-well, BIO-CERT® PCR QUALITY, weiß, ohne Rahmen	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Röhre 5 ml, 75*12mm, PS	SARSTEDT AG & Co. KG, 51588 Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal SurPhob Spitzen, Filterspitzen, Low Binding, graduiert	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Skalpell Cutoffix® steril, 10 von B. Braun	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Softasept® N farblos, Flasche, 1.000 ml, Lösung zur Anwendung auf der Haut, Ethanol 74,1% und 2-Propanol (Ph. Eur.) 10%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

StarFrost Advanced Adhesive	Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland
Sterican® Einmal-Injektions-Kanüle Gr. 1, G 20 x 1 1/2" / ø 0,90 x 40 mm BL/LB, gelb	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Vet-Sept® Lösung 10% Povidon-Jod, 1000 ml	Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²) mit Filter	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatte schwarz mit klarem Boden, steril, 96-Wells, Flachboden, Greiner Bio- One	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Zellkulturtestplatten, 6 Kalotten, 12 Kalotten bzw. 24 Kalotten	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber S (Länge 240 mm), drehbarer Schaber, Schaberbreite 13 mm, strahlensterilisiert, frei von Pyrogenen	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml, konisch	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
µltraAmp PCR Products, PCR Tubes, 0,2 ml	Sorenson™ Bio Science Inc., Salt Lake City, Utah, USA

Tab. 16: Zellkulturmedien und Supplemente

BioWest - Amphotericin B 100X L0009 250 mg/l amphotericin B, 205 mg/l sodium deoxycholate in water	BioWest, Riverside, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit geringer Glukosekonzentration (1000 mg/l Glukose), L-Glutamin, Phenolrot und Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit hohem Glukosegehalt (4500 mg/l Glukose), L-Glutamin, Phenolrot und Natriumpyruvat	Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fötales Kälberserum, steril-filtriert, Hämoglobin, ≤ 25 mg/dl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Horse Serum, Donor Herd, Hybrido getestet, sterilfiltriert	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Penicillin-Streptomycin; 0,1 µm filtriert, mit 10000 U/ml Penicillin und 10000 µg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Roti-CELL HEPES-Lösung, 1 M, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
VLE-RPMI 1640 (Very Low Endotoxin) Medium with stable Glutamine (with 2.0 g/l NaHCO ₃)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

Tab. 17: Reagenzien und Lösungen

2-Mercaptoethanol, 100 ml, Glas, ≥ 99 %, p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol, ROTIPURAN®, ≥ 99,8 %, p.a., ACS, ISO, 2,5l, UN1219	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX), ≥ 99 % (HPLC), Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
6x Orange DNA Loading Dye, 1 ml	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Accutase® solution	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Agarose-Standard, 1 kg ROTI®Agarose für die DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Biotin, Pulver, ≥ 99% (HPLC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
BIS-TRIS, 1 kg, PUFFERAN® ≥ 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Corning™ ITS+ Premix Universal Kulturergänzung	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Coverquick 2000 QPath Mounting Media	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glucose, ≥ 99,5%, CELLPURE®, wasserfrei, 5 kg	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI 4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, 10 mg	Roche Holding AG, Basel, Schweiz
Dexamethason, ≥ 97% (HPLC), Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid, sterilfiltriert, geeignet für Hybridom	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Anhang

Eosin, Konz. wässrig 2%ig	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Ethanol vergällt ≥ 99,8 %, Ethanol denatured	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol, ROTIPURAN®, ≥ 99,8 %, p.a., Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, 1kg, ≥ 99%, USP	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamin-tetraessigsäure, ≥ 99%, p.a., ACS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EX-CYTE® Growth Enhancement Media Supplement, 10 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Formaldehydlösung 4% phosphatgepuffert	Walter-CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland
Gentamycin 50 mg/ml	Bio&Sell GmbH, Feucht, Deutschland
Gibco™ Kollagenase, Typ I, Pulver	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer, 2.5 l, Kunst., 2,5 l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HyperLadder™ 25bp-500bp	Bioline, Meridian Bioscience, Memphis, TN, USA
Insulin-Lösung aus Rinder-Pankreas, 10 mg/ml Insulin in 25 mM HEPES, sterilfiltriert, pH 8.2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
iQ™SYBR Green Supermix (2x), 500 x 50 µl rxns, 12.5 ml (10 x 1.25 ml)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Isopropylalkohol-Pharma (EP grade), Sorte 7700EP	Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Deutschland
Isotonische Natriumchlorid-Lösung 0,9% ad us. Vet.	B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland
L-Ascorbinsäure, reinst, zur Analyse, ≥ 99.0% (RT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Laminin, Maus, aufgereinigt, 5 mg (1 mg/ml)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Anhang

Natriumthiosulfat (5%), 250 ml	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
Nilrot, zur Mikroskopie	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pancoll human, Density: 1.077 g/ml, 500 ml	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Paraffin 54/56°C zu 20kg	Engelbrecht GmbH, Edermünde (Besse), Deutschland
Peprtech 5-Azacytidine 50mg	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Peprtech Human DKK-1	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Prolin, ReagentPlus®, ≥ 99% (HPLC), 100 g	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ProTaq [®] PARAmount (w/o Xylene, Toluol)	quartett GmbH, Berlin, Deutschland
Pyrogallol, wässrig, 1%, 250 ml	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
Recombinant Human/Murine/Rat Activin A (CHO derived)	PeprTech Germany, Hamburg, Deutschland
rhBMP-4 bone morphogenetic protein 4 recombinant human (NSO-derived), 10 µg > 95% purity	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
RNAlater™ Stabilisierungslösung	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rosiglitazon, ≥ 98% (HPLC), Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
ROTI [®] Histofix 4%, 500 ml, <i>ready-to-use</i> , 4% Formaldehyd, phosphatgepuffert, pH 7	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silbernitratlösung, 5%, 250 ml	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
TGF-β3 Recombinant Human Protein, 5 µg	Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypanblau Lösung, 0.4%, flüssig, sterilfiltriert	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung, sterilfiltriert 0.25% Trypsin, 0.02% EDTA (w/v) in Hanks' Balanced Salt Solution (mit Phenolrot)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Wasser, steril, ready-to-use, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes Wasser, 1 Liter	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere), 1 l, ROTIPURAN®, ≥ 99 %, p.a., ACS, ISO, 1l, UN1307	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Glycerin-phosphat Dinatriumsalz Pentahydrat, ≥ 98.0% (NT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 18: Puffer

CASYTon® (Verdünnungspuffer)	Th. Geyer GmbH & Co. KG Niederlassung Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS): mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ und ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FACS-Puffer: DPBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ supplementiert mit 0,2% BSL und 2 mM EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 19: Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit # Art.-Nr. 5067-1511	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Alkaline Phosphatase Assay Kit (Fluorometric), # Art.-Nr.: ab83371	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Färbekit: Alcianblau-Kernechtrot für saure Mucosubstanzen # Art.-Nr.: 13416	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, Deutschland
Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (G3PDH) Assay Kit (Colorimetric) # Art.-Nr.: ab174095	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Human Aggrecan ELISA Kit # Art.-Nr.: ab213754	Abcam, Cambridge, Großbritannien
iScript™ cDNA Synthesis Kit # Art.-Nr.: 1708891	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NucleoSpin® RNA, Mini kit for RNA purification # Art.-Nr.: 740955.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit # Art.-Nr.: 740609.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

Taq PCR Master Mix Kit # Art.-Nr.: 201443	Qiagen, Hilden, Deutschland
--	-----------------------------

Tab. 20: Antikörper und Isotypkontrollen (Durchflusszytometrie)

Alexa Fluor® 488 Streptavidin # Art.-Nr.: 405235	BioLegend, San Diego, USA
APC anti-human CD29 Antibody (Clone TS2/16) # Art.-Nr.: 303007	BioLegend, San Diego, USA
CD3 Monoclonal Antibody (OKT3), Biotin, eBioscience™ # Art.-Nr.: 13-0037-82	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
CD45 antibody F10-89-4, Mouse anti Human CD45 # Art.-Nr.: MCA87	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Deutschland
Invitrogen CD105 (Endoglin) Monoclonal Antibody (SN6), PE-Cyanine7, eBioscience™ # Art.-Nr.: 25-1057-42	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
Invitrogen Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), APC, eBioscience™ # Art.-Nr.: 17-4714-82	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
Invitrogen Mouse IgG1 kappa Isotype Control (P3.6.2.8.1), PE-Cyanine7, eBioscience™ # Art.-Nr.: 25-4714-80	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
Invitrogen™ eBioscience™ Fixierbarer Viabilitätsfarbstoff eFluor™ 780 # Art.-Nr.: 65-0865-14	ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pacific Blue™ anti-rat CD90/mouse CD90.1 (Thy-1.1) Antibody # Art.-Nr.: 202521	BioLegend, San Diego, USA
PE anti-human CD34 Antibody (Clone 581) # Art.-Nr.: 343505	BioLegend, San Diego, USA
PE Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl Antibody (MOPC-173), # Art.-Nr.: 400211	Bio-Legend, San Diego, USA
PerCP anti-mouse/human CD44 Antibody # Art.-Nr.: 103035	BioLegend, San Diego, USA

Tab. 21: PC-Software und Datenbanken

Bioanalyzer Software 2100 Expert für Windows	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Instrument Control and Evaluation (ICE) Software	Berthold Technologies GmbH & Co. KG
Microsoft® Word für Mac, Version 16.64	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft® Excel für Mac, Version 16.65	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft® PowerPoint für Mac, Version 16.64	Microsoft, Redmond, WA, USA
IBM SPSS, Version 27	Armonk, NY, USA
Graph Pad Prism, Version 9.1.2 for Mac	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
FlowJo® Software für Mac, Version 9.9.6	Tree Star Inc., Ashland, OR, USA
Image Lab™ 6.1. Software für Mac	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
qBase+ Software, Version 3.2. für Windows	Biogazelle, Gent, Belgien
VICTOR Nivo® Software Version 5.0	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA

Tab. 22: Verwendete Internetquellen

<ul style="list-style-type: none"> • ClinicalTrials.gov, U.S. National Library of Medicine (2022) https://clinicaltrials.gov/ct2/home letzter Zugriff am 26.11.2022 um 22:06 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • Clustal Omega, Multiple Sequence Alignment Program, European Bioinformatics Institute, EMBL-EMI, Hinxton, Cambridgeshire, UK, 2022 https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/ letzter Zugriff am 22.11.2022 um 11:47 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • GeneCards®: The Human Gene Database, Weitzmann Institute of Science, 2022 https://www.genecards.org letzter Zugriff am 10.12.2022 um 21:10 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • Mfold Web Server, The UNAFold Web Server, Version 3.6 (Zuker 2003) http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php letzter Zugriff am 22.11.2022 um 12:00 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • Nukleotid-Datenbank der National Library of Medicine, NCBI National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, 2022 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ letzter Zugriff am 22.11.2022 um 11:43 Uhr

<ul style="list-style-type: none"> • Primer3Plus von Andreas Untergasser und Harm Nijveen, 2007 (Untergasser et al. 2007): https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/ letzter Zugriff am 22.11.2022 um 11:52 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • SeqTrace Sequenzierungsprogramm (Stucky 2012), Version 0.9.0 für Windows https://bio.tools/seqtrace letzter Zugriff am 22.11.2022 um 13:29 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • Standard Nucleotide BLAST der National Library of Medicine, NCBI National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA, 2022: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome letzter Zugriff am 22.11.2022 um 12:02 Uhr
<ul style="list-style-type: none"> • Tm Calculator, Version 1.15.0, New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA, 2022 https://tmcalculator.neb.com/#!/main letzter Zugriff am 22.11.2022 um 13:26 Uhr

Tab. 23: Externe Labore

Herstellung Oligonukleotide	Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland
Sequenzierung nach Sanger	Microsynth SeqLab GmbH, Göttingen, Deutschland

9.2. Studienkollektiv (n = 16 Tiere)**Tab. 24: Auflistung der beprobten n = 16 Tiere.**

Es wurden pro Tier abdominales, retrobulbäres und subkutanes Fettgewebe entnommen und equine ASCs-_{EXP} und ASCs-_{SVF} gewonnen.

Tier- nummer	Rasse	Alter	Geschlecht	Art des Todes	Diagnose (sofern bekannt)
Pferd 1	Mini-Shetlandpony	5 Jahre	Wallach	Euthanasie	Kolik
Pferd 2	Pura Raza Española	1 Tag	Stute	Euthanasie	neonatale + orthopädische Erkrankung
Pferd 3	American Quarter Horse	5 Jahre	Wallach	Euthanasie	orthopädische + neurologische Erkrankung
Pferd 4	Fjordpferd	25 Jahre	Wallach	Schlachtung	-
Pferd 5	Islandpferd	23 Jahre	Wallach	Euthanasie	Kolik
Pferd 6	Warmblut	5 Jahre	Hengst	Schlachtung	-
Pferd 7	Deutsches Reitpony	5 Jahre	Hengst	Euthanasie	orthopädische Erkrankung
Pferd 8	American Quarter Horse	26 Jahre	Wallach	Schlachtung	-
Pferd 9	American Quarter Horse	14 Jahre	Stute	Schlachtung	-
Pferd 10	Warmblut	3 Monate	Stute	Euthanasie	orthopädische Erkrankung
Pferd 11	Warmblut	23 Jahre	Wallach	Euthanasie	Tumor- erkrankung
Pferd 12	Shire Horse	16 Jahre	Wallach	Euthanasie	Kolik
Pferd 13	Warmblut	13 Jahre	Stute	Euthanasie	Kolik
Pferd 14	Warmblut	14 Jahre	Wallach	Euthanasie	virale Infektions- erkrankung
Pferd 15	Shetlandpony	23 Jahre	Wallach	Euthanasie	Kolik
Pferd 16	Araber-Mix	12 Jahre	Wallach	Euthanasie	orthopädische Erkrankung

9.3. Zusammensetzung der Medien

Tab. 25: Basalmedium (B-M).

Basalmedium (B-M)	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	20%
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. 100 µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
HEPES	15 mM

Tab. 26: Expansionsmedium (E-M).

Expansionsmedium (E-M)	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	10%
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. 100 µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
HEPES	15 mM

Tab. 27: Serumversuch - Medienzusammensetzung.

Medien mit verschiedenen Serumzusätzen	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Chemikalien	Endkonzentration
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. 100 µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
HEPES	15 mM
+ jeweiliger Serumzusatz:	
Fetales Kälberserum <i>oder</i>	10% <i>oder</i>
Fetales Kälberserum <i>oder</i>	20% <i>oder</i>
Pferdeserum <i>oder</i>	10% <i>oder</i>
Fetales Kälberserum + Pferdeserum	10% + 10%

Tab. 28: Zusammensetzung des adipogenen Induktionsmediums (modifiziert nach Jurek et al. 2020).

adipogenes Induktionsmedium	
Grundmedium: DMEM mit 1 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Medium und Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	10 %
Glukose	10 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
HEPES	15 mM
Biotin	10 µM
Insulin	3 µg/ml
Dexamethason	0,3 µM
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	0,1 mM
Rosiglitazon	10 µM

Tab. 29: Zusammensetzung des adipogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Jurek et al. 2020).

adipogenes Differenzierungsmedium	
Grundmedium: DMEM mit 1 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Medium und Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	0 %
Glukose	10 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
HEPES	15 mM
Biotin	10 µM
Insulin	3 µg/ml
Ascorbinsäure	227 µM
bovines Serum-Lipid (BSL)	10 µl/ml

Tab. 30: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Alipour et al. 2015).

osteogenes Differenzierungsmedium	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Medium und Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	10 %
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
Dexamethason	0,1 µM
β-Glycerophosphat	10 mM
Ascorbinsäure	50 µM

Tab. 31: Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums (modifiziert nach Burk et al. 2013).

chondrogenes Differenzierungsmedium	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin	
Medium und Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum	0%
Glukose	25 mM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml bzw. µg/ml
Amphotericin B	2,5 µg/ml
TGF β3 ¹	10 ng/ml
ITS + Premix	1 %
Dexamethason	100 nM
Ascorbinsäure	100 µM
Prolin	400 µM

¹Das zuvor in einer Lösung mit DPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ und 0,1% BSL angesetzte TGF-β3 wurde bei den MW jeweils frisch hinzugegeben.

Tab. 32: Zusammensetzung des kardiomyogenen Differenzierungsmediums unter Einsatz des Induktionsfaktors 5-Azacytidin (5-AZA) (modifiziert nach Yang et al. 2012).

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (5-AZA)	
Grundmedium: DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin ¹	
Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum (FKS) ¹	10 %
Penicillin/Streptomycin ¹	100 U/ml bzw. 100 µg/ml
Amphotericin B ¹	2,5 µg/ml
HEPES ¹	15 mM
5-AZA	10 µM
¹ Expansionsmedium (E-M)	

Tab. 33: Zusammensetzung des modifizierten Basalmediums (MB-M).

Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Grundmedium: DMEM mit 1 g/l Glukose und 4 mM stabilem L-Glutamin ¹	
Chemikalien	Endkonzentration
Fetales Kälberserum (FKS) ¹	20 %
Glukose	10 mM
Penicillin/Streptomycin ¹	100 U/ml bzw. 100 µg/ml
Amphotericin B ¹	2,5 µg/ml
HEPES ¹	15 mM
¹ Basismedium (B-M)	

Tab. 34-38: Zusammensetzung des kardiomyogenen Differenzierungsmediums unter Einsatz der Induktionsfaktoren Activin A (Act A), knochenmorphogenetisches Protein-4 (BMP-4) und Dickkopf-1 (DKK-1) (modifiziert nach Protokollen für die Differenzierung pluripotenter Stammzellen von Laflamme et al. 2007; Uosaki et al. 2011):**Tab. 34: 1. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1)**

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (Act A, BMP-4 und DKK-1) 1. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll	
Grundmedium: Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Chemikalien	Endkonzentration
Act A	100 ng/ml
BMP-4	10 ng/ml
DKK-1	100 ng/ml

Tab. 35: 1. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1)

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (Act A, BMP-4 und DKK-1) 1. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll	
Grundmedium: Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Chemikalien	Endkonzentration
Act A	100 ng/ml
BMP-4	20 ng/ml
DKK-1	100 ng/ml

Tab. 36: 2. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1)

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (Act A, BMP-4 und DKK-1)	
2. Teilversuch, 1. Induktionsprotokoll	
Grundmedium: Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Chemikalien	Endkonzentration
Act A	0 ng/ml
BMP-4	50 ng/ml
DKK-1	150 ng/ml

Tab. 37: 2. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1)

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (Act A, BMP-4 und DKK-1)	
2. Teilversuch, 2. Induktionsprotokoll	
Grundmedium: Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Chemikalien	Chemikalien
Act A	100 ng/ml
BMP-4	50 ng/ml
DKK-1	150 ng/ml

Tab. 38: 2. Teilversuch, 3. Induktionsprotokoll (Act A, BMP-4, DKK-1)

Kardiomyogenes Differenzierungsmedium (Act A, BMP-4 und DKK-1)	
2. Teilversuch, 3. Induktionsprotokoll	
Grundmedium: Modifiziertes Basalmedium (MB-M)	
Chemikalien	Chemikalien
Act A	100 ng/ml
BMP-4	50 ng/ml
DKK-1	0 ng/ml

9.4. Färbeprotokolle

Tab. 39: Färbeablauf Nilrot- und DAPI-Färbung (adipogene Differenzierung).

Zeit bzw. Zyklen	Arbeitsschritt	Chemikalie
2x	Waschen	DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
60 min	Fixierung	Roti-Histofix (4%)
2x	Waschen	DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
5 min, im Dunkeln	Färbung der Lipide	Nilrot (1:100 Verdünnung mit DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
1x	Waschen	DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
5 min, im Dunkeln	Permeabilisierung	Triton-X-100 (0,5%)
1x	Waschen	DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺
5 min, im Dunkeln	Kernfärbung	DAPI (1:5000 Verdünnung mit DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺)
2x	Waschen	DPBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺

Tab. 40: Färbeablauf Von Kossa-Färbung (osteogene Differenzierung).

Zeit bzw. Zyklen	Arbeitsschritt	Chemikalie
2x	Waschen	DPBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
30 min	Fixierung	Roti-Histofix (4%)
2x	Waschen	VE-H ₂ O
45 min, unter Belichtung	Färbung der Kalziumablagerungen	Silbernitrat (5%)
3x	Waschen	VE-H ₂ O
3 min	Reduktion durch Pyrogallol	Pyrogallol (1%)
3x	Waschen	VE-H ₂ O
2 min	Fixierung	Natriumthiosulfat (5%)
3x	Waschen	VE-H ₂ O

Tab. 41: Färbeablauf Hämatoxylin-Eosin-Färbung (chondrogene Differenzierung).

Zeit bzw. Zyklen	Arbeitsschritt	Chemikalie
1x	Spülen	Aqua dest.
6 min	Kernfärbung	Hämatoxylin-Lösung
15 min	Spülen (Bläuen)	Fließendes Leitungswasser
2 min	Spülen	Aqua dest.
3 min	Gegenfärbung	Eosin-Lösung
1x	Abspülen	Leitungswasser
1x	Entwässern	Aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 100% Ethanol)
1x	Entwässern	Xylol
1x	Eindecken	Coverquick 2000 QPath Mounting Media

Tab. 42: Färbeablauf Alcianblau-Kernechtrot-Färbung gemäß Herstellerangaben der Fa. Morphisto GmbH (chondrogene Differenzierung).

Zeit bzw. Zyklen	Arbeitsschritt	Chemikalie
3 min	Vorbehandeln	Essigsäure (3%)
30 min	Färben	Alcianblau (1%)
3 min	Differenzieren	Essigsäure (3%)
10 min	Spülen	Aqua dest.
5 min	Gegenfärbung	Kernechtrot (0,1%)
1 min	Spülen	Aqua dest.
2x 2 min	Entwässern	96% Ethanol, vergällt mit 1% Methylethylketon (MEK)
2 min	Entwässern	Isopropanol (2-Propanol)
2x 5 min	Entwässern	Xylol
1x	Eindecken	ProTaq® PARAMount (w/o Xylene, Toluol)

9.5. Durchflusszytometrie (FACS)

Isotypkontrollen:

Tab. 43: Auflistung der für die Immunphäotypisierung eingesetzten Isotypkontrollen.

Isotypkontrolle	Klon	Fluorochrom	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus IgG2a, κ	OKT3	Biotin (B)	1:50	ThermoFisher Scientific Inc.
Maus IgG2a, κ	MOPC-173	Phycoerythrin (PE)	1:10	Bio-Legend
Maus IgG1, κ	P3.6.2.8.1	Phycoerythrin-Cyanine7 (PE-Cy7)	1:160	ThermoFisher Scientific Inc.
Maus IgG1, κ	P3.6.2.8.1	Allophycocyanin (APC)	1:50	ThermoFisher Scientific Inc.

Gating-Strategie:

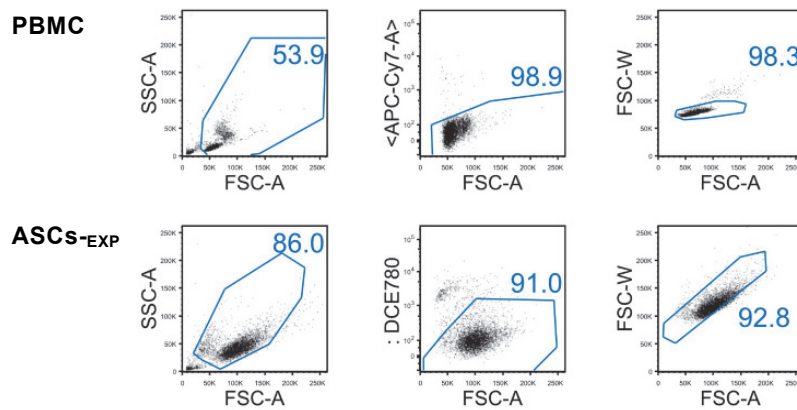


Abb. 37: Gating-Strategien zur Charakterisierung equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen und mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Durchflusszytometrie.

Die Gating-Strategie ist exemplarisch für die mittels des Explantat-Verfahrens aus abdominalem Fettgewebe beim Pferd gewonnenen ASCs-_{EXP} (*Bild unten*) sowie für PBMC als Positivkontrolle (*Bild oben*) im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung dargestellt. Gating ermöglicht das gezielte Auswählen der zu untersuchenden Subpopulation durch das Zeichnen einer Gate-Box (*blaues Gate*) im jeweiligen Dotplot und erhöht die Auflösung der erhobenen FACS-Daten. *Links*: Im FSC-A/SSC-A-Dotplot wurden zunächst die zu untersuchenden Zellen ausgewählt, um Zelldebris auszuschließen. *Mitte*: Es folgten der Totzellausschluss im FSC-A/DCE-Dotplot durch das gezielte Auswählen der vitalen Zellen (engl. live cells). *Rechts*: Letztendlich wurden im FSC-W/FSC-A-Dotplot Zelldupletten ausgeschlossen durch das „Gaten“ auf einzelne Zellen (engl. single cells). **Abkürzungen**: A: engl. Fläche, APC: Allophycocyanin, Cy7: Cyanin, DCE: engl. death cell exclusion, Totzellausschluss, FSC: engl. forward scatter, Vorwärtsstreulicht, K: Zahl x 1.000 gerechnet (d.h. 1K = 1000, 10K = 10.000 etc.), PBMC: engl. peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, SSC: engl. side scatter, Seitwärtsstreulicht, W: engl. width, Breite (d.h. die Dauer eines Signals).

9.6. Molekularbiologie

Auflistung der Primer

Tab. 44: Auflistung der für die SYBR Green RT-qPCR eingesetzten Primer.

Gen	GenBank/RefSeq	Gen ID	Primer-Name	Sequenz (5'-3')	Exon-Nr.	Intron-Länge	Produkt-Länge
ACTB	NM_001081838.1	100033878	ACTB_Ec_v1_s	GCCAACCGCGAGAAGATGAC	2	448	124
			ACTB_Ec_v1_as	AGTCCATCACGATGCCAGTG	3		
GAPDH	NM_001163856.1	100033897	GAPDH_Ec_v1_s	AAGAAGGTGGTGAAGCAGG	9	86	116
			GAPDH_Ec_v1_as	GCATCGAAGGTGGAAGAGTGGG	10		
RN18s	NW_019643269.1	100861557	RN18s_Ec_v1_s	ACTCACACGGGAAACCTCAC	1	0	122
			RN18s_Ec_v1_as	AACCAGACAAATCGCTCCAC	1		
OCT4/ POU5F1	XM_001490108	100050785	OCT4_Ec_v1_s	AGCAATTTGCCAAGCTCC	2	633	235
			OCT4_Ec_v1_as	GTCTCTGCTTTGCATATCTCC	3-4		
GATA4	XM_023636259.1	100065126	GATA4_Ec_v1_s	CAGAAAACGGAAGCCAAAGAAC	4	2747	218
			GATA4_Ec_v1_as	ACATCGCACTGACCGAGAAC	6		
TNNI3	NM_001081904.1	100034065	TNNI3_Ec_v1_s	TGGATGAGGAGAGATACGATG	6	547	101
			TNNI3_Ec_v1_as	CTTAAACTTGCCCCGAAGG	7		
MYH6	XM_023622391.1	111767446	MYH6_Ec_v1_s	GCGCATCGAGTTCAAGAAG	18	1254	188
			MYH6_Ec_v1_as	TGATACGCCCAAACCTCCTCC	19		
MYH7	NM_001081758	791234	MYH7_Ec_v1_s	TGAGAAGGGCAAAGGCAAG	15	385	129
			MYH7_Ec_v1_as	ATGATGCAACGCACGAAG	16		
DNMT3B	XM_023626323.1	100053900	DNMT3B_Ec_v1_s	ACTTGGTGATTGGTGGGAAGC	18	336	221
			DNMT3B_Ec_v1_as	ACACTCCAGGAACCGAGAGA	19		
MYC	XM_001497991.1	100068097	MYC_Ec_v1_s	CAGCGACTCTGAAGAAGAAC	1	1069	241
			MYC_Ec_v1_as	ACTGTCCAACCTTAGCCCTC	2		
NKX2-5	XM_005614765.3	100069632	NKX2-5_Ec_v1_s	AAGGACCCTCGAGGCGATAA	1	1508	247
			NKX2-5_Ec_v1_as	ACCAGATCTTGACCTGCGTG	2		
MYF6	NM_001317257.1	100050603	MYF6_Ec_v1_s	CAGCTACAGACCCAAGCAAGA	1	539	202
			MYF6_Ec_v1_as	AGGAGAGTTTGCCTCCTCC	3		

Tab. 45: Darstellung der Resultate der Effizienzanalyse und der optimalen Annealing- und Schmelztemperaturen im Rahmen der RT-qPCR-Etablierung.

Abkürzungen: log: Logarithmus, n.d.: nicht durchgeführt, pg: Pikogramm, T_a: Annealing-Temperatur, T_m: Schmelztemperatur.

Gen	Primer-Name	T _m	T _a berechnet	T _a Grad- Lauf	Steigung log	PCR Effizienz %	Bestimmtheits- maß r ²	Linearer Konzentrations- bereich in pg	T _m PCR- Produkt °C
<i>ACTB</i>	bActin_Ec_v1_s	62	55	n.d.	-3,300	101	0,9978	16 - 0,06	88
	bActin_Ec_v1_as	60							
<i>GAPDH</i>	GAPDH_Ec_v1_s	58	53	n.d.	-3,621	89	0,9931	16 - 0,06	89
	GAPDH_Ec_v1_as	61							
<i>RN18s</i>	18s_Ec_v1_s	60	53	n.d.	-3,314	100	0,9950	1 - 0,004	87
	18s_Ec_v1_as	58							
<i>OCT4/POUF5</i>	OCT4_Ec_v1_s	57	51	52	-3,430	96	0,989	1 - 0,004	88
	OCT4_Ec_v1_as	56							
<i>GATA4</i>	GATA4_Ec_v1_s	57	52	53	-3,549	91	0,9992	63 - 0,244	89
	GATA4_Ec_v1_as	61							
<i>TNNI3</i>	TNNI3_Ec_v1_s	56	51	51	-3,327	100	0,9957	16 - 0,06	83
	TNNI3_Ec_v1_as	57							
<i>MYH6</i>	MYH6_Ec_v1_s	57	52	n.d.	-3,410	96	0,9869	16 - 0,244	88
	MYH6_Ec_v1_as	60							
<i>MYH7</i>	MYH7_Ec_v1_s	59	52	51	-3,122	109	0,9975	4 - 0,015	87
	MYH7_Ec_v1_as	57							
<i>DNMT3B</i>	DNMT3B_Ec_v1_s	58	53	n.d.	-3,444	95	0,9864	4 - 0,015	86
	DNMT3B_Ec_v1_as	61							
<i>MYC</i>	MYC_Ec_v1_s	56	51	n.d.	-3,540	92	0,9905	4 - 0,004	89
	MYC_Ec_v1_as	57							
<i>NKX2-5</i>	NKX2-5_Ec_v1_s	61	55	n.d.	-3,496	93	0,9894	250 - 0,24	80
	NKX2-5_Ec_v1_as	60							
<i>MYF6</i>	MYF6_Ec_v1_s	60	55	n.d.	-3,400	97	0,9876	16 - 0,015	89
	MYF6_Ec_v1_as	60							

9.7. Resultate

9.7.1. Messung des Proliferationspotentials

Tab. 46: Auflistung der mithilfe des TC20™ Automated Cell Counters gemessenen Zellzahlen als Mittelwerte \pm SD.

Zellzahlen [$\times 10^3$; Mittelwert \pm SD]						
	abd-ASCs-EXP	abd-ASCs-SVF	rb-ASCs-EXP	rb-ASCs-SVF	sc-ASCs-EXP	sc-ASCs-SVF
Tag 0	Aussaat 30/Well					
Tag 3	156 \pm 143	98 \pm 77	60 \pm 33	82 \pm 65	124 \pm 86	102 \pm 83
Tag 4	202 \pm 218	174 \pm 120	81 \pm 20	138 \pm 84	125 \pm 68	133 \pm 121
Tag 5	332 \pm 199	326 \pm 109	140 \pm 31	223 \pm 108	360 \pm 222	366 \pm 202
Tag 6	646 \pm 427	417 \pm 59	211 \pm 94	335 \pm 227	453 \pm 369	423 \pm 330
Tag 7	815 \pm 609	443 \pm 124	235 \pm 177	314 \pm 188	456 \pm 372	609 \pm 460
Tag 8	770 \pm 359	451 \pm 165	305 \pm 163	404 \pm 197	533 \pm 350	482 \pm 156

Tab. 47: Auflistung der berechneten Populationsverdopplungszeiten (PDT) als Mittelwerte \pm SD.

Populationsverdopplungszeiten (in h) [Mittelwert \pm SD]						
	abd-ASCs-EXP	abd-ASCs-SVF	rb-ASCs-EXP	rb-ASCs-SVF	sc-ASCs-EXP	sc-ASCs-SVF
Tag 3	25,5 \pm 5,5	40,0 \pm 17,6	31,7 \pm 19,7	41,2 \pm 14,0	30,9 \pm 6,6	65,0 \pm 33,9
Tag 4	33,5 \pm 14,3	43,5 \pm 13,2	71,3 \pm 21,4	35,2 \pm 6,2	37,9 \pm 0,6	40,2 \pm 15,9
Tag 5	41,4 \pm 20,7	35,7 \pm 5,4	53,6 \pm 8,7	46,1 \pm 19,0	37,3 \pm 12,3	34,3 \pm 6,9
Tag 6	37,6 \pm 16,0	39,1 \pm 2,5	53,9 \pm 14,0	52,9 \pm 30,4	41,6 \pm 11,8	41,7 \pm 11,5
Tag 7	44,0 \pm 22,4	43,4 \pm 4,5	66,4 \pm 23,1	55,6 \pm 21,0	48,2 \pm 13,2	41,9 \pm 10,6
Tag 8	42,5 \pm 6,5	51,2 \pm 7,3	61,4 \pm 14,3	56,2 \pm 17,9	51,0 \pm 12,3	50,3 \pm 8,8
Tage 3-8 gesamt	40,8 \pm 16,6	42,4 \pm 5,4	58,4 \pm 13,3	52,3 \pm 22,4	43,5 \pm 12,0	46,2 \pm 13,9

9.7.2. Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASCs

9.7.2.1. Induktionsfaktor 5-Azacytidin

Tab. 48: RT-qPCR-Resultate des 5-AZA-Induktionsversuchs.

In den Versuch wurden in zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen $n = 5$ Donorperde einbezogen. Dargestellt sind die C_T -Werte (Messung in Triplets) als Mittelwerte \pm Standardabweichungen. **Abkürzungen:** GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ind: induziert mit 5-Azacytidin, IRC: interne Laufkontrolle, NK: Negativkontrolle, NRT: Non-Reverse Transkriptase, PK: Positivkontrolle, T0: Tag 0, T3: Zeitpunkt nach 3 Wochen (Tag 21).

Behandlung	OCT4/ POUF5	MYC	GATA4	NKX2.5	TNNI3	MYH6	MYH7	MYF6
T0	28,26 \pm 0,97	21,86 \pm 0,35	32,52 \pm 1,15	37,22 \pm 0,71	30,83 \pm 0,80	36,58 \pm 1,49	34,95 \pm 1,29	33,40 \pm 1,57
T3-NK	29,74 \pm 0,97	22,39 \pm 0,62	34,14 \pm 2,02	37,01 \pm 0,94	32,59 \pm 1,23	33,55 \pm 0,49	35,53 \pm 1,53	34,21 \pm 1,60
T3-ind	29,59 \pm 2,00	22,59 \pm 1,07	33,59 \pm 1,90	36,02 \pm 1,91	32,32 \pm 2,05	35,20 \pm 1,57	34,39 \pm 1,54	33,03 \pm 2,31
PK	28,53 \pm 0,50	21,70 \pm 0,30	26,83 \pm 0,27	30,50 \pm 0,15	16,28 \pm 0,36	18,03 \pm 0,20	18,65 \pm 0,53	20,85 \pm 0,45
NRT	34,85 \pm 2,34	33,85 \pm 1,71	36,70 \pm 1,00	35,30 \pm 0,00	32,23 \pm 0,59	35,10 \pm 3,53	34,70 \pm 0,46	38,00 \pm 4,11
H ₂ O	33,73 \pm 0,90	33,77 \pm 1,40	32,58 \pm 2,15	37,30 \pm 1,27	34,65 \pm 1,50	37,80 \pm 1,75	35,45 \pm 0,83	34,55 \pm 1,99
IRC- GAPDH	17,25 \pm 0,16	17,47 \pm 0,27	17,50 \pm 0,30	17,42 \pm 0,47	17,43 \pm 0,26	17,32 \pm 0,28	17,48 \pm 0,17	17,25 \pm 0,12

9.7.2.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1

Tab. 49: RT-qPCR-Resultate des kardiomyogenen Induktionsversuchs (1. Teilversuch) mit Act A, BMP-4 und DKK-1.

Es wurden $n = 5$ Donorpferde in zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen in den Versuch einbezogen. Die C_t -Werte (Messung in Triplets) werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen dargestellt. **Abkürzungen:** GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ind: induziert mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1, IRC: interne Laufkontrolle, NK: Negativkontrolle, NRT: Non-Reverse Transkriptase, PK: Positivkontrolle, T0: Tag 0, T3: Zeitpunkt nach 3 Wochen (Tag 21). * C_t -Wert > 40 .

Behandlung	OCT4/ POUF5	MYC	DNMT3B	GATA4	NKX2.5	TNNI3	MYH6	MYH7	MYF6
T0	28,77 \pm 0,53	20,85 \pm 0,61	29,65 \pm 0,68	34,05 \pm 1,29	37,28 \pm 0,70	31,76 \pm 0,91	36,52 \pm 1,31	35,66 \pm 1,22	35,66 \pm 1,58
T3-NK	29,50 \pm 0,95	22,38 \pm 1,01	30,50 \pm 1,05	35,05 \pm 1,19	36,38 \pm 1,33	32,74 \pm 1,20	36,40 \pm 1,21	35,24 \pm 1,31	36,27 \pm 0,97
T3-ind-1A	29,93 \pm 1,00	22,49 \pm 0,79	31,01 \pm 1,10	35,22 \pm 1,18	36,84 \pm 0,85	32,59 \pm 0,84	36,67 \pm 1,31	36,01 \pm 1,49	36,87 \pm 1,15
T3-ind-1B	29,67 \pm 0,87	23,03 \pm 1,97	31,14 \pm 0,67	35,37 \pm 1,25	37,85 \pm 0,64	32,49 \pm 0,74	37,71 \pm 0,74	35,78 \pm 1,02	36,69 \pm 1,20
PK	28,12 \pm 0,87	20,52 \pm 0,61	28,30 \pm 0,37	22,93 \pm 0,59	27,15 \pm 0,34	13,73 \pm 0,27	16,38 \pm 0,26	15,10 \pm 0,81	19,60 \pm 0,13
NRT	31,93 \pm 1,24	*	36,20 \pm 0,99	34,82 \pm 0,91	*	34,10 \pm 1,63	*	35,45 \pm 1,54	37,45 \pm 0,92
H ₂ O	34,68 \pm 1,10	*	36,30 \pm 0,42	35,60 \pm 1,07	*	*	*	36,20 \pm 0,00	38,20 \pm 0,00
IRC- GAPDH	17,63 \pm 0,24	17,80 \pm 0,41	17,55 \pm 0,25	17,53 \pm 0,25	17,32 \pm 0,17	17,57 \pm 0,34	17,40 \pm 0,42	17,48 \pm 0,22	17,42 \pm 0,19

Tab. 50: SYBR Green RT-qPCR-Resultate des kardiomyogenen Induktionsversuchs (2. Teilversuch) mit Act A, BMP-4 und DKK-1.

In zwei unabhängigen Versuchsdurchläufen wurden $n = 5$ Donortiere in den Versuch einbezogen. Die in Triplets gemessenen C_t -Werte werden als Mittelwerte \pm Standardabweichungen aufgelistet. **Abkürzungen:** GAPDH: Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, ind: induziert mit Activin A, knochenmorphogenetischem Protein-4 und Dickkopf-1, IRC: interne Laufkontrolle, NK: Negativkontrolle, NRT: Non-Reverse Transkriptase, PK: Positivkontrolle, T0: Tag 0, T3: Zeitpunkt nach 3 Wochen (Tag 21). * C_t -Wert > 40 .

Behandlung	OCT4/ POUF5	MYC	DNMT3B	GATA4	NKX2.5	TNNI3	MYH6	MYH7	MYF6
T0	29,41 \pm 1,45	22,16 \pm 0,77	27,97 \pm 0,44	31,76 \pm 2,27	37,06 \pm 1,04	30,44 \pm 0,70	35,54 \pm 1,62	34,00 \pm 1,07	33,92 \pm 1,36
T3-NK	29,90 \pm 1,16	23,05 \pm 1,45	28,40 \pm 1,31	32,57 \pm 1,23	37,20 \pm 0,00	32,85 \pm 1,21	36,17 \pm 1,09	34,80 \pm 1,25	35,30 \pm 1,87
T3-ind-2A	30,71 \pm 1,53	23,50 \pm 0,76	28,89 \pm 1,31	34,17 \pm 1,77	38,05 \pm 0,49	33,41 \pm 1,52	36,23 \pm 1,34	35,06 \pm 1,45	37,13 \pm 1,21
T3-ind-2B	29,88 \pm 1,13	23,42 \pm 1,24	28,92 \pm 0,64	34,54 \pm 2,13	37,60 \pm 0,42	34,26 \pm 1,80	*	35,87 \pm 1,50	35,39 \pm 1,57
T3-ind-2C	30,31 \pm 1,64	22,89 \pm 0,34	28,79 \pm 0,90	33,34 \pm 1,92	37,50 \pm 1,01	32,55 \pm 1,97	35,76 \pm 1,57	35,20 \pm 1,32	35,32 \pm 1,70
PK	29,48 \pm 0,33	22,47 \pm 0,86	28,63 \pm 0,44	26,57 \pm 0,38	30,52 \pm 0,53	15,25 \pm 0,33	17,90 \pm 0,30	17,82 \pm 0,37	20,50 \pm 0,29
NRT	35,12 \pm 1,14	*	34,98 \pm 1,50	34,37 \pm 1,03	*	*	38,00 \pm 0,00	36,97 \pm 1,93	36,80 \pm 0,00
H ₂ O	35,70 \pm 1,41	37,90 \pm 0,00	36,90 \pm 0,00	36,08 \pm 1,65	38,55 \pm 0,07	*	*	36,50 \pm 0,00	37,50 \pm 0,00
IRC-GAPDH	17,40 \pm 0,28	17,50 \pm 0,37	17,28 \pm 0,30	17,68 \pm 0,12	17,68 \pm 0,31	17,08 \pm 0,26	17,33 \pm 0,21	17,18 \pm 0,28	17,35 \pm 0,29

9.8. Vorversuch

9.8.1. Material und Methoden

Es wurden $n = 20$ Pferde in den Vorversuch einbezogen (Auflistung der beprobten Tiere, **Kap. 9.8.4., Tab. 51.**), die entweder *post mortem* nach Euthanasien oder intraoperativ im Rahmen von regulär an der Klinik für Pferde der FU Berlin durchgeführten Operationen (Kolikoperationen, E nukleationen des Augapfels und Kastrationen) beprobt wurden. Abdominales (abd), retrobulbäres (rb) und subkutanes (sc) Fettgewebe wurden entnommen sowie zusätzlich inguinale (ing) Fettgewebe im Rahmen von Kastrationen. Neben dem Kollagenaseverdau und der direkten Explantation des Fettgewebes (Protokolle zur Isolierung siehe **Kap. 3.3.1.**) wurden zwei weitere Isolierungsverfahren untersucht, die sog. Ceiling (C)- und modifizierte Ceiling (MC)-Kultur, bei denen gegenüber den erstgenannten Verfahren dedifferenzierte Fettzellen (engl. dedifferentiated fat cells, DFAT) anstelle von ASCs gewonnen wurden. Bei der Ceiling-Kultur wurde nach dem Kollagenaseverdau und der Zentrifugation ($260 \times g$, RT, 5 min, Beschleunigung 2, Bremse 0) der Überstand in 25 cm^2 Zellkulturflaschen überführt. Die Zellkulturflaschen wurden maximal mit Basismedium (B-M) aufgefüllt und mit der Wachstumsfläche nach oben für sieben Tage inkubiert, um ein Anheften und eine Dedifferenzierung der im Überstand befindlichen muren Adipozyten zu ermöglichen. Nach dem ersten Mediumwechsel (MW) an Tag 7 erfolgte die weitere Inkubation mit der Wachstumsfläche nach unten. Bei der Modified Ceiling-Kultur wurden die nach Kollagenaseverdau und Zentrifugation im $100 \mu\text{m}$ -Zellfilter befindlichen angedauten Fettgewebestücke in 6-Well Zellkulturtestplatten (Fa. TPP Techno Plastic Products AG) überführt und in 5 ml B-M pro Well inkubiert. DFAT-Zellen wuchsen aus und hefteten sich i.d.R. nach drei bis sieben Tagen am Boden der Zellkulturtestplatten an. Ein erster MW erfolgte frühestens an Tag 5. Die Zellfilter wurden an Tag 7 entfernt. Die Untersuchung des Isolierungserfolgs erfolgte gemäß dem Protokoll in **Kap. 3.3.2.** Die weitere Kultivierung der mittels des Ceiling-Verfahrens gewonnenen DFAT_C und der mittels des Modified Ceiling-Verfahrens gewonnenen DFAT_{MC} fand analog zur Kultivierung der ASCs_{SVF} und ASCs_{EXP} statt (**Kap. 3.3.1.** und **Kap. 3.3.3.**).

9.8.2. Ergebnisse

Bei der Untersuchung des Isolierungserfolgs der equinen ASCs_{SVF}, ASCs_{EXP}, DFAT_C und DFAT_{MC}-Zellen erwies sich der Isolationsmethodeeffekt als statistisch signifikant ($p = 0,004$). Es zeigte sich, dass die Ceiling-Methode gegenüber den anderen Isolationsmethoden einen signifikant niedrigeren Isolierungserfolg aufwies (ASCs_{EXP} vs. DFAT_C: $p < 0,001$, ASCs_{SVF} vs. DFAT_C: $p = 0,002$, DFAT_{MC} vs. DFAT_C: $p < 0,001$). Bei 10 von 11 der beprobten Tiere (90,91%) konnten keine DFAT_C Zellen isoliert werden. Demgegenüber erwies sich der

Lokalisationseffekt als nicht statistisch signifikant ($p = 0,22$). Es ist hier allerdings zu berücksichtigen, dass im Rahmen der Vorversuche jeweils von nur $n = 1$ Tier ing- und sc-Fettgewebe entnommen wurden. Die Resultate sind in **Abb. 38** dargestellt.

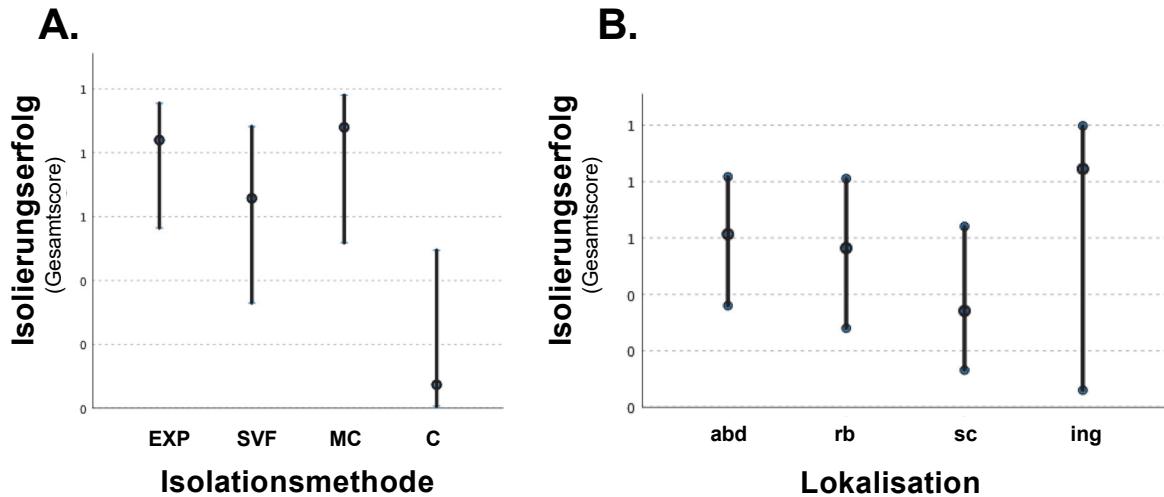


Abb. 38: Isolierungserfolg der mittels verschiedener Isolierungsmethoden von unterschiedlichen Fettgewebelokalisationen gewonnenen ASCs und DFAT-Zellen.

Abdominales (abd), retrobulbäres (rb), subkutanes (sc) und inguinales (ing) Fettgewebe wurde von $n = 20$ Tieren entnommen. Nach Kollagenaseverdau (SVF) und mittels des Explantat (EXP)-Verfahrens wurden ASCs und mittels des Modified Ceiling- (MC) bzw. Ceiling-(C) Verfahrens DFAT-Zellen gewonnen. Mithilfe eines binären Punktevergabesystems wurden für jede Isolierung 0 Punkte für nicht anwachsende Zellen (Isolierung nicht erfolgreich) oder 1 Punkt für anwachsende Zellen vergeben (Isolierung erfolgreich). **A.** Der Isolierungserfolg (Gesamtpunktezahl) ist pro Isolationsmethode dargestellt. **B.** Der Isolierungserfolg ist für die verschiedenen Fettgewebelokalisationen aufgezeigt.

9.8.3. Schlussfolgerungen

Im Vorversuch zeigte sich, dass die Ceiling-Kultur kein für die Generierung von equinen DFAT_C-Zellen geeignetes Verfahren darstellt, weshalb im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter auf diese Isolierungsmethode eingegangen wurde. Demgegenüber erwiesen sich die EXP-, SVF- und MC-Methode als für die Isolierung von equinen ASCs_{EXP}, ASCs_{SVF} sowie DFAT_{MC} Zellen gleichermaßen geeignet. Um die Versuche einzugrenzen, sollten die nachfolgenden Experimente ausschließlich mit ASCs_{EXP} und ASCs_{SVF} der abd-, rb- und sc-Lokalisation durchgeführt werden. Dies lag auch in der Annahme begründet, dass sich gemäß Jumabay und Bostrom (2015) DFAT-Zellen erst nach einem weiteren Schritt in Präadipozyten umwandeln (Jumabay und Bostrom 2015) und dieser Zwischenschritt womöglich in einem nachteiligen kardiomyogenen Differenzierungspotential der DFAT-Zellen gegenüber ASCs resultieren könnte. Kou et al. (2014) beschrieben, dass DFAT-Zellen ein niedrigeres osteogenes Differenzierungspotential aufweisen und nicht die Fähigkeit besitzen, in Endothelzellen zu differenzieren. Sie vermuteten, dass das multipotente Differenzierungspotential der DFAT-Zellen aufgrund ihrer Gewebespezifität begrenzt sein

könnte (Kou et al. 2014). Dass ASCs ein höheres Differenzierungspotential aufweisen, wurde jedoch von Watson et al. (2014) widerlegt (Watson et al. 2014). In den meisten Pferdestudien wurde sc-Fettgewebe als Herkunftsquelle für Präadipozyten gewählt (**Kap. 5.2.**). Neben diesem sollte eine hinsichtlich des Differenzierungspotentials weniger gut erforschte Lokalisation, das equine abd-Fettgewebe (Metcalf et al. 2016; Arnhold et al. 2019), einbezogen werden sowie eine für die Isolierung equiner Präadipozyten zuvor noch nicht erforschte Lokalisation, das rb-Fettgewebe (Trachsel et al. 2022). Da innerhalb der Vorversuche pro Tier zumeist nur Zellen einer Fettgewebelokalisation entnommen wurden und bei den intraoperativ beprobten Tieren auch nicht von Seiten der Pferdebesitzer die Möglichkeit bestanden hätte, Fettgewebe bei einem Pferd aus allen vier Lokalisationen zu entnehmen, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit die Probenentnahme ausschließlich *post mortem* erfolgen.

9.8.4. Studienkollektiv ($n = 20$ Tiere)Tab. 51: Auflistung der im Vorversuch beprobten $n = 20$ Tiere (1. Teil).

Tier	Rasse	Alter (Jahre / Monate / Tage)	Ge- schlecht	Diagnose (sofern bekannt)	Fettgewebeeentnahme		Isolationserfolg Legende: + erfolgreich, - nicht erfolgreich, o nicht durchgeführt.			
					Zeitpunkt (Art des Todes / OP)	Loka- lisation	C	EXP	MC	SVF
Pferd 1	Warmblut	0 / 4 / 20	Hengst	Volvolus nodosus	post mortem (Euthanasie)	abd	o	-	o	o
Pferd 2	Warmblut	15 / 5 / 1	Stute	Zaekumobstipation	post mortem (Euthanasie)	abd	o	+	o	o
Pferd 3	Warmblut	16 / 8 / 10	Wallach	Torsio coli, Obstipatio Colon ascendens, Zaekummeteorismus	intraoperativ (Laparotomie)	abd	-	+	+	+
Pferd 4	Haflinger	24 / 7 / 16	Stute	Lipoma-pendulans- Strangulation, Anteflexio mit Volvolus coli, Obstipation und Meteorismus Colon ascendens	intraoperativ (Laparotomie)	abd	-	+	+	+
Pferd 5	Warmblut	13 / 4 / 23	Wallach	chronisch-aktive, erosiv- ulzerative Enteritis mit sekundärer Peritonitis, peritoneale Adhäsionen im Abdomen	post mortem (Euthanasie)	abd	-	-	+	-
Pferd 6	American Quarter Horse	9 / 1 / 3	Wallach	Foramen epiploicum	intraoperativ (Laparotomie)	abd	-	-	-	-
Pferd 7	Appaloosa	12 / 7 / 28	Wallach	-	intraoperativ (Kastration)	ing	-	+	+	+
Pferd 8	Isländer- Mix	15 / 6 / 16	Wallach	Meteorismus coli	post mortem (Euthanasie)	abd	+	+	+	+
Pferd 9	Nieder- ländisches Warmblut	15 / 3 / 31	Wallach	stromale Keratitis OS (V.a. IMMK, Ablösung der Descemetischen Membran), Hornhauttrübung	intraoperativ (Enukleation)	rb	-	+	+	-
Pferd 10	American Quarter Horse	17 / 1 / 4	Stute	Temporohyoid Osteoarthropathie mit Fraktur des Os temporale	post mortem (Euthanasie)	rb	-	+	+	+

Tab. 51: Auflistung der im Vorversuch beprobten $n = 20$ Tiere (2. Teil).

Tier	Rasse	Alter (Jahre / Monate / Tage)	Ge- schlecht	Diagnose (sofern bekannt)	Fettgewebeeentnahme		Isolationserfolg Legende: + erfolgreich, - nicht erfolgreich, o nicht durchgeführt.			
					Zeitpunkt (Art des Todes / OP)	Loka- lisation	C	EXP	MC	SVF
Pferd 11	Warmblut	18 / 2 / 11	Wallach	Kolik unbekannter Genese	intraoperativ (Laparotomie)	abd	-	-	+	-
Pferd 12	Deutsches Reitpony	10 / 2 / 25	Stute	chronische Hufrehe mit Hufbeinsenkung (hgrd.)	post mortem (Euthanasie)	abd + rb	- -	- -	- -	- -
Pferd 13	Vollblut	17 / 8 / 19	Stute	West-Nil-Virus-Infektion	post mortem (Euthanasie)	rb	-	-	-	-
Pferd 14	Selle Français	2 / 3 / 28	Hengst	Verlagerung des Colon ascendens in den Milz- Nieren-Raum, Meteorismus coli et caeci, Serositis des Colon ascendens, Hufbeinfraktur	intraoperativ (Laparotomie)	abd	o	-	-	o
Pferd 15	Warmblut	8 / 3 / 21	Wallach	Rechtsdorsalverlagerung des Colon ascendens	intraoperativ (Laparotomie)	abd	o	-	-	o
Pferd 16	Warmblut	0 / 9 / 12	Stute	TH6-Trümmerfraktur mit Paraplegie	post mortem (Euthanasie)	abd	o	-	+	+
Pferd 17	Rheinisch- deutsches Kaltblut	12 / 7 / 9	Stute	Rechtsdorsalverlagerung des Colon ascendens, Torsio coli (180°)	post mortem (Euthanasie)	abd	o	-	+	+
Pferd 18	Isländer	unbe- kannt	Wallach	V.a. Plattenepithelkar- zinom am Penis, Dysurie	post mortem (Euthanasie)	abd	o	+	o	-
Pferd 19	Warmblut	7 / 8 / 23	Wallach	palmare Osteochondrose (POD)	post mortem (Euthanasie)	abd	o	+	o	-
Pferd 20	Warmblut	0 / 1 / 8	Hengst	Septische Arthritis, V.a. Septikämie	post mortem (Euthanasie)	rb + sc	o o	+	+	- -

Publikationen

Stage, H.J.; Trappe, S.; Söllig, K.; Trachsel, D.S.; Kirsch, K.; Zieger, C.; Merle, R.; Aschenbach, J.R.; Gehlen, H. Multilineage Differentiation Potential of Equine Adipose-Derived Stromal/Stem Cells from Different Sources. *Animals* 2023, 13, 1352. <https://doi.org/10.3390/ani13081352>

Trachsel, D.S.*; Stage, H.J.*; Rausch, S.; Trappe, S.; Söllig, K.; Sponder, G.; Merle, R.; Aschenbach, J.R.; Gehlen, H. (2022): Comparison of Sources and Methods for the Isolation of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells and Preliminary Results on Their Reaction to Incubation with 5-Azacytidine. *Animals* 2022, 12, 2049. <https://doi.org/10.3390/ani12162049>; *Geteilte Erstautorenschaft.

Posterpräsentationen

Stage HJ, Trachsel DS, Aschenbach JR, Merle R, Rausch S, Söllig K, Sponder G, Trappe S, Gehlen H (2022): „Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials equiner ASC nach Behandlung mit Aktivin A, BMP4 und DKK-1“. In: 5. Internationaler Kongress zur Pferdemedizin/DVG-Service GmbH: DVG-Vet Congress, Berlin, Estrel Congress Center, Verlag der DVG Service GmbH, 1: 171-173, ISBN 978-3-86345-643-6.

Stage HJ, Trachsel DS, Aschenbach JR, Rausch S, Trappe S, Söllig K, Sponder G, Merle R, Gehlen H: (2022) „Effekt von 5-Azacytidin auf das kardiomyogene Differenzierungspotential equiner Präadipozyten“. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere*, 2022; 50: S1–S4. DOI 10.1055/s-0042-1744095.

Danksagung

Ich danke **Frau Prof. Dr. Heidrun Gehlen** für die Überlassung des spannenden und hoch aktuellen Promotionsthemas und die Möglichkeit, diese Arbeit an der Klinik für Pferde der Freien Universität Berlin anzufertigen. Sie haben mich während meiner Promotionszeit sehr unterstützt und hatten immer ein offenes Ohr für Fragen. Herzlichen Dank dafür sowie für die stets zügigen Korrekturen.

Herrn Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach danke ich besonders für die freundliche Aufnahme am Institut für Veterinär-Physiologie. Sie haben mir dort nicht nur einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt, sondern durch Ihren wissenschaftlichen Input aus der Veterinärphysiologie stets das Projekt vorangetrieben. Herzlichen Dank.

Frau **PD Dr. Roswitha Merle** danke ich herzlich für die ausgesprochen freundliche Unterstützung bei statistischen Fragen und dafür, dass ich meine Freude an der Mathematik wiederentdeckt habe.

Frau **Dr. Dagmar S. Trachsel, PhD** gilt vor allem in der Anfangsphase meiner Promotion mein Dank. Durch Deine Initiative wurden die ersten Induktionsversuche geplant und durchgeführt und durch den regelmäßigen Austausch fühlte ich mich gut unterstützt.

Ohne die Einarbeitung in die labortechnischen Arbeiten, Unterstützung und intensive Zusammenarbeit mit **Susanne Trappe** und **Katharina Söllig** wäre die Forschungsarbeit so nicht möglich gewesen. Euch beiden danke ich dafür, dass Ihr mir bei labortechnischen Fragen immer hilfreich zur Seite standet. In diesem Zusammenhang möchte ich auch **Tabea Ockler** und **Herrn Dr. Gerhard Sponder** für seinen wissenschaftlichen Rat danken.

Für die ausführliche Einarbeitung ins FACS-Gerät und die Unterstützung bei der Auswertung der Daten danke ich sowohl **Herrn Dr. Sebastian Rausch** als auch **Frau Yvonne Weber** aus dem Institut für Immunologie der FU Berlin.

Dem **Institut für Tierpathologie** möchte ich für die hilfreiche und freundliche Unterstützung beim Bearbeiten der Proben danken, insbesondere **Frau Cornelia Zieger**.

Dem gesamten **Team der Pferdeklunik** danke ich dafür, dass Ihr mir mit Euren Anrufen zu jeder Tages- und Nachtzeit die Probenentnahme ermöglicht habt.

Des Weiteren danke ich **Frau Prof. Dr. Janina Burk** für die guten Ratschläge im Bereich der Stammzellforschung.

Auch bei **Frau Dr. Katharina Kirsch** möchte ich mich für die Unterstützung bei den tripotenten Differenzierungsversuchen bedanken.

Dem **Department of Veterinary Clinical Sciences Section of Large Animal Medicine and Surgery der Universität Kopenhagen** danke ich für die Bereitstellung von Herz- und Muskelgewebeproben und dem **Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité Berlin** für die Kooperation, allen voran **Herrn Burak Boyraz**.

Des Weiteren gilt mein Dank den **Mitarbeitern verschiedener Schlachthöfe**, bei denen ich Fettgewebeproben vom Pferd entnehmen konnte.

Die Promotionsarbeit wurde durch das **Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlins** gefördert, wofür ich sehr dankbar bin.

Last but not least danke ich meiner **Familie und Freunden**, die mir während meiner Promotionszeit immer motivierend zur Seite gestanden haben, allen voran meinen Eltern.

Förderung der Promotionsarbeit

Diese Arbeit wurde durch das **Elsa-Neumann-Stipendium des Landes Berlins** (Dezember 2020 – Januar 2023) finanziell unterstützt.

Erklärung Interessenskonflikt

Hiermit erkläre ich, dass zu den Inhalten der vorliegenden Arbeit kein Interessenskonflikt vorliegt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Hannah Julia Stage, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel *„Charakterisierung equiner multipotenter mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe und Untersuchung des kardiomyogenen Differenzierungspotentials“* nach den Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 31.10.2023

Hannah Julia Stage



9 783967 292329

mbvberlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-232-9