

**Immunmodulatorische Fähigkeiten von
aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten:
Bedeutung für die Zellersatztherapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Markus Christoph Degenhardt
aus Essen

2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. P. Knüfermann
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Meyer

Tag der Mündlichen Prüfung: 05.05.2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Epidemiologie des Myokardinfarktes.....	8
1.2 Ein- und Zwei-Hit-Modell des Myokardinfarktes.....	8
1.3 Prä- und Postkonditionierung als neue Therapieoptionen	9
1.4 Hauptakteure im postinfarkt Geschehen	9
1.5 Angeborene Immunität und Toll-like-Rezeptoren.....	10
1.6 Kardiale Expression von Toll-like-Rezeptoren	11
1.7 Zellersatztherapie als weitere Therapieoption.....	12
1.8 Arbeitshypothesen und Ziele der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Versuchsabläufe.....	15
2.2 α -PIG Zellen	16
2.2.1 Zellkultur von α -PIG Stammzellen.....	17
2.2.2 Differenzierung und Selektionierung der α -PIG Kardiomyozyten.....	19
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	22
2.2.4 Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten	23
2.3 Andere Zellkulturen	23
2.3.1 Mischkulturen	23
2.3.2 Primäre embryonale Kardiomyozyten	24
2.3.3 THP-1 Zellen	25
2.4 RNA Isolation.....	25
2.5 RNA Konzentrationsbestimmung	26
2.6 RNA Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese	27
2.7 cDNA Synthese	28
2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.8.1 Allgemeiner Teil.....	29
2.8.2 Quantitative Real-Time-PCR.....	30

2.8.3	Statistische Auswertung der PCR	32
2.9	Immunfluoreszenzfärbung	33
2.10	Material	34
2.10.1	Zellbiologische, molekularbiologische und histologische Materialien.....	34
2.10.2	Sonstige molekularbiologische Materialien	35
2.10.3	Zellreihen und Mäuse	37
2.10.4	Geräte und Software	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	LPS Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten	39
3.1.1	Rezeptorenstatus der α -PIG Kardiomyozyten.....	39
3.1.2	Zytokinanalyse der α -PIG Kardiomyozyten	41
3.2	LPS-Stimulation der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur	42
3.2.1	Rezeptorenstatus der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur	43
3.2.2	Zytokinanalyse der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur.....	43
3.3	Hypoxie-Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten	45
3.4	Kombination von LPS Stimulation und Hypoxie	47
3.5	Verändertes Verhalten der α -PIG Kardiomyozyten in Anwesenheit von Immunzellen	48
3.6	VEGF-A	51
3.7	Vergleich zu primärer Kardiomyozytenkultur	52
3.7.1	Immunfluoreszenzfärbung primäre Zellkultur	52
3.7.2	LPS Stimulation primärer Zellkultur	55
4.	Diskussion	57
4.1	Das Modell der α -PIG Kardiomyozyten	57
4.2	LPS und Hypoxie als Entzündungsinduktoren	59
4.2.1	LPS-Stimulation von α -PIG Kardiomyozyten.....	60
4.2.2	Hypoxie an α -PIG Kardiomyozyten	61
4.3	Kokultur Stimulationen.....	63
4.4	VEGF	64
4.5	Schlussfolgerung und Perspektiven	65

5.	Zusammenfassung.....	67
6.	Anhang	69
7.	Abbildungsverzeichnis	84
8.	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung.....	95

Abkürzungsverzeichnis

α-MHC	<i>α-myosin heavy chain</i>
BMSC	<i>Bone marrow stem cell</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CT-Wert	<i>Circle Threshold-Wert</i>
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EB	<i>Embryoid body</i>
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ESZ	Embryonale Stammzelle
FCS	Fötales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLUT	Glukosetransporter
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
IPS	Induzierte pluripotente Stammzelle
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbecco Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MW	Mittelwert
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
ODD	<i>Oxygen-dependent degradation domains</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PECAM	<i>Platelet/Endothelial cell adhesion molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGK-Promotor	Phosphoglycerat-Kinase Promotor

PBS	<i>Phosphat-Buffered Saline</i>
PTCA	Percutane transluminale Koronarangioplastie
RPMI Medium	Roswell Park Memorial Institute Medium
RQ-Wert	Relativer Quantifikations-Wert
RT-qPCR	Quantitative Real-Time PCR
SD	<i>Standard deviation</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrose Faktor- α
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie des Myokardinfarktes

Die häufigsten Todesursachen Erwachsener in Industrienationen sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere die koronare Herzkrankheit (KHK). Hierbei treten Mangeldurchblutungen des Herzens infolge verengter Herzkranzgefäße auf, die mit dem Myokardinfarkt als akuter Komplikation einhergehen. Die Inzidenz des Myokardinfarktes (Infarktereignisse/100.000 Einwohner/Jahr) weist große geographische Unterschiede auf. So liegt sie für Japan bei weniger als 100, für Deutschland oder Nordamerika um 300 und für Schottland oder Finnland bei über 500 (Herold, 2010). 2011 verstarben Deutschlandweit 162,8 Menschen / 100.000 Einwohner an ischämischen Herzerkrankungen, 67,9 / 100.000 Einwohnern an einem akuten Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt, 2012).

Während der ersten 48 Stunden nach Infarkt versterben bis zu 40 % der Patienten, wobei als häufigste Ursache des kardiogenen Schocks Kammerflimmern gefolgt von Pumpversagen zu finden ist. Als Spätkomplikation (später als 48 Stunden nach Infarkt) ist besonders das Herzwandaneurysma (bei bis zu 20 % aller Infarktpatienten) mit Folgen wie Embolie, Linksherzinsuffizienz, Rhythmusstörungen oder Ruptur mit Herzbeutelamponade zu nennen.

1.2 Ein- und Zwei-Hit-Modell des Myokardinfarktes

In der klassischen Vorstellung des Myokardinfarkts wird ein Gefäßverschluss mit konsekutiver Ischämie des zu versorgenden Myokards beschrieben. Die Folgen sind Schädigung sowie Funktionsverlust des Herzens. Die logische und lebensnotwendige Therapie besteht in der Wiedereröffnung des Verschlusses. Im klinischen Alltag steht hierfür die akute perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) zur Verfügung, durch deren Einsatz eine *Restitutio ad integrum* oder zumindest die Reduktion der Schädigung und des Funktionsverlustes erreicht werden soll. Mittlerweile ist allerdings bekannt, dass dieses vereinfachte 1-Hit-Modell, das nur den primären Schaden (1. Hit)

berücksichtigt, den komplexen Abläufen eines Infarktgeschehens nicht gerecht wird. So konnte gezeigt werden, dass die durch die PTCA induzierte Reperfusion ihrerseits als sekundäres Ereignis (2. Hit) die Schädigung und den Funktionsverlust zusätzlich verstärken kann (Prasad et al., 2009). In diesem 2-Hit Modell ist daher eine zusätzliche Therapie nötig, um ein möglichst gutes Behandlungsergebnis zu erreichen.

1.3 Prä- und Postkonditionierung als neue Therapieoptionen

Als bisher am besten untersuchte adjunktive Therapiestrategie ist die Präkonditionierung etabliert worden. Präkonditionierung bezeichnet ein Vorgehen, bei dem durch kurze Reize Prozesse eingeleitet werden, die vor den Folgen eines späteren Schadensereignisses ähnlicher Art schützen können (Sanada et al., 2011). Als Präkonditionierungsphänomen kann auch der geringere Infarktschaden, der bei Patienten mit länger bestehender Angina Pectoris nach einem Herzinfarkt beobachtet wird, erklärt werden (Ishihara et al., 1997). Mittlerweile ist die Präkonditionierung, sei sie ischämischer oder auch pharmakologischer Natur, experimentell ausführlich untersucht worden. Großer Nachteil der Präkonditionierung ist allerdings ihre beschränkte Anwendbarkeit im klinischen Alltag, da ein Infarktgeschehen beim Patienten in der Regel nicht vorhersehbar ist. Die Präkonditionierung ist daher aktuell beispielsweise im Rahmen von geplanten kardiochirurgischen Eingriffen möglich (Meybohm et al., 2012). Eine weitere Therapieoption stellt die Postkonditionierung dar. Diese Therapie ist ebenfalls experimentell in extenso beschrieben (Staat et al., 2005; Thibault et al., 2008) und kann pharmakologischer als auch hypoxischer Natur sein. Eine Übertragung der Postkonditionierung in die klinische Anwendung steht derzeit noch in den Anfängen.

1.4 Hauptakteure im Postinfarkt-Geschehen

Die Suche nach weiteren Therapieoptionen hat zu einem genaueren Verständnis der beschriebenen schädigenden Prozesse (Ischämie und Reperfusion), sowie von Mechanismen der Prozessmodulationen (Prä- und Postkonditionierung) geführt. Die

entsprechenden Untersuchungen haben Hauptakteure, welche an allen genannten Prozessen beteiligt sind, geliefert. Von besonderer Bedeutung sind demnach die Toll-like Rezeptoren (TLR) aus der Familie der Mustererkennungsrezeptoren (Ehrentraut et al., 2011; Kim et al., 2007). Diese spielen sowohl für die im Rahmen eines Herzinfarktes im Myokard ablaufenden Entzündungsprozesse als auch für die Funktion von Zellen der angeborenen Immunität eine zentrale Rolle.

1.5 Angeborene Immunität und Toll-like-Rezeptoren

Körperfremde Pathogene werden von sogenannten Mustererkennungsrezeptoren erkannt (Medzhitov und Janeway, 2000). TLRs stellen eine Untergruppe der Mustererkennungsrezeptoren dar. Der Name „Toll-like“ ist vom erstmalig in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifizierten Protein Toll abgeleitet. Toll steuert dort die dorsoventrale Polarisierung in der Ontogenese und ist in der adulten Fliege Bestandteil eines einfachen Immunsystems zur Erkennung von fungalen Proteinen (Anderson et al., 1985; Anderson 2000; Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996). Die zytoplasmatischen Domänen von Toll weisen Sequenzhomologien zu humanen Interleukin-1-Rezeptoren auf (Gay und Keith, 1991), desweiteren induzieren beide Signalkaskaden, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus der NF- κ B-Familie führen (Belvin und Anderson, 1996) – eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die bei der Induktion von Immunantworten bei Säugetieren eine zentrale Rolle übernehmen (Ghosh et al., 1998). Das erste entdeckte humane Toll-Homolog war das später als TLR4 bezeichnete Protein (Medzhitov et al., 1997). Der TLR4 ist momentan der am umfangreichsten charakterisierte Toll-like-Rezeptor. Es handelt sich bei diesem Rezeptor um einen Transmembranrezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gram-negativer Bakterien (Poltorak et al., 1998), der in einem Rezeptorkomplex mit CD14 und MD2 vorliegt (Dziarski und Gupta, 2000). Derzeit sind 13 verschiedene Toll-like-Rezeptoren beschrieben worden; hiervon lassen sich 10 im humanen und 12 im murinen Genom finden (Beutler et al., 2005; Tabeta et al., 2004). Den meisten Toll-like-Rezeptoren sind konkrete Liganden zugeordnet worden; so konnte gezeigt werden, dass beispielsweise TLR2 ein Oberflächenrezeptor für gram-positive

Bakterien und deren Zellwandbestandteile ist (Knuefermann et al., 2004a; Lien et al., 1999; Schwandner et al., 1999), für den TLR3 wurden Doppelstrang-RNA (Alexopoulou et al., 2001), für den TLR5 bakterielles Flagellin (Hayashi et al., 2001) und für den TLR9 bakterielle (CpG)-DNA (Hemmi et al., 2000) als Liganden beschrieben. Bis heute konnten Toll-like-Rezeptoren auf verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden, hierzu gehören neben klassisch immunkompetenten Zellen wie beispielsweise Makrophagen oder dendritischen Zellen auch Endothelzellen, Fibroblasten sowie glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten (Boyd et al., 2006). Die funktionelle Relevanz der kardialen Expression von Toll-like-Rezeptoren ist derzeit nur partiell Verstanden.

1.6 Kardiale Expression von Toll-like-Rezeptoren

Toll-like-Rezeptoren, insbesondere TLR2, -4 und -9, konnte eine zentrale Bedeutung in der Myokarddepression während der Sepsis, der sog. akuten septischen Kardiomyopathie, zugeordnet werden. Im Einzelnen konnte gezeigt werden, dass TLR *in vivo* als auch *in vitro* eine Schlüsselrolle für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie spielen (Baumgarten et al., 2006a; Knuefermann et al., 2002a; Knuefermann et al., 2004b). Bei Simulation einer Sepsis mit einem pathogenen Liganden zeigt die Abwesenheit des jeweiligen TLR (TLR-Defizienz) eine signifikant niedrigere Zytokinantwort, eine erhaltene Herzfunktion sowie einen protektiven Effekt in Bezug auf die Überlebensrate im Vergleich zu Kontrolltieren (Baumgarten et al., 2006b; Knuefermann et al., 2002b; Knuefermann et al., 2004a; Knuefermann, et al., 2004b; Knuefermann et al., 2008).

Neben der septischen Myokarddepression spielen TLR eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der druckinduzierten Herzhypertrophie (Velten et al., 2012) und beim Ischämie-Reperfusion (I/R)-Schaden (Stapel et al., 2006).

Bisher konnte aber noch nicht abschließend geklärt werden, welche Zelltypen an den ablaufenden Prozessen aktiv beteiligt sind. Mittlerweile gibt es Hinweise darauf, dass TLR auf Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie spielen. So wurde gezeigt, dass durch Stimulation von adulten Kardiomyozyten mit bakterieller DNA, die über TLR 9 erkannt wird, direkte Effekte auf

das Kontraktionsverhalten an Kardiomyozyten ausgelöst werden können (Knuefermann et al., 2008). Aufgrund dieser Beobachtungen wird angenommen, dass Kardiomyozyten über immunmodulatorische Fähigkeiten verfügen.

1.7 Zellersatztherapie als weitere Therapieoption

Als weitere Therapieoption, die erst zu einem späteren Zeitpunkt, also nicht innerhalb der notfallmäßigen Versorgung eines akuten Infarktgeschehens, eingesetzt werden könnte, wird die Zellersatztherapie angesehen. Diese Option zeichnet sich besonders dadurch aus, dass sie durch die Wiederherstellung von Funktionsgewebe das Maximalziel, die *restitutio ad integrum*, ermöglichen könnte.

Da es sich bei Kardiomyozyten um ausdifferenzierte Zellen handelt und damit keine mitotische Zellvermehrung mehr stattfindet, ist es nicht möglich, adulte patienteneigene Kardiomyozyten aus Biopsaten zu gewinnen und *in vitro* zu vervielfältigen, um sie für eine Transplantation in Infarktgebiete einzusetzen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit Kardiomyozyten aus pluripotenten Stammzellen zu gewinnen.

Die Perspektive der Zellersatztherapie entwickelte sich durch Untersuchungen an Stammzellen aus dem humanen Knochenmark (BMSC). Diese Zellen sind in der Lage, sich selbst zu erneuern und in verschiedene Zellpopulationen zu differenzieren. Diese Fähigkeiten ermöglichen unter anderem die lebenslange Regeneration von mehr als einer Millionen Blutzellen pro Sekunde (Lagasse et al., 2001). Die Arbeiten unterschiedlicher Forschungsgruppen deuteten darauf hin, dass BMSC dazu angeregt werden könnten, sich in Zellen verschiedener Organe zu entwickeln. Dieser Prozess wurde als Transdifferenzierung beschrieben (Lagasse et al., 2000; Mezey et al., 2000; Orlic et al., 2001; Petersen et al., 1999) und war Anstoß für weiterführende Studien, die die umfangreiche Plastizität der BMSC bestätigen konnten (Krause et al., 2001; LaBarge und Blau, 2002; Priller et al., 2001; Wang et al., 2002). Die Transdifferenzierung der Zellen sollte durch das bloße Einbringen in ein neues Gewebe erreicht werden können. Aufgrund dieser Arbeiten wurden weltweit klinische Studien zur autologen Transplantation von BMSC durchgeführt, obwohl gleichzeitig verschiedene

Arbeitsgruppen Zweifel an der Transdifferenzierung veröffentlichten (Castro et al., 2002; McKinney-Freeman et al., 2002; Wagers et al., 2002).

Die klinischen Studien wurden unter anderem an Patienten mit Myokardinfarkt durchgeführt (Assmus et al., 2002; Stamm et al., 2003; Strauer et al., 2002) und es konnten deutliche Erfolge der BMSC-Transplantation dokumentiert werden. So wurde beschrieben, dass durch das Einbringen von Knochenmarksstammzellen im Zuge der Ballondilatation der betroffenen Koronararterie die Größe des Infarktgebietes verringert, die Bewegungsgeschwindigkeit der infarzierten Ventrikelwand gesteigert und die Herzleistung signifikant gebessert werden konnte (Strauer et al., 2002). Diese daraus resultierende sehr positive Einschätzung der Transplantation der BMSC wurde allerdings relativiert als verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass die transplantierten Zellen keine Transdifferenzierung vollziehen (Balsam et al., 2004; Murry et al., 2004; Nygren et al., 2004). Die beobachteten Effekte bei HSZ-Transplantation konnten anschließend durch das Beschreiben parakriner Wirkungen der BMSC erklärt werden (Burdon et al., 2011).

Letztendlich wurde die Idee der Entwicklung einer Therapie mit BMSC verlassen, nachdem Hinweise gefunden wurden, die auf die Gefahr von vermehrter Kalzifizierung und Knochenentstehung im Herzen (Teratombildung) durch die Transplantation von pluripotenten Zellen aus dem Knochenmark hindeuteten (Breitbach et al., 2007).

In der Weiterentwicklung der Idee der Zellersatztherapie wurden deswegen Modelle verfolgt, die die Differenzierung der Zellen am Zielorgan einschränken sollten. So wird derzeit nicht versucht, eine pluripotente Stammzelle am Ort eines Gewebeschadens durch Umgebungsfaktoren in den entsprechenden Zelltypus differenzieren zu lassen. Vielmehr soll die Entwicklung zum gewünschten Zelltyp schon vor der Transplantation initiiert werden, so dass eine Injektion weniger potenter Zellen stattfinden kann. Damit könnte die Gefahr der Entwicklung organfremder Strukturen gemindert werden, gleichzeitig kann sicher gestellt werden, dass die organtypischen Zellfunktionen von den implantierten Zellen erbracht werden können. Als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Zellen kann im Mausmodell auf embryonale Stammzellen (ESZ) zurückgegriffen werden. ESZ sind pluripotent und können sich prinzipiell zu allen Zelltypen des Organismus entwickeln. Werden ESZ in Kultur zur Differenzierung gebracht, entstehen Mischkulturen aus unterschiedlichen Zellarten mit beispielweise Zellen unterschiedlicher

Organe, verschiedener Stützgewebe oder des Immunsystems. Die Selektion der in Kardiomyozyten differenzierenden ESZ aus der Mischkultur ist als sehr schwierig einzustufen, da bisher keine für Kardiomyozyten spezifischen Oberflächenantigene bekannt sind, die die Selektion über spezifische Antikörper ermöglichen könnten. Ebenso verfügen die entstehenden Mischkulturen über eine so heterogene Zellzusammensetzung, dass eine Aufreinigung der Kardiomyozyten durch das selektive Entfernen anderer Zelltypen über deren spezifische Oberflächenantigene unmöglich ist. Als Lösung dieser Problematik wird derzeit die Nutzung Kardiomyozyten-spezifischer Promotoren betrachtet (Klug et al., 1996). Diese spezifischen Promotoren sind in anderen Zelltypen stumm und werden nur in ESZ, die zu Kardiomyozyten differenzieren, aktiv (Sanchez et al., 1991). Dort sind sie für die Transkription organtypischer Gene, wie beispielsweise die der schweren Myosinketten (MHC) des Zytoskeletts, verantwortlich. Durch die Entwicklung solcher transgener ESZ, in denen unter der Kontrolle Kardiomyozyten-spezifischer Promotoren Selektionsmarker exprimiert werden, können hochreine Kardiomyozytenkulturen zur Transplantation gewonnen werden. Für derartige Kardiomyozyten konnte gezeigt werden, dass sie die Kontraktilität von infarktgeschädigten Herzen wieder verbessern können (Kolossoff et al., 2006).

1.8 Arbeitshypothesen und Ziele der Arbeit

Für eine erfolgreiche Etablierung der Zellersatztherapie als adjunktive Therapieoption des Myokardinfarktes wird es von zentraler Bedeutung sein, dass die Transplantation von Zellen in ein Infarktgebiet nicht ebenfalls das Entzündungsgeschehen antreibt und damit als „Drei-Hit-Modell“ zu weiterer Schädigung und weiterem Funktionsverlust des Myokards führt. Die vorgestellte Arbeit sollte die Reaktion von aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten auf hypoxische und inflammatorische Reize sowie ihre Interaktion mit Immunzellen untersuchen, um damit Aussagen über das mögliche Verhalten dieser Zellen bei der Transplantation zu erlauben.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsabläufe

Um die immunmodulatorischen Fähigkeiten von aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden folgende Versuchsansätze gewählt:

A) Stimulation mit LPS

LPS ist ein starker inflammatorischer Reiz der, wie in Kapitel 1.5 beschrieben, über TLR4 zu einer Aktivierung von NF- κ B regulierten Proteinen führt. In den Experimenten wurde LPS in Konzentrationen von 1-100 μ g/ml über einen Zeitraum von 2 und 4 Stunden eingesetzt. Die Stimulation erfolgte in IMDM-Basismedium bei 37° C und 5 % CO₂ Atmosphäre. Die Kontrollgruppe wurde mit autoklaviertem PBS inkubiert.

B) Stimulation durch Hypoxie

Die in Infarktgebieten herrschende Hypoxie ist über den Transkriptionsfaktorkomplex Hypoxie-induzierbarer-Faktor (HIF-1) auch in Abwesenheit von anderen Virulenzfaktoren ein potenter Aktivator einer Immunantwort (Chao, 2009). In den durchgeführten Experimenten wurden die Zellen über 6 und 24 Stunden in einem Hypoxie-Inkubator mit einer Sauerstoffkonzentration von 2 % kultiviert. Die Stimulation fand in IMDM-Basismedium mit 2 ml pro 24er Well statt. Der Erfolg der hypoxischen Stimulation wurde anhand der Expression der HIF-1 regulierten Proteine induzierbare NO-Synthase (iNOS) und Glucose Transporter 1 (GLUT1) überprüft.

C) Stimulation in Anwesenheit von Immunzellen

Da bei den komplexen Abläufen eines Infarktgeschehens Zellen der angeborenen Immunität eine entscheidende Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob die aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten in Anwesenheit von Immunzellen ein verändertes Reaktionsverhalten zeigen. Bei der zugrunde liegenden Vorstellung sollten die Kardiomyozyten durch Interaktionen durch

beispielsweise endogene Liganden aus stimulierten Immunzellen zur Produktion von Zytokinen als immunologische Reaktion aktiviert werden. Hierfür wurden Kokulturen mit THP-1 Zellen angesetzt und eine Stimulation mit LPS durchgeführt.

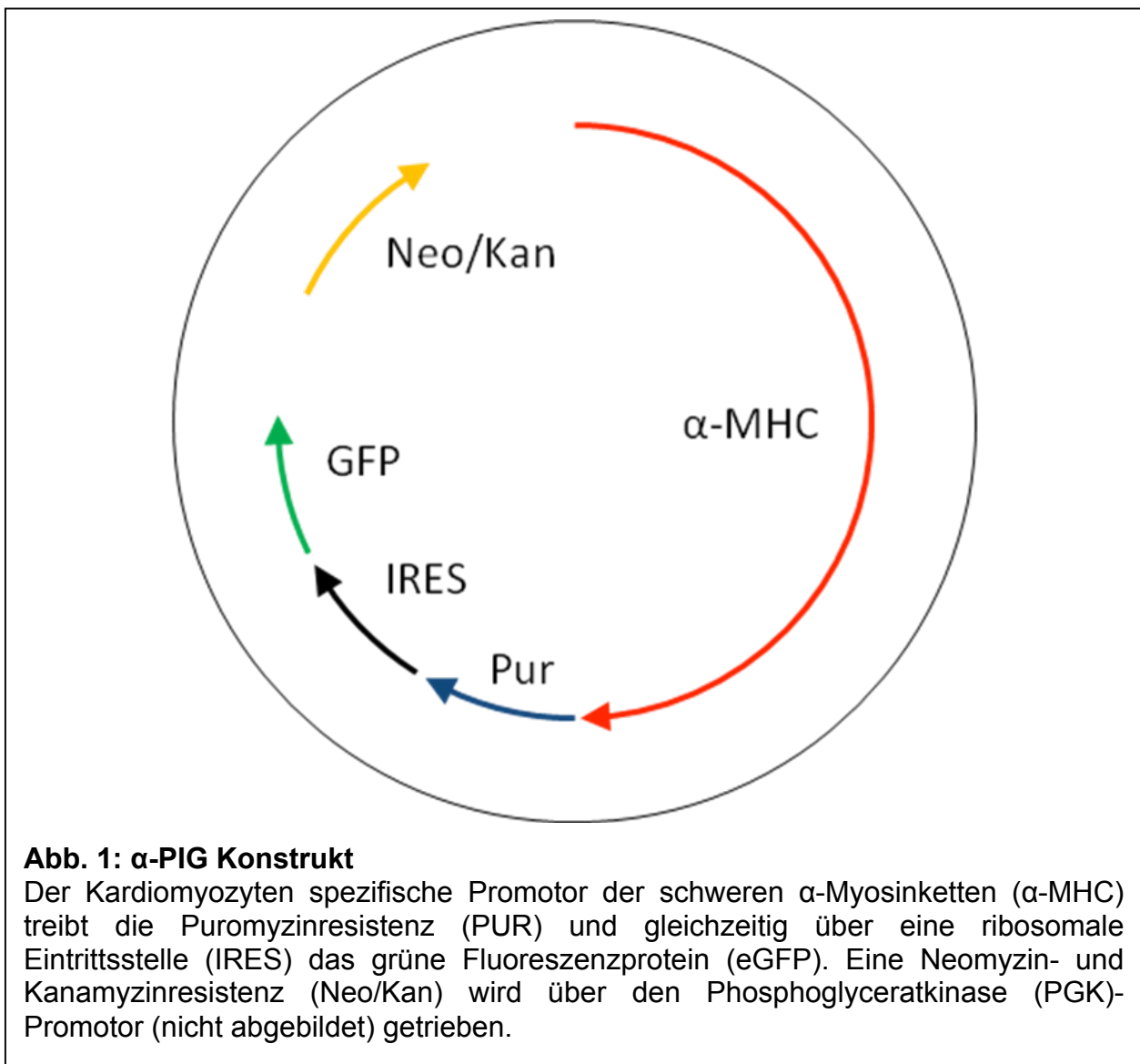
Die immunmodulatorischen Fähigkeiten wurden durch die Analyse der pro-inflammatorischer Zytokine TNF- α und IL-1 β sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 beurteilt.

2.2 α -PIG Zellen

α -PIG Zellen sind transgene Stammzellen aus denen sich hochreine Kardiomyozytenkulturen gewinnen lassen.

Bei α -PIG Zellen handelt es sich um murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der D3 Linie aus einer S129 Maus, die durch Transfektion eines bicistronischen Vektors mit dem α -PIG Konstrukt (Abb.1) folgende Eigenschaften erhalten haben:

Über den ubiquitär aktiven Phosphoglyceratkinase (PGK) Promotor wird bereits in den ES-Zellen eine Neomycinresistenz zur Selektionierung der Konstrukt-tragenden Zellen getrieben. Nach der Differenzierung treibt der für Kardiomyozyten spezifische α -MHC Promotor eine Puromycinresistenz sowie das daran direkt über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) verbundene weiterentwickelte grüne Fluoreszenz-Protein (eGFP). Die IRES ermöglicht die Transkription und anschließend auch die Translation von einer mRNA für zwei Gene, ein Vorgang, der in eukaryonten Zellen ansonsten nicht stattfinden kann. Es werden daher die beiden Eigenschaften Puromycinresistenz und Expression des eGFP unmittelbar aneinander gekoppelt, sodass unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden kann, ob Kardiomyozyten mit Puromycinresistenz vorhanden sind. Die unterschiedlichen Komponenten des transfizierten Vektors sind mit ihren Anfangsbuchstaben namensgebend für die Zellreihe gewesen.



2.2.1 Zellkultur von α -PIG Stammzellen

Im undifferenzierten Zustand wachsen die Zellen nur auf sogenannten Feeder Zellen an (Abb. 2). Bei Feeder Zellen handelt es sich um embryonale Fibroblasten aus neomycinresistenten CD1-Mäusen, die als Monolayer in T25-Kulturflaschen angesetzt wurden und nach Erreichen einer ausreichenden Konfluenz zur Vermeidung weiterer Vermehrung mit 15 Gy über ca. 7 Minuten bestrahlt wurden. Des Weiteren bilden Feeder Zellen geringe Mengen an Leukämie inhibierendem Faktor (LIF). Dieser Faktor verhindert den Start der Differenzierung, regt zur Zellvermehrung an und wurde daher noch von extern hinzugegeben. Außerdem wurde den undifferenzierten α -PIG Zellen

konstant Neomycin verabreicht, wodurch ein Selektionsdruck für konstrukttragende Zellen vorhanden blieb und der Entfernung des Kontruktes aus den Zellen vorgebeugt wurde. Für die Stammzellkultur wurde 15 % DMEM verwendet. Im undifferenzierten Stadium wurde alle zwei Tage ein Mediumwechsel sowie die Verabreichung von frischem Neomycin und LIF (jeweils 500 U/ml Medium) vorgenommen. Darüber hinaus musste die Zellzahl der Stammzellen wieder reduziert werden, um das Überwachsen zu verhindern, da zu dicht aneinander liegende Zellen sich gegenseitig zur Differenzierung anregen. Hierfür wurden die fest auf dem Monolayer aus Feeder Zellen gewachsenen Stammzellen nach dem Entfernen des Mediums mit PBS gespült und anschließend über 3 Minuten mit 1 ml Trypsin bei 38° C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Trypsinverdau durch 5 ml Medium gestoppt und die Zellen konnten aus der Kulturflasche entnommen werden.

Nach fünf minütiger Zentrifugation mit 1000 rpm wurden die Zellen resuspendiert und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Thoma® Kammer gezählt. Von der errechneten

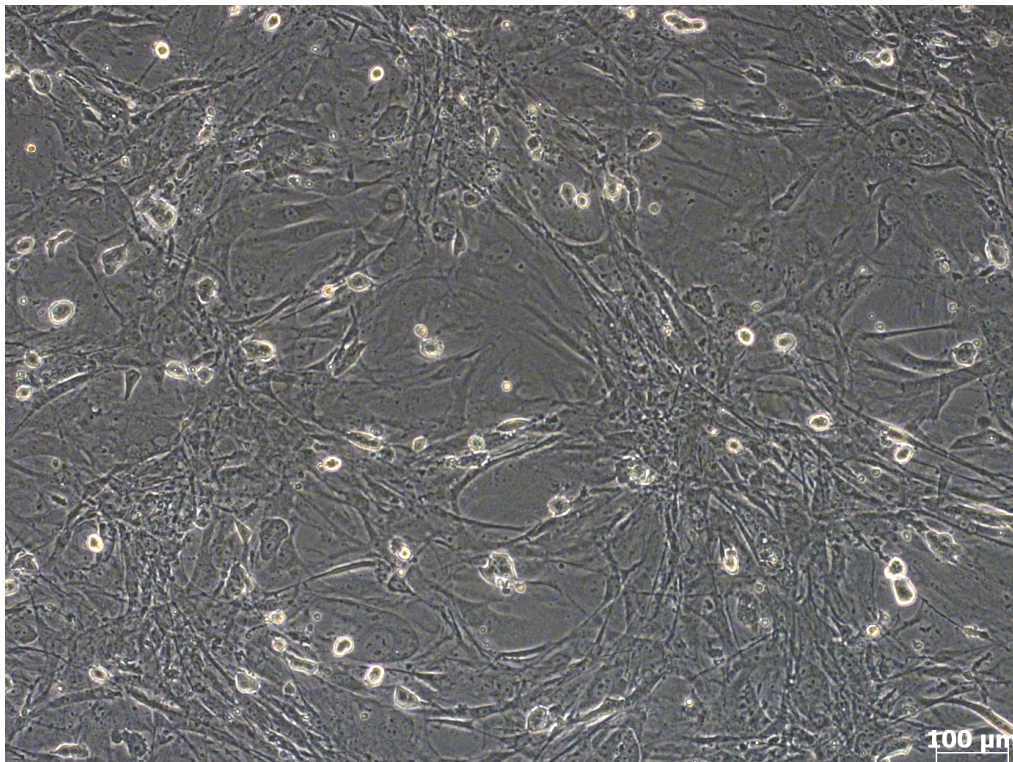


Abb. 2: α -PIG Stammzellkultur

Durchlichtaufnahme (10x) Stammzellkulturnester auf Feeder Zellen.

Zellzahl wurden 600.000 Feeder Zellen abgezogen und im Anschluss 200.000 Stammzellen in eine neue Kulturflasche mit Feeder Zellen gegeben. Dieser Vorgang wird als Passagieren oder auch Splitten bezeichnet.

2.2.2 Differenzierung und Selektionierung der α -PIG Kardiomyozyten

Zum Start der Differenzierung wurde das Massenkulturprotokoll verwendet. Hierfür wurden 2.000.000 undifferenzierte α -PIG Zellen in eine 10 cm Schale mit 10 ml 20 % IMDM-Medium gegeben und für zwei Tage auf einen im Inkubator befindlichen Horizontalschüttler, der sich konstant mit einer Frequenz von 70 pro Minute bewegte, gestellt. In dieser Zeit legten sich die Zellen, die durch die permanente Bewegung aneinander stießen, zu dreidimensionalen Aggregaten, den *embryoid bodies* (EBs), zusammen. Durch das Fehlen von LIF und die gegenseitige Stimulation im EB begann die Differenzierung der α -PIG Zellen unkontrolliert in Zellen verschiedener Zelllinien. An

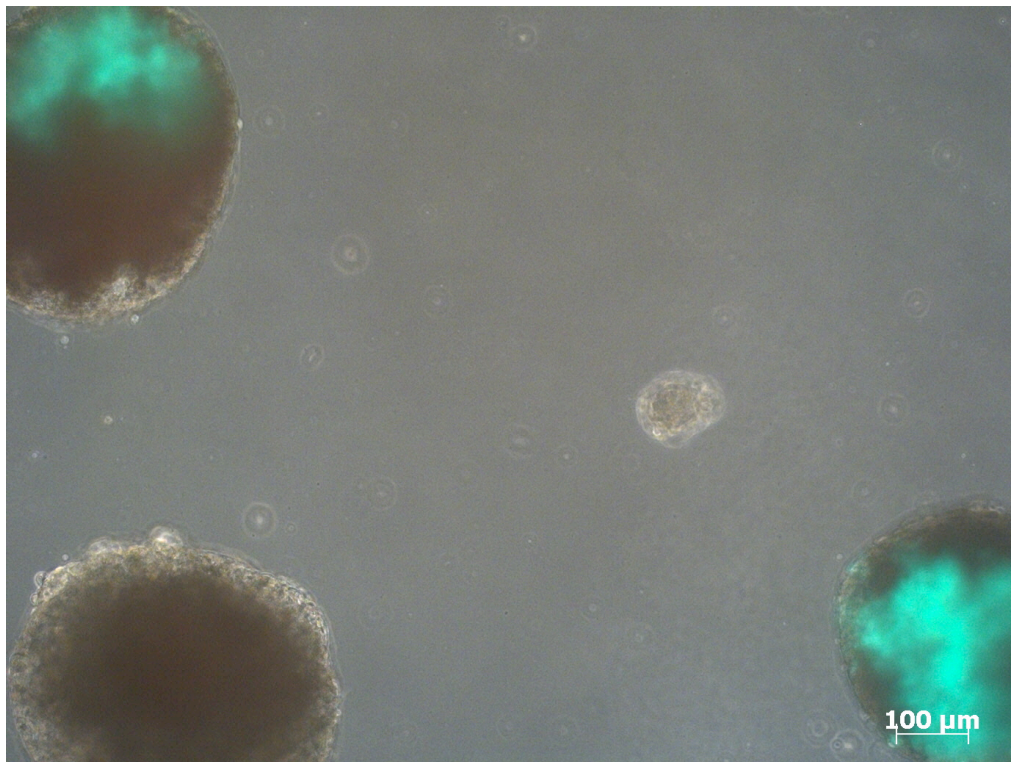


Abb. 3: α -PIG EBs Tag 9 der Differenzierung

Überlagerung von Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme (10x), die grün fluoreszierenden Areale entsprechen Kardiomyozytenarealen.

Tag 2 erfolgte eine Verdünnung der Massenkulturen, hierfür wurden bis zu 20.000 EBs gemeinsam in eine Spinner Flasche überführt. Bei einer Spinner Flasche handelt es sich um eine Glasflasche, die in ihrem Inneren über zwei magnetisch angetriebene Rührstäbe verfügt. Die EBs wurden pro Spinner Flasche mit 200 ml 20 % IMDM-Medium kultiviert und die Differenzierung wurde bis Tag 9 fortgeführt, wobei nach 6 Tagen 100 ml des verbrauchten Kulturmediums durch frisches Medium ausgetauscht wurde.

An Tag 9 erfolgte die Kontrolle des Differenzierungsgrades der EBs unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 3). Konnten hierbei grüne EBs, die unter stärkerer Vergrößerung spontan zuckten, beobachtet werden, wurde mit der Aufreinigung der Kardiomyozyten begonnen. Hierfür wurde den EBs an Tag 9 lediglich Puromyzin (10 µg/ml) in das vorhandene Medium hinzugegeben. Im Anschluss erfolgte an Tag 10 ein Mediumwechsel sowie eine erneute Gabe von Puromyzin für zwei Tage. In dieser

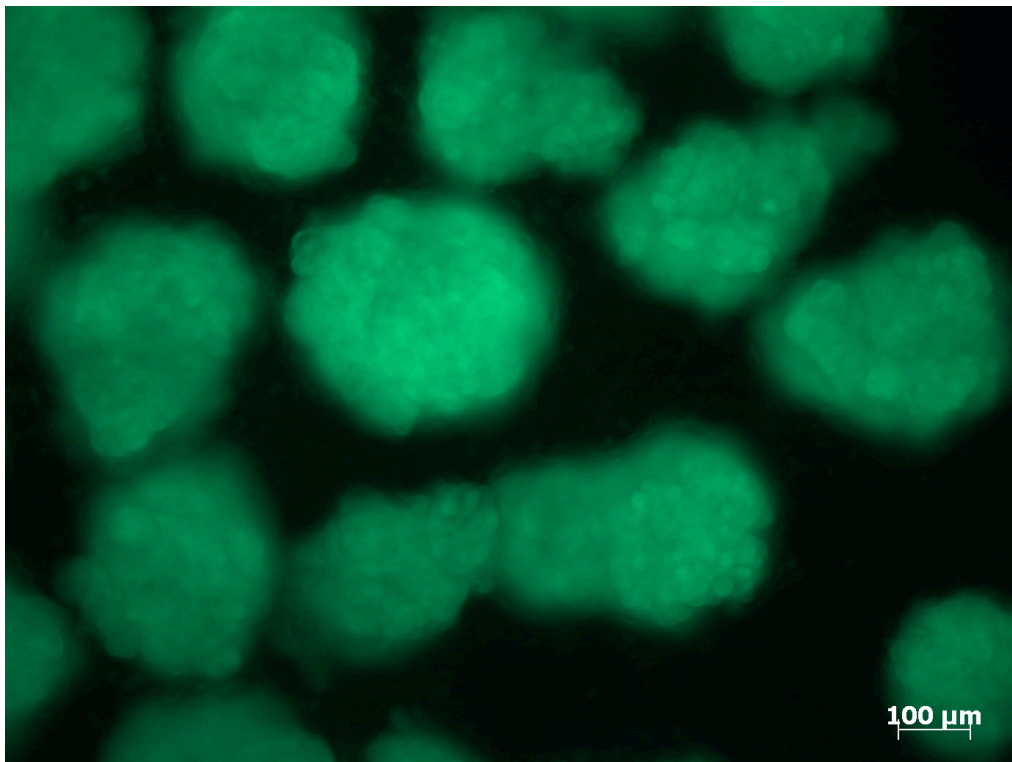


Abb. 4: α -PIG EBs Tag 12 der Differenzierung

Fluoreszenzbild (10x) nach 3 tägiger Puromyzintherapie, die EBs bestehen fast ausschließlich aus Kardiomyozyten.

Zeit war eine deutliche Verkleinerung der EBs zu beobachten, allerdings konnte auch gezeigt werden, dass während der ersten drei Tage Puromyzinkontakt eine erhebliche Vermehrung der Kardiomyozyten stattfindet (Abb. 4) (Kolossoff et al., 2006).

An Tag 12 wurden die Kardiomyozyten aus ihren Aggregaten vereinzelt und auf Kulturplatten mit 24 oder 6 Vertiefungen (24- oder 6- Wellplatten) zu je 200.000 bzw. 500.000 Zellen pro Well ausplattiert.

Dieser Schritt geschah durch den Einsatz der Protease Trypsin, die für 5 Minuten bei 37° C mit den EBs in Kontakt gebracht wurde. Anschließend wurde die Proteaseaktivität durch die Hinzugabe von Fötalem Kälberserum (FCS) enthaltenem Medium gestoppt. Nach der sich anschließenden Zentrifugation mit 1000 rpm für 5 Minuten konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt und ausgesät werden. Da α -PIG Kardiomyozyten nur auf beschichtetem Grund anwachsen, wurden die 24Wellplatten vorher mit je 300 μ l Fibronektin pro Well beschichtet. Im Anschluss an die Vereinzelnung wurde dem Medium der Zellen für weitere drei Tage Puromyzin hinzugesetzt, sodass die Zellen an Tag 15 für Versuche zur Verfügung standen (Abb. 5). Vor dem Einsatz der Zellen in Versuchen erfolgte eine letzte Kontrolle der Kultur unter dem Fluoreszenzmikroskop. Hier zeigten sich nun spontan schlagende, elektrisch gekoppelte Monolayer Kardiomyozyten, die alle eGFP positiv waren.

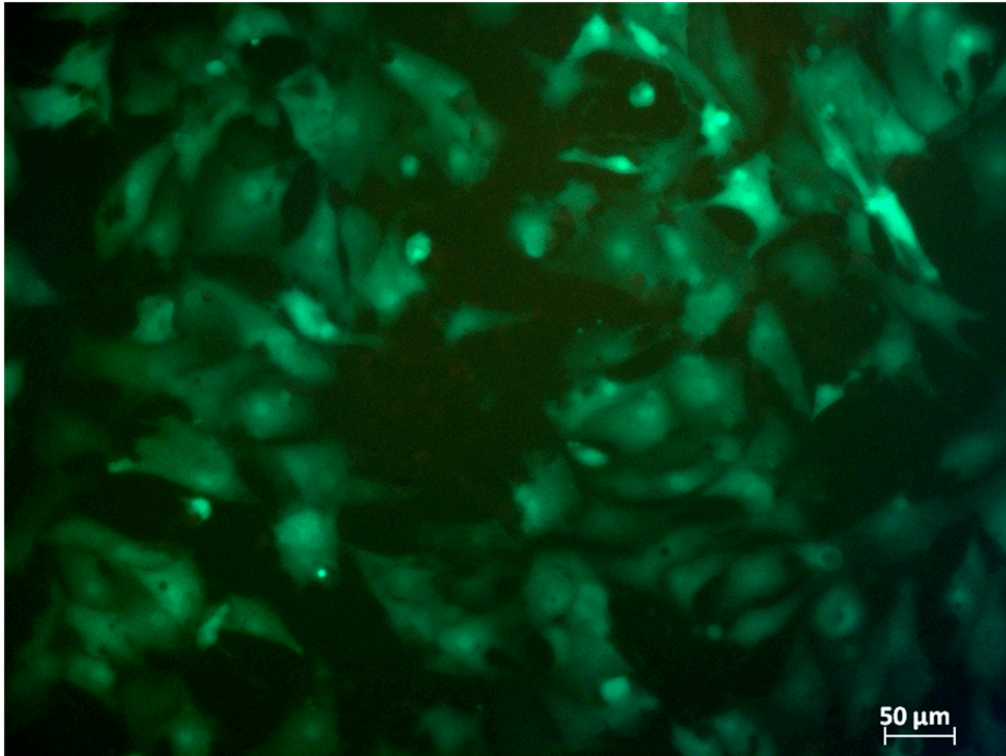


Abb. 5: α -PIG Kardiomyozyten vor Experiment

Fluoreszenzbild (20x), Kardiomyozyten als Monolayer an Tag 15 der Differenzierung vor Einsatz im Experiment.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

α -PIG Kardiomyozyten, die nach der Dissoziation nicht unmittelbar für Stimulationsversuche ausplattiert wurden, wurden zur Lagerung an Tag 12 eingefroren. Hierfür wurden jeweils 1×10^6 Zellen in 1 ml 20 % IMDM-Medium zusammen mit 1 ml Freezingsolution, bestehend aus 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 80 % FCS, in ein Kryoröhrchen gegeben. Dieses Kryoröhrchen wurde anschließend für einen schonenderen Einfrierungsprozess in Styroporhaltern für zwei Wochen bei -80°C gelagert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die tiefgefrorenen Zellen zur weiteren Lagerung in einen Tank mit Flüssigstickstoff überführt.

Zum Auftau gelagerter Zellen wurde 1 ml frisches 20 % IMDM-Medium in das entsprechende Kryoröhrchen gegeben und mehrfach auf- und abpipettiert. Daraufhin

wurde das Medium in ein 15 ml Falcontube mit 9 ml 20 % IMDM-Medium überführt und erneut 1 ml Medium aus dem Falcontube entnommen und auf die gefrorenen Zellen gegeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der gesamte Inhalt des Kryoröhrchens in das Falcontube übertragen worden war. Anschließend wurden die im Falcontube befindlichen Zellen für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und im Folgenden in 1 ml 20 % IMDM-Medium resuspendiert. Mit Hilfe einer Zählkammer konnte nun die Zellzahl bestimmt und je 220.000 Zellen pro 24er Well, die zuvor mit Fibronektin beschichtet wurden, ausplattiert werden. Anschließend erfolgte die weitere Kultivierung unter Zugabe des Selektionsantibiotikums Puromyzin bis Tag 15.

2.2.4 Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten

Vor den Durchführungen der Experimente wurden die α -PIG Kardiomyozyten in Kulturmedium ohne oder mit reduziertem FCS Gehalt und ohne Antibiotikum umgesetzt. Hierdurch sollten störende Einflüsse durch die oben genannten Substanzen verhindert werden. Für Stimulationszeiträume unter 24 Stunden wurde das Nährmedium entfernt und nach zweimaliger Spülung mit PBS erfolgte die Hinzugabe von IMDM Basismedium. Bei Stimulationsversuchen über 24 Stunden oder länger wurde ebenfalls nach zweimaliger PBS Spülung ein Mediumwechsel vollzogen, allerdings wurde dem IMDM Basismedium 2 % FCS hinzugesetzt. Zum Beenden der Experimente wurde das Nährmedium abgesaugt und nach zweimaliger Spülung erfolgte die weitere Verarbeitung der Zellen.

2.3 Andere Zellkulturen

2.3.1 Mischkulturen

Als Mischkulturen werden im Rahmen dieser Arbeit die Kulturen bezeichnet, die aus den α -PIG Stammzellen ohne Hinzugabe eines Selektionsantibiotikums entstanden sind. Diese Kulturen verfügen über eine zufällig entstandene polymorphe Zellzusammensetzung aus diversen Zelltypen wie beispielsweise Immunzellen, Zellen verschiedener Organe oder Stützgewebe. Für Versuche an Mischzellkulturen wurde an Tag 9 dem Medium kein Puromyzin hinzugesetzt, es erfolgte ein Mediumwechsel an

Tag 10 und die Trypsin Dissoziation an Tag 12. Desweiteren wurden die Mischzellkulturen ebenfalls auf mit Fibronektin beschichtete Kulturplatten ausplattiert und an Tag 15 für die Stimulationsversuche eingesetzt.

2.3.2 Primäre embryonale Kardiomyozyten

Damit die an α -PIG Kardiomyozyten erhobenen Daten besser bewertet werden konnten, sollte eine zweite Zellkultur zum Vergleich eingesetzt werden. Hierfür sollten primäre murine embryonale Kardiomyozyten dienen, die im Vergleich zu den *in vitro* differenzierten α -PIG Kardiomyozyten näher an *in vivo* Versuchsbedingungen heranführen.

Präparation:

Die Tötung der schwangeren Mäuseweibchen (C57BL/6) erfolgte an Gestationstag 14,5 mittels zervikaler Dislokation. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und die Uterus-Hörner an den unteren Enden mit einer Schere abgetrennt. Daraufhin konnte der Uterus mit den perlschnurartig aneinanderhängenden Embryonen entnommen und in eine 10 cm Schale mit kaltem PBS überführt werden. In der Schale wurden die Embryonen von Uterus, Plazenta und Fruchtblase befreit und nach der Stage-Einschätzung mittels der Theiler Staging list enthauptet. Für die Entnahme der Herzen wurden die Embryonen in Rückenlage gebracht und der Thorax mit einer Pinzette eröffnet. Die gewonnenen Herzen wurden in eine weitere 10 cm Schale mit kaltem PBS überführt, in der anhängendes Bindegewebe sowie die Atrien entfernt wurden. Anschließend wurden die Herzen in 1 ml Kollagenase-IV-Lösung (1 mg/ml) gebracht und mit Hilfe einer feinen Schere zerkleinert. Zur Vereinzelung der Zellen wurde der Kollagenaseverdau für 20 min bei 37° C und 900 rpm in einem Schüttler durchgeführt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen durch mehrmaliges Pipettieren zusätzlich mechanisch vereinzelt, der trübe Überstand wurde in ein Falconröhrchen mit 20 % IMDM Medium überführt. Weiterhin bestehende makroskopisch erkennbare Zellaggregate wurden erneut für 20 min einem Kollagenase-IV-Verdau zugesetzt. Zellaggregate, die nach dem dritten Verdau noch immer bestanden, wurden verworfen. Abschließend erfolgte das Kultivieren der gewonnenen Zellen auf mit 1 % Gelatinelösung beschichteten 6-Wellplatten in 20 % IMDM.

2.3.3 THP-1 Zellen

Bei THP-1-Zellen handelt es sich um eine monozytäre Zelllinie, die aus dem Blut eines an akuter monozytärer Leukämie erkrankten einjährigen Jungen isoliert wurde. THP-1 Zellen weisen typische monozytäre Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Phagozytose (Wang et al., 2010) oder die Expression von Zytokinen (Dasu et al., 2007) auf. Sie sind ein etabliertes *in vitro* Modell für die Reaktionen monozytärer Zellen auf inflammatorische Stimuli wie beispielsweise LPS.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Suspension in 25 cm² Zellkulturflaschen bis zu einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml. Als Nährmedium diente RPMI-1640. Die Zellen wurden konstant bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet und das Nährmedium erneuert. Hierfür wurde der Inhalt aus der Zellkulturflasche in ein 50 ml Röhrchen überführt und für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und das am Boden des Röhrchens befindliche Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die frische Zellsuspension wurde abschließend auf zwei neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mittels einer Thoma[®]-Zählkammer. Alle Arbeitsschritte mit den Zellen erfolgten unter einer Sterilbank.

2.4 RNA Isolation

Aufgrund der chemischen Instabilität von RNA und ubiquitär vorkommenden RNAsen müssen beim Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen getroffen werden. Das Tragen von Handschuhen bei Kontakt mit allen verwendeten Materialien ist absolute Pflicht, außerdem wurde zum Schutz gegen RNA-Verdau der Arbeitsplatz und alle verwendeten Pipetten vor Beginn der Isolation mit 70 % Ethanol und RNase-Away-Lösung gereinigt. Darüber hinaus wurden spezielle RNase-freie Pipettenspitzen verwendet.

Zur Isolation von RNA wurde das RNeasy[®] Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Ein spezielles vom Hersteller mitgeliefertes Puffersystem ermöglicht hierbei die selektive Bindung von RNA an einer Silica-Gel-Membran. Dabei binden lediglich RNA-Stränge, die über mehr als 200 Basenpaare verfügen. Hierdurch werden kleine RNA-Stränge wie beispielsweise rRNA oder tRNA nicht isoliert, und die häufig sehr lange mRNA kann

selektiert werden. Die Isolation der RNA erfolgte streng nach den Angaben des Herstellerprotokolls.

Nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit wurden alle Zellen von Medium befreit und mit PBS gespült. Daran schloss sich unmittelbar die Weiterverarbeitung der Proben an. Hierbei wurden in einem ersten Schritt die Zellen durch Zugabe einer Guanidin-Thiocyanat-haltigen Pufferlösung lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugieren in der QIAshredder-Säule homogenisiert. Zu dem homogenisierten Lysat wurden 70 % Ethanol hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend für 15 Sekunden bei 13000 rpm bei 25° C zentrifugiert. Bei diesem Schritt binden die RNA-Fragmente an den Silikat-Membranen und die restlichen Bestandteile des Lysats werden ausgewaschen. Es folgten drei Waschschrte der Membran durch Zentrifugation mit den zum Kit zugehörigen Pufferlösungen. Im Anschluss an die Zentrifugationsschritte wird die isolierte RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.5 RNA Konzentrationsbestimmung

Da sich die Konzentration von Nukleinsäuren proportional zur Lichtabsorption verhält, wurde eine photometrische Bestimmung zur Konzentrationsmessung angewendet. Die Grundlage für photometrische Analysen liefert das Lambert-Beersche Gesetz (Abb. 6), das die Intensitätsabschwächung einer Strahlung während des Durchgangs durch absorbierende Substanzen beschreibt

Für RNA Konzentrationsbestimmungen wird die Absorption bei 260 nm, die dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäurebasen entspricht, untersucht. Hierfür wurde der NanoDrop ND-1000 eingesetzt. Die bei 260 nm gemessene Absorption liefert dabei die RNA-Konzentration der Probe, darüber hinaus kann durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA gemacht werden. Dabei sprechen Werten zwischen 1,8 und 2,0 für einen hohen Reinheitsgrad der Probe.

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes in $\frac{W}{m^2}$

I_0 : Intensität der einfallenden Lichtes in $\frac{W}{m^2}$

c : Konzentration der absorbierenden Substanz in $\frac{mol}{l}$

ε_{λ} : Absorptionskoeffizient bei Wellenlänge λ

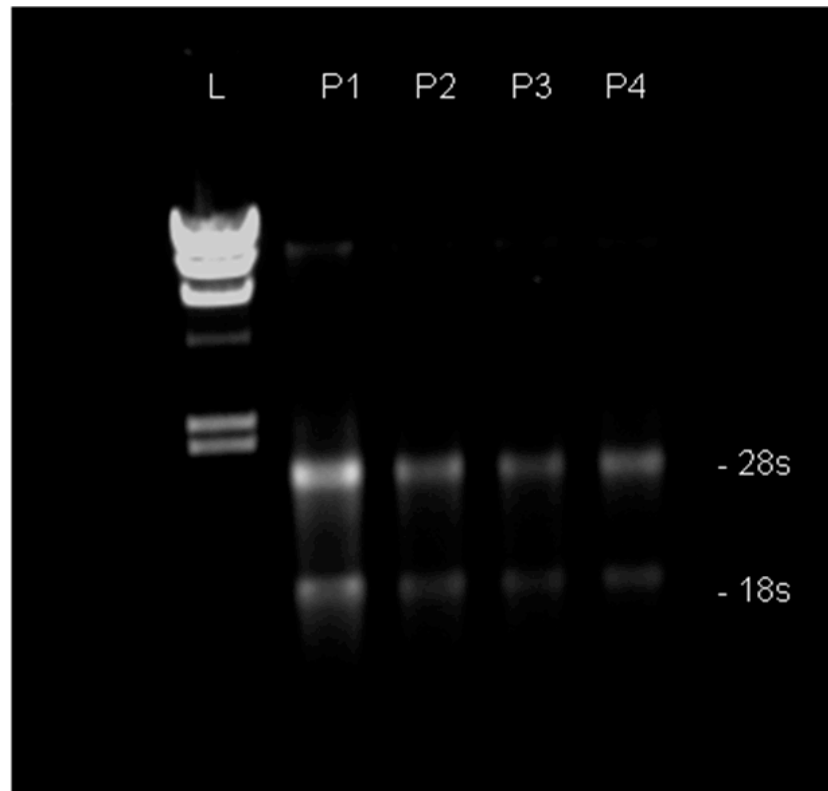
d : Schichtdicke des Durchstrahlten Körpers in m

Abb. 6: Lambert-Beersches Gesetz

2.6 RNA Qualitätskontrolle mittels Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der aufgereinigten RNA wurde in regelmäßigen Abständen eine Auftrennung der RNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Hier konnte anhand des Vorhandenseins der 28s und 18s Untereinheit der ribosomalen RNA (Abb. 7) eine Aussage über die Verwendbarkeit der isolierten RNA gemacht werden.

Es wurden E-Gel[®] 1,5 %ige Agarose Gele in Verbindung mit E-Gel PowerBase[™] Version 4 eingesetzt und streng nach Herstellerangaben vorgegangen. 2 μ l der RNAPräparation verdünnt mit 18 μ l RNase-freiem Wasser wurden auf ein E-Gel[®], dem zur Sichtbarmachung der RNA Ethidiumbromid bereits zugesetzt ist, aufgetragen. Nach 30-minütiger Elektrophorese konnte die RNA unter UV-Anregung (260 nm) sichtbar gemacht werden. Die Qualität der RNA wurde als gut bewertet, wenn die 28s- und 18s-Bande deutlich erkennbar waren und etwa in einem Verhältnis von 2:1 vorlagen.

**Abb. 7: RNA Qualitätskontrolle**

Kontrolle des Vorliegens von 18s- und 28s- Untereinheiten der ribosomalen RNA (L: RNA-Leiter; P1-4: Probe 1-4).

2.7 cDNA Synthese

Aufgrund der hohen Instabilität von RNA wird diese nach Isolation in DNA, die wesentlich größere chemische Stabilität aufweist, umgeschrieben. Hierfür wurde der High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix der Firma Applied Biosystems verwendet. Dabei handelt es sich um eine Kombination von dNTPs, als Bausteine der DNA, zufällig bindenden RNA-Primern, die der Reversen Transkriptase als Startpunkte dienen, Pufferlösung und RNase-Inhibitoren.

Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

- 2 μl - 10x reverse Transkriptase Puffer
- 0,8 μl - dNTPs
- 2 μl - random Primers
- 1 μl - Multi Scribe reverse Transkriptase (50 U/ μl)
- 0,1 μl - RNase Inhibitor (2000 U/ μl)
- 4,1 μl - RNase freies Wasser

Es wurden jeweils 750 ng RNA auf 25 μl Volumen mit RNase freiem Wasser angesetzt und anschließend mit 10 μl Mastermix im Thermocycler umgeschrieben.

Das Umschreiben im Thermocycler fand unter folgendem Temperaturverlauf statt:

- 10 min - 25° C
- 120 min - 37° C
- 5 sek - 85° C

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die 35 μl Lösung 1:2 mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 70 μl verdünnt, sodass eine Konzentration von 10,71 ng/ μl vorlag. Abschließend wurden die Proben bei -20° C gelagert.

2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.8.1 Allgemeiner Teil

Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren. Das Prinzip ist die exponentielle Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte mittels Polymerasen während mehrerer sich wiederholender Zyklen aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung.

In der Denaturierungsphase werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzen voneinander getrennt und es folgt das Annealing: bestimmte zu untersuchende DNA-Abschnitte werden durch das Hybridisieren von jeweils zwei Primern, kurze Oligonukleotidstränge, die gegenläufig an komplementären DNA-Strängen binden,

begrenzt. An diesen Primern beginnt nun während der Elongationsphase eine Polymerase mit der Herstellung eines komplementären Stranges in 3'-5'-Richtung. Ist dieser Prozess abgeschlossen, beginnt der gesamte Zyklus wieder mit der Trennung der nun wieder vorhandenen DNA-Doppelstränge. Diese Prozesse finden in einem Thermocycler statt, der die optimalen Temperaturen zur Strangtrennung, Primeranlagerung und DNA-Synthese erzeugt. Dieses Temperaturprofil ist von den verwendeten Komponenten abhängig. Die PCR ist eine Methode, die auch eine geringe Menge DNA beliebig oft vervielfältigen kann.

Die quantitative Real-Time-PCR bietet durch eine Fluoreszenzmessung während jedes Zyklus den Vorteil der Quantifizierung der zu untersuchenden DNA. Diese Quantifizierung, bei der sich die Fluoreszenz proportional zu den PCR-Produkten verhält, wird durch den Einsatz spezieller Primer möglich.

2.8.2 Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR (RT-qPCR) beruht auf dem Prinzip der klassischen PCR, bietet allerdings zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung eines bestimmten Transkriptes (Bustin, 2000).

Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessungen, die in jedem Zyklus durchgeführt werden. Hierbei wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert berechnet, der sogenannte Cycle Threshold (CT-Wert). Dieser CT-Wert gibt den PCR-Zyklus an, in dem für das jeweilige untersuchte Transkript eine gegenüber der Hintergrundfluoreszenz signifikant höhere Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Die RT-qPCR wurde mit Hilfe der TaqMan[®]-Technologie durchgeführt. Hierbei werden spezielle Sonden benutzt, die über eine Fluoreszenzquelle am 3'-Ende verfügen. Diese Fluoreszenzquelle wird als Reporter bezeichnet, ihm gegenüber sitzt am 5' -Ende der Sonde jeweils ein sogenannter Quencher, der die Fluoreszenz des Reporters absorbiert. Während der Elongation durch die Taq-Polymerase, die über eine 5' -3' Exonukleaseaktivität verfügt, werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, sodass die Fluoreszenz des Reporters nicht länger vom Quencher unterdrückt werden kann. Diese Zunahme des Fluoreszenzsignals wird registriert. Zur Auswertung müssen alle Fluoreszenzsignale nach Abschluss der 40 Zyklen dauernden PCR gegen

ein sogenanntes *Housekeeping-Gen* normiert werden. Ein *Housekeeping-Gen* ist dabei ein solches, das konstitutiv exprimiert wird und durch den experimentellen Ansatz in seiner Expression nicht verändert wird. Typischerweise wird die Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) aus der Glykolyse als *Housekeeping-Gen* eingesetzt. Da GAPDH allerdings durch Hypoxie beeinflusst wird, wurde in den durchgeführten Versuchen 18S RNA als *Housekeeping-Gen* gewählt.

Ein PCR-Ansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Für jedes Gen wurden stets Triplets zu je 10 µl Volumen pro Well untersucht. Hierfür wurden 27 µl PCR-Mastermix mit 6,65 µl cDNA (insgesamt 71,25 ng) versetzt und anschließend aus diesem Ansatz dreimal je 10 µl als PCR-Ansatz entnommen, sodass pro Well jeweils 21,17 ng cDNA eingesetzt wurden.

Der PCR-Mastermix bestand aus:

16,83 µl Taqman[®] Gene Expression Mastermix

1,68 µl Primerlösung

8,49 µl RNase freies Wasser

Folgende Gene wurden in der RT-qPCR untersucht:

18sRNA, TLR4, CD14, iNOS, GLUT1, TNF- α , IL-10, IL-1 β und VEGF-A

Folgendes Temperaturprofil wurde eingesetzt:

2 min	-	50° C	} 40x
10 min	-	95° C	
15 sek	-	95° C	
1 min	-	60° C	

2.8.3 Statistische Auswertung der PCR

Nach Ablauf der 40 PCR Zyklen erfolgte die Auswertung nach der delta-delta-CT Methode (Yuan et al., 2008). Dieses für die RT-qPCR als Standard einzustufende Vorgehen ermittelt in einem ersten Schritt zu jedem CT-Wert einer zu untersuchenden Zielstruktur einen Δ CT-Wert zum unregulierten *Housekeeping-Gen*. Der Δ CT-Wert wird durch die Subtraktion des CT-Wertes des *Housekeeping-Gens* vom CT-Wert des Zielgens errechnet. Anschließend wird ein Mittelwert der Δ CT-Werte der Kontrollgruppe gebildet. Im Folgenden wird zu jedem Δ CT-Wert ein $\Delta\Delta$ CT-Wert errechnet. Dieser ist definiert als Differenz von Δ CT-Wert der Probe und Δ CT-Mittelwert der Kontrollgruppe. Abschließend kann aus jedem $\Delta\Delta$ CT-Wert ein Relativer Quantifikations- (RQ-) Wert bestimmt werden, dieser wiederum ist definiert als $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Die statistische Auswertung der RQ-Werte der Kontrollgruppe gegenüber der stimulierten Gruppe wurde durch zweiseitige T-Tests mit einem Konfidenzintervall von 95 % durchgeführt.

Im Laufe der Versuchsdurchführung ergab sich die Problematik, dass in einigen Versuchen ein Zielgen in der Kontrollgruppe nicht detektiert werden konnte, wohl aber in der stimulierten Gruppe. Es konnten also keine CT-Werte der Kontrollgruppe bestimmt werden und somit auch kein Δ CT-Mittelwert der Kontrollgruppe gebildet werden. Um in diesen Fällen weiterhin eine Auswertung wie beschrieben durchführen zu können, wurden den Kontrollproben, da die durchgeführten PCR Analysen über 40 Zyklen durchgeführt wurden, mit dem CT-Wert 41 definiert. Wenn in keiner Kontrollprobe ein CT-Wert detektiert werden konnte, hat dieses Vorgehen zur Folge, dass der $\Delta\Delta$ CT-Wert für alle Kontrollproben 0 beträgt und damit der RQ-Wert 1 ohne Standardabweichung. Dieses Verfahren wurde nicht eingesetzt, wenn weder in der Kontrollgruppe noch in der stimulierten Gruppe eine Detektion des Zielgens erfolgte.

Abschließend wurden die Ergebnisse der Versuche grafisch dargestellt. Hierbei wurden Balkendiagramme mit Darstellung der Mittelwerte und Fehlerbalken, die die Standardabweichung in eine Richtung angeben, gewählt. Dieses Vorgehen wurde durch den Einsatz des Softwareprogrammes GraphPad Prism umgesetzt.

2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ist ein Verfahren, das auf die Funktionsweise der antikörpervermittelten Immunantwort zurückgreift. Hierbei bindet ein erster Antikörper das gesuchte Zielprotein. Im Anschluss wird durch einen zweiten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist, die Lokalisation des ersten Antikörpers sichtbar gemacht.

Um die Zellen mit diesen Antikörpern in Kontakt zu bringen, wurden die α -PIG Kardiomyozyten auf mit Fibronectin beschichtete Glasplättchen (Durchmesser 12 mm) in 24Well-Platten ausplattiert und anschließend mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Hierfür wurde das Medium abgesaugt, anschließend die Zellen mit PBS gespült und mit 1,5 ml PFA für 30 Minuten versetzt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das PFA abgesaugt, die Zellen erneut mit PBS gespült und abschließend bis zur Immunfärbung mit 1,5 ml PBS bei 4° C gelagert.

Die Färbungen wurden nach folgendem Protokoll durchgeführt: Zu Beginn wurden die Glasplättchen in eine Färbebox überführt und mit PBS gespült. Anschließend wurde der Erstantikörper in 0,2 % Triton-X mit 5 % Serum der Spezies des Zweitantikörpers verdünnt. Es wurden 1:100, 1:500 und 1:1000 Verdünnungen angesetzt und hiervon jeweils 60-70 μ l pro Glasplättchen pipettiert. Die Inkubation des Erstantikörpers fand für zwei Stunden bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Glasplättchen viermalig kurz und dreimalig für einen Zeitraum von fünf Minuten mit PBS abgespült.

Im Folgenden wurde der Zweitantikörper 1:400 in Hoechst - zur Sichtbarmachung der Zellkerne durch Interkalation in die DNA - verdünnt und 60-70 μ l pro Glasplättchen pipettiert, die Inkubation des Zweitantikörpers fand bei Raumtemperatur für eine Stunde statt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde erneut viermalig kurz und dreimalig für fünf Minuten mit PBS gespült, ein letzter Waschdurchgang erfolgte mit VE-Wasser. In einem letzten Schritt wurden die Glasplättchen von Flüssigkeit befreit und mit einem Tropfen Fluka Medium auf Objektträger übertragen. Daraufhin erfolgte eine Trockenphase bei Raumtemperatur über Nacht.

Abschließend konnten die Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet, ausgewertet und dokumentiert werden. Hierfür wurde das Zeiss Axiovert 200M

Fluoreszenzmikroskop mit ApoTom und Bandpassfiltern für eGFP, Cy3, Cy5 und Hoechst in Verbindung mit einer Zeiss AxioCAM MRm eingesetzt.

2.10 Material

2.10.1 Zellbiologische, molekularbiologische und histologische Materialien

β-Mercaptoethanol	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Albumin vom Rinderserum (BSA)	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Fibronektin	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Fluka-Eindeckmedium	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Gelatine	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Geneticindisulfat (Neomycin, G418)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Kollagenase IV	Worthington, Cell Systems, St. Katharinen
Leukemia inhibiting factor (LIF)	Chemikon, Hofheim
LPS (055:B5)	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Nicht essenzielle Aminosäuren, MEM	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin (10.000 U/ml)/	
Streptomycin (10.00 µg/ml) (P/S)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Puromycin	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA 0,05 %	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturflaschen Nunclon, 25 cm ²	Fisher Scientific, Schwerte

Verbrauchsmaterialien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der Firma Falcon (Gräfeling-Locham) bezogen.

Zusammensetzung der Zellkulturmedien:

15 % DMEM für embryonale Stammzellen

82,9 % DMEM

15 % FCS

1 % P/S

1 % MEM

0,1 % β -Mercaptoethanol

20 % IMDM für differenzierende Zellen

77,9 % IMDM

20 % FCS

1 % P/S

1 % MEM

0,1 % β -Mercaptoethanol

RPMI 1640 für THP-1 Zellen

10 % FCS

1 % P/S

2.10.2 Sonstige molekularbiologische Materialien

Die Aufreinigung der RNA erfolgte durch den Einsatz des folgenden kommerziellen Systems (Kit):

RNeasy-mini-Kit,

Qiagen, Hilden

QIAshredder

Qiagen, Hilden

Die Kontrolle der gewonnenen RNA erfolgte durch den Einsatz des folgenden kommerziellen Systems:

E-Gel Agarose Gele	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
E-Gel PowerBase	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
RNase-Away-Lösung	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
RNase freies Wasser	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe
384Well PCR Platte	Brand, Wertheim

Für die Herstellung der cDNA wurde folgendes kommerzielles Kit benutzt:

High capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit	Life Technologies, Darmstadt
--	------------------------------

Die Primer sowie Pufferlösungen für die RT-qPCR wurden kommerziell erworben:

Taqman Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
PCR Sonden	Life Technologies, Darmstadt

Murin 18sRNA	-	Mm02601777_g1
Human 18sRNA	-	Hs02387368_g1
Murin TLR4	-	Mm00445279_m1
Human TLR4	-	Hs00152939_m1
Murin CD14	-	Mm00438094_g1
Murin iNOS	-	Mm00440485_m1
Murin GLUT1	-	Mm00441473_m1
Murin VEGF-A	-	Mm01281449_m1
Murin TNF- α	-	Mm00443258_m1
Human TNF- α	-	Hs00174128_m1
Murin IL-1 β	-	Mm01336189_m1
Human IL-1 β	-	Hs00174097_m1
Murin IL-10	-	Mm00439616_m1
Human IL-10	-	Hs00174086_m1

Als Antikörper in den Immunfluoreszenzfärbungen kamen zum Einsatz:

Primärantikörper zur Färbung muriner Zellen:

Anti- α -Aktinin aus der Maus	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Anti- α -SMAK aus der Maus	Sigma/ Aldrich, Steinheim
Anti-PECAM aus der Ratte	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-TLR4 aus dem Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg

Sekundärantikörper:

Anti-Ratte-IgG-Cy3 aus dem Esel	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, United Kingdom
Anti-Kaninchen-IgG-Cy3 aus dem Esel	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, United Kingdom
Anti-Maus Alexa 647 α -IgM aus der Ziege	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe

2.10.3 Zellreihen und Mäuse

Die transgenen embryonalen α -PIG Stammzellen sowie die für die Kultur notwendigen Feeder-Zellen wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann, Leiter des Instituts für Physiologie I der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Die THP-1 Zellen wurden kommerziell erworben (ATCC-TIB-202, American Type Culture Collection).

Die primären Zellen aus embryonalen Herzen wurden aus schwangeren Wildtyp C57BL/6 Weibchen der Firma Charles River (Sulzfeld) gewonnen.

2.10.4 Geräte und Software

ApoTom	Zeiss, Jena
Axio Observer Z1 Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen
Geldokumentationssystem	Intas, Göttingen
GraphPad Prism Version 5.02	Graph Pad Software
Hypoxieinkubator INCOmed	Memmert, Schwabach
Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Jena
Mikroskop S8AP0	Zeiss, Jena
Multipette Matrix	Thermo Scientific, Schwerte
Multipette Matrix Pipettenspitzen	Thermo Scientific, Schwerte
Platteninkubator B 15	Heraeus, Hanau
Schüttelrührer	VWR, Darmstadt
Spektrometer ND1000 Nanodrop	Peqlab, Erlangen
Spinnerflaschen	INTEGRA, Biosciences GmbH Fernwald
Sterilbank Hera-safe	Heraeus, Hanau
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
ViiA 7	Life Technologies, Darmstadt
Zeiss Axio Vision Software	Carl Zeiss MicroImaging GmbH Göttingen
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Stuttgart
Zellinkubator HERA-cell 240	Heraeus, Hanau

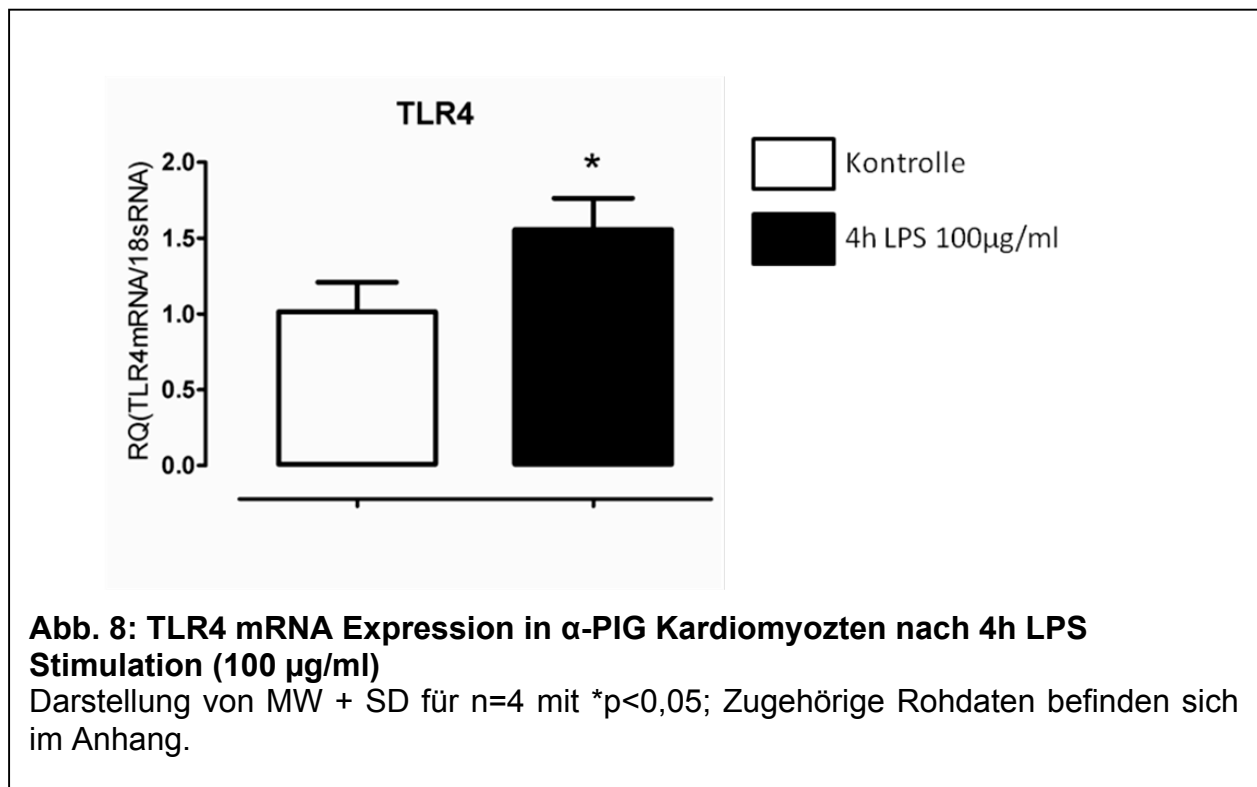
3. Ergebnisse

3.1 LPS Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten

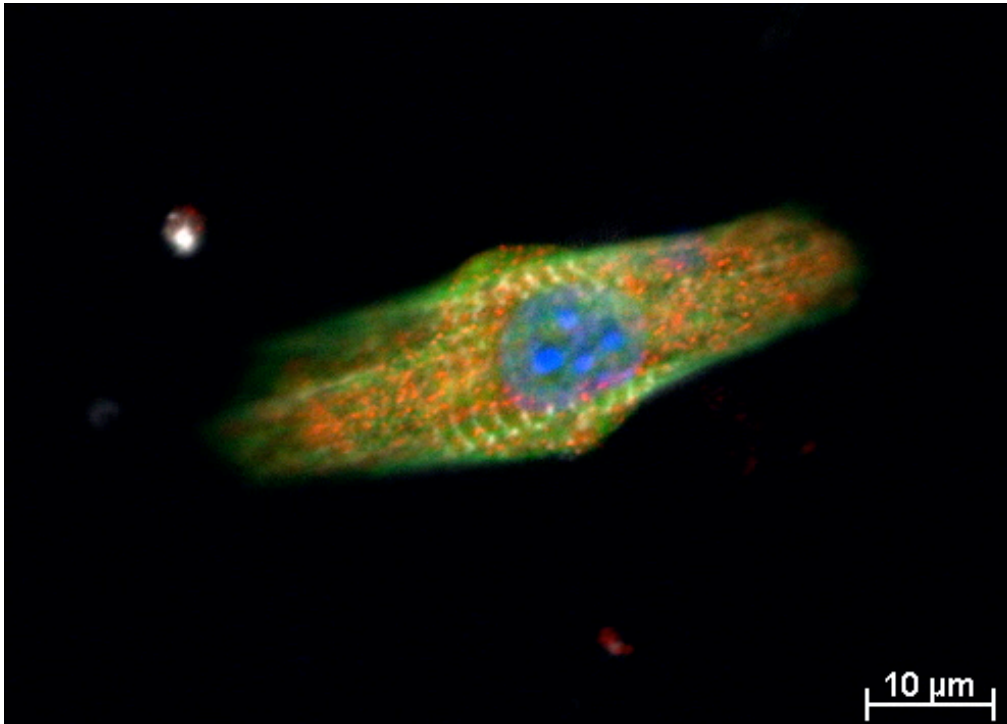
3.1.1 Rezeptorenstatus der α -PIG Kardiomyozyten

Das Vorhandensein des TLR4 auf α -PIG Kardiomyozyten wurde im Rahmen der LPS-Stimulationen überprüft.

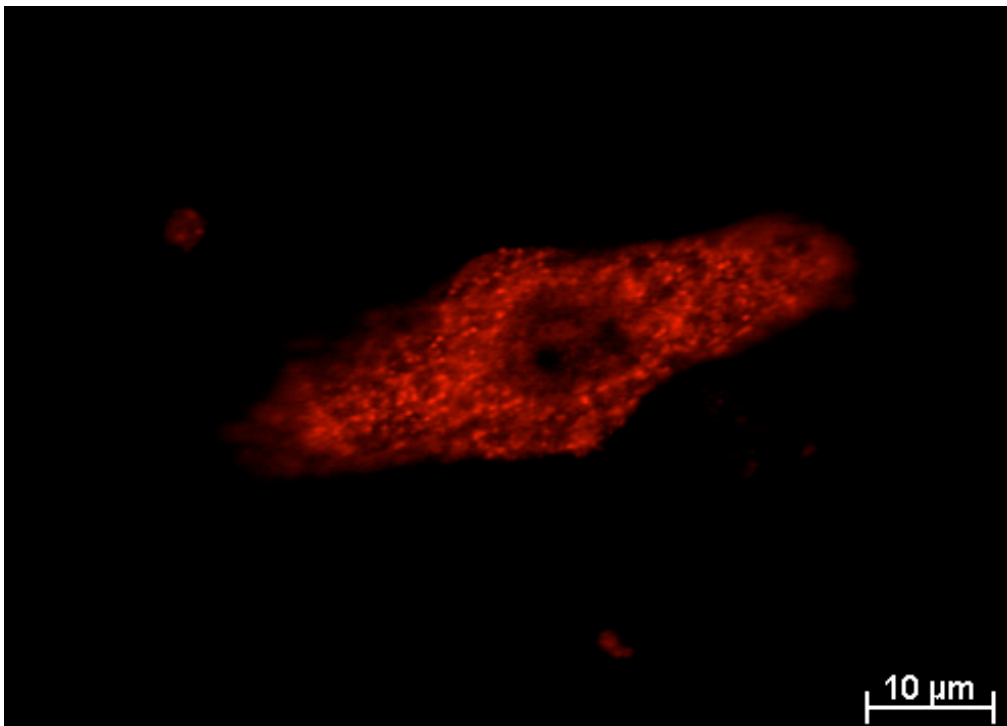
Sowohl auf mRNA Ebene (Abb. 8) als auch auf Protein Ebene konnte durch PCR bzw. Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 9) der Nachweis von TLR4 erbracht werden. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde an LPS stimulierten als auch an unstimulierten Zellen durchgeführt. Hierbei wurde eine Zeitreihe mit den Zeitpunkten 5 Minuten, 10 Minuten, 30 Minuten und 2 Stunden angefertigt, die keine Veränderungen der Intensität oder des Verteilungsmusters des TLR4 Signals durch die LPS Stimulation aufdecken konnte. Der für TLR4 wichtige Korezeptor CD14 konnte allerdings, unabhängig von der Stimulation mit LPS, auf mRNA Ebene nicht nachgewiesen werden.



a)



b)

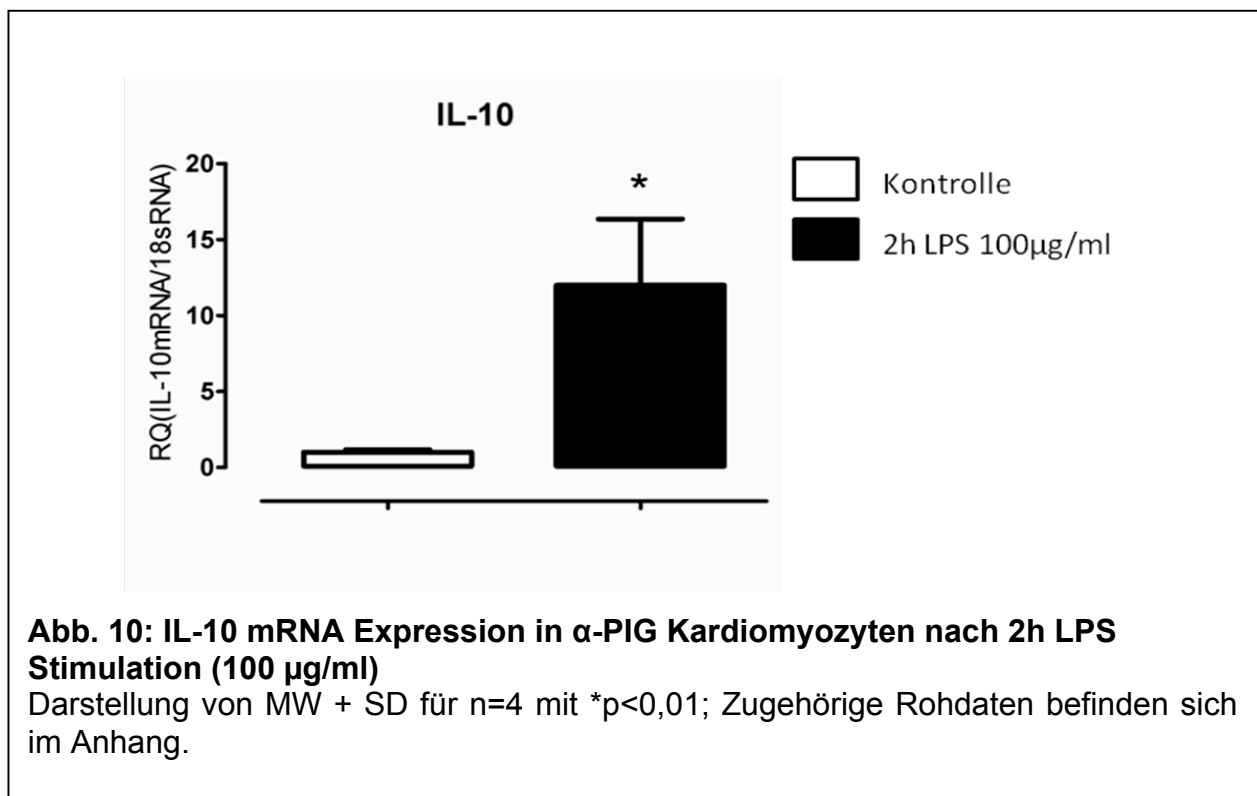
**Abb. 9: Fluoreszenzfärbung unstimulierter α -PIG Kardiomyozyt**

- a) Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen eines α -PIG Kardiomyozyts
blau: DNA Färbung, grün: eGFP, weiß: Aktiningerüst, rot: TLR4 Färbung
- b) Fluoreszenzaufnahme α -PIG Kardiomyozyt TLR4 Signal

3.1.2 Zytokinanalyse der α -PIG Kardiomyozyten

Die Stimulation mit LPS wurde für die Zeiträume 2 und 4 Stunden durchgeführt. Anfänglich wurden die Zellen mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Konzentrationen von LPS schrittweise erhöht (10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$).

In allen durchgeführten Versuchen konnte keine mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF- α oder IL-1 β nachgewiesen werden. So ließ sich weder in den Kontrollgruppen noch in den Stimulationsgruppen nach 40 Zyklen PCR ein Signal detektieren. Bei der Untersuchung des antiinflammatorischen IL-10 befanden sich die mRNA Level in der Kontrollgruppe zu den angesetzten Zeitpunkten unterhalb der Nachweisgrenze, allerdings zeigte sich unter LPS Stimulation eine signifikante Induktion von IL-10 nach 2 Stunden (Abb. 10).



Da vermutet wurde, dass das Ausbleiben einer proinflammatorischen Reaktion möglicherweise auf das Fehlen des Korezeptors CD14 zurückzuführen ist, sollte dieses Defizit in weiteren LPS Stimulationsversuchen durch die Hinzugabe von löslichem CD14

aufgehoben werden. Es wurden daher Versuche mit 1 µg/ml sowie 2,5 µg/ml rekombinanten murinem CD14 bei LPS Konzentrationen von 1 µg/ml, 10 µg/ml sowie 100 µg/ml durchgeführt. Auch nach Zugabe von CD14 konnte weder unter Kontrollbedingungen noch nach LPS Stimulation die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β in α -PIG Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Bei weiterhin ausbleibendem Nachweis der TNF- α und IL-1 β mRNA, wurde neben CD14 zusätzlich der ebenfalls für die Initiierung der LPS-TLR4 Signalkaskade wichtige plasmatische Faktor LPS-bindendes-Protein (LBP) in löslicher Form substituiert.

Trotzdem konnten keinerlei proinflammatorische Reaktionen der α -PIG Kardiomyozyten unter den gewählten experimentellen Bedingungen beobachtet werden.

3.2 LPS-Stimulation der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur

Nachdem in den hochaufgereinigten α -PIG Kardiomyozyten auch nach Hinzugabe des fehlenden Korezeptors CD14 oder des LBP keine proinflammatorische Reaktion nach LPS-Stimulation nachweisbar war, musste eine Beschädigung der Zielgene in den α -PIG Stammzellen ausgeschlossen werden. Eine mögliche Beschädigung, die beispielsweise im Rahmen der genetischen Veränderung entstehen kann, sollte durch Stimulation von aus α -PIG Stammzellen entwickelten Mischkulturen überprüft werden.

Die Generation der Mischkulturen erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die Entwicklung der α -PIG Kardiomyozyten. Einziger Unterschied bestand darin, dass weder an Tag 9 der Differenzierung noch zu einem späteren Zeitpunkt das Selektionsantibiotikum Puromycin dem Medium hinzugegeben wurde. Durch dieses Vorgehen entstanden Mischkulturen mit Zellen unterschiedlicher Organe, verschiedener Stützgewebe oder des Immunsystems aus den α -PIG Stammzellen. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus sollte desweiteren ausgeschlossen werden, dass die entwickelten Kardiomyozyten aufgrund ihres geringen Alters noch keine proinflammatorische Aktivität entwickelt hatten oder fehlerhafte Sonden in der PCR eingesetzt wurden. Hierfür wurden die aus α -PIG Stammzellen entwickelten Mischkulturzellen ebenfalls in LPS Stimulationsversuche eingesetzt.

3.2.1 Rezeptorenstatus der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur

Bei den Stimulationen der Mischkulturzellen konnte der TLR4 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte das Vorhandensein von CD14 mRNA sowie deren signifikante Induktion nach LPS-Stimulation beobachtet werden (Abb. 11).

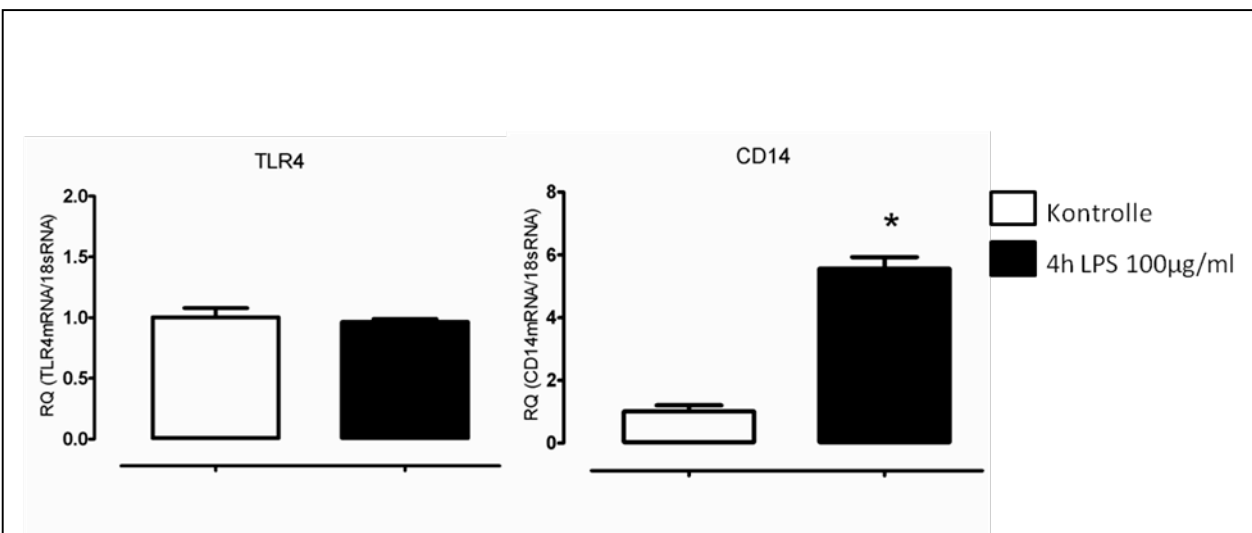
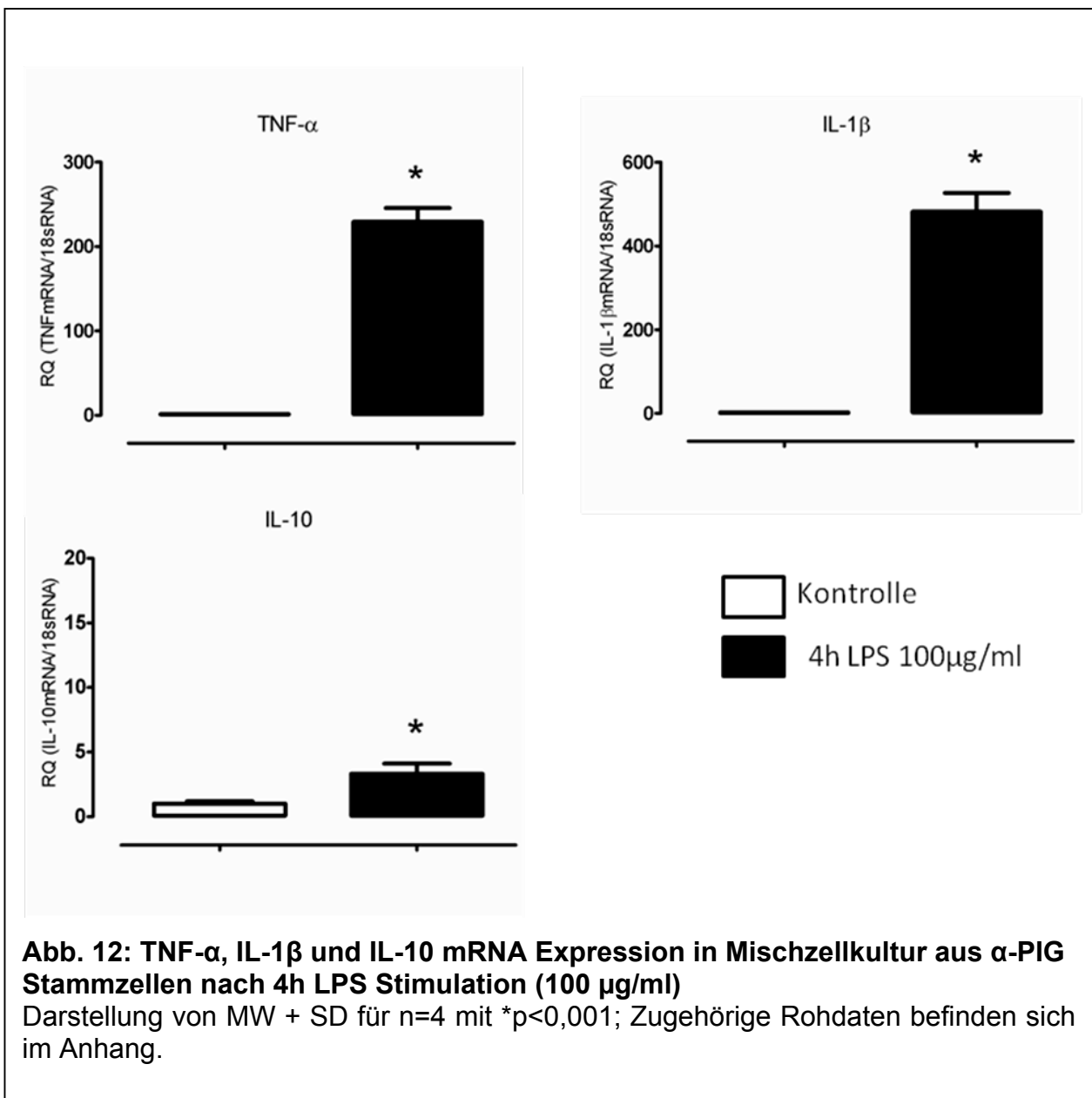


Abb. 11: TLR4 und CD14 mRNA Expression in Mischkultur aus α -PIG Stammzellen nach 4h LPS Stimulation (100 μ g/ml)

Darstellung von MW + SD für n=4 mit *p<0,001; Zugehörige Rohdaten befinden sich im Anhang.

3.2.2 Zytokinanalyse der aus Stammzellen entwickelten Mischkultur

In den Mischkulturzellen konnte sowohl die Expression von antiinflammatorischem IL-10 als auch von proinflammatorischem IL-1 β und TNF- α nachgewiesen werden. Alle untersuchten Zytokine konnten durch LPS signifikant induziert werden (Abb. 12).

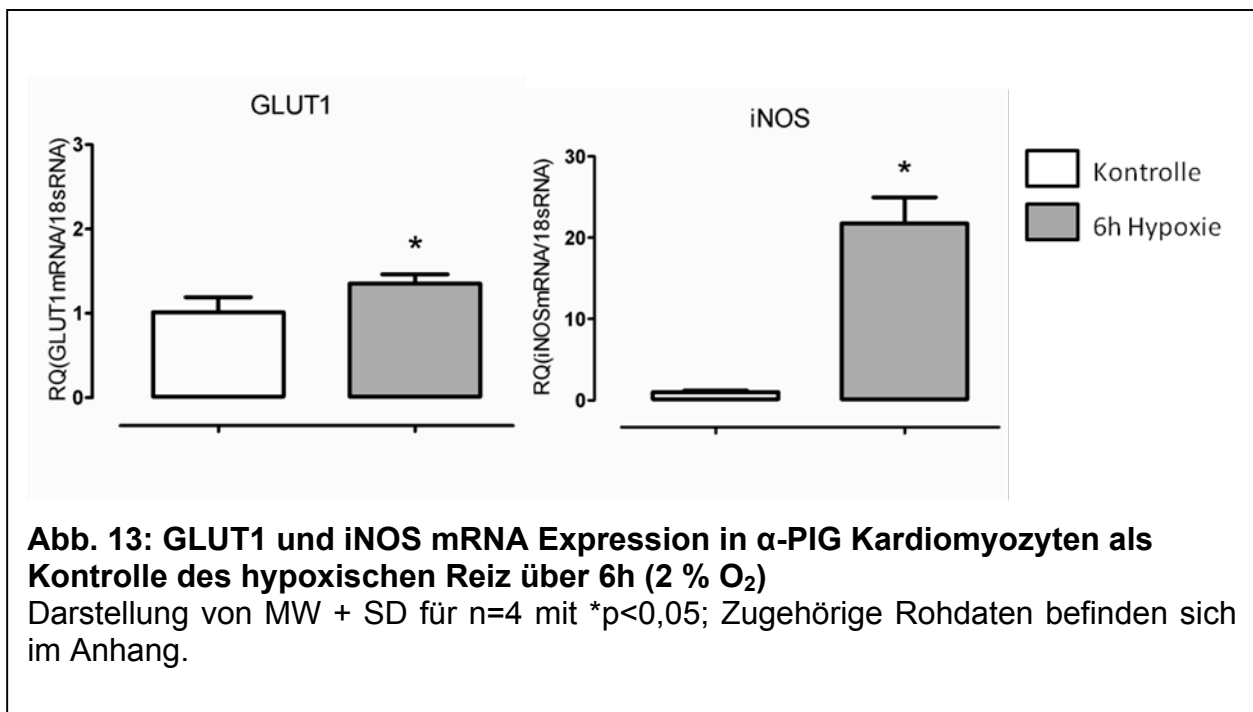


Die Ergebnisse der Stimulation über 2 Stunden sind dem Anhang zu entnehmen.

Durch die Ergebnisse der Mischkulturstimulationen konnte gezeigt werden, dass durch den Einbau des α -PIG Konstruktes keine Beschädigung der Zielgene stattgefunden hatte. Außerdem wurde ausgeschlossen, dass aus Stammzellen entwickelte Zellen an Tag 15 ihrer Differenzierung noch zu jung für die Ausbildung der Zielgene sind.

3.3 Hypoxie-Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten

α -PIG Kardiomyozyten wurden 6 und 24 Stunden bei 2 % O₂ inkubiert. Zu Anfang der Hypoxie-Stimulationsversuchen wurde die Wirkung des eingesetzten hypoxischen Reizes (2 % O₂ für 6h/24h) anhand der Expression der hypoxieinduzierbaren Proteine GLUT1 und iNOS kontrolliert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die hypoxische Stimulation über 6 Stunden (Abb. 13) als auch die über 24 Stunden (Abb. 14) zu einer signifikanten Steigerung der Expression von GLUT1 und iNOS führt.



Im Folgenden wurden die Zytokinanalysen der α -PIG Kardiomyozyten nach 6- und 24-stündiger hypoxischer Stimulation durchgeführt. Hier konnte erneut weder in der Kontrollgruppe noch in der stimulierten Gruppe ein Nachweis von mRNA der proinflammatorischen Zytokine TNF- α oder IL-1 β gefunden werden. Nach 6-stündiger hypoxischer Stimulation ließ sich ebenfalls kein Nachweis für IL-10 erbringen. Dem gegenüber konnte durch hypoxische Stimulation über 24 Stunden eine tendenzielle Induktion der IL-10 mRNA nachgewiesen werden (Abb. 15).

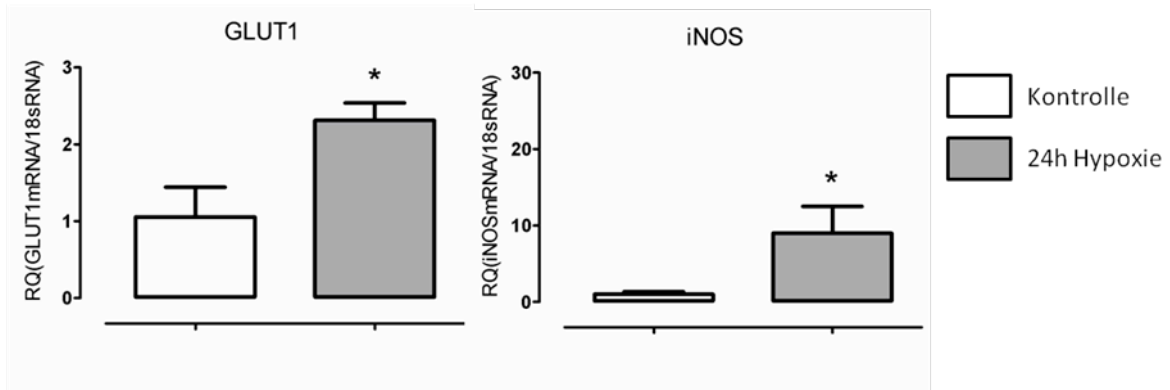


Abb. 14: GLUT1 und iNOS mRNA Expression in α -PIG Kardiomyozyten als Kontrolle des hypoxischen Reiz über 24h (2 % O₂)

Darstellung von MW + SD für n=4 mit *p<0,05; Zugehörige Rohdaten befinden sich im Anhang.

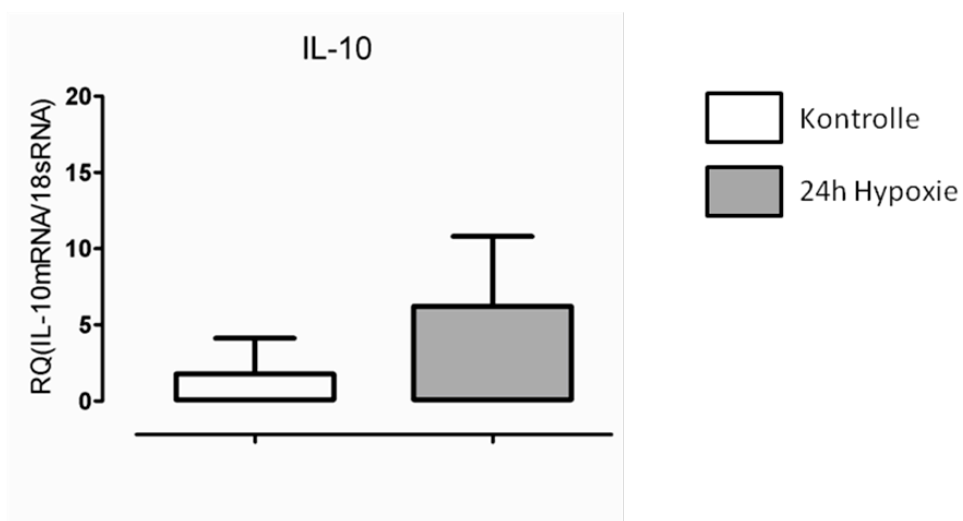
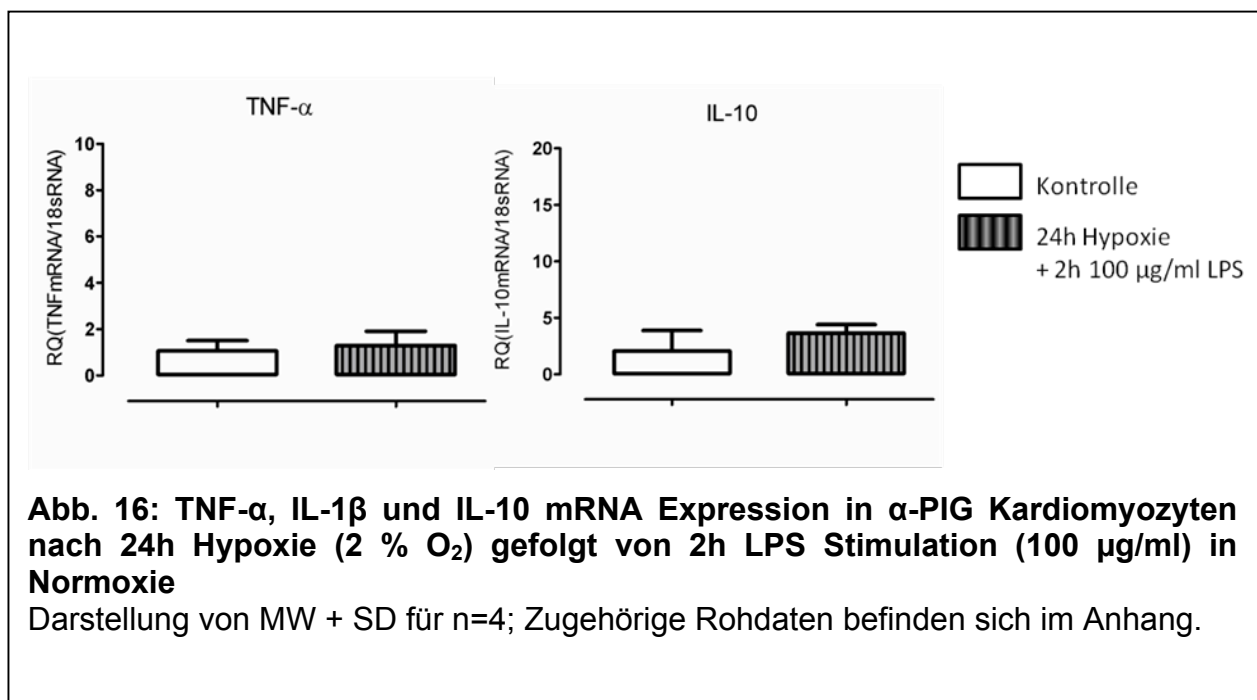


Abb. 15: IL-10 mRNA Expression in α -PIG Kardiomyozyten nach 24h Hypoxie (2 % O₂)

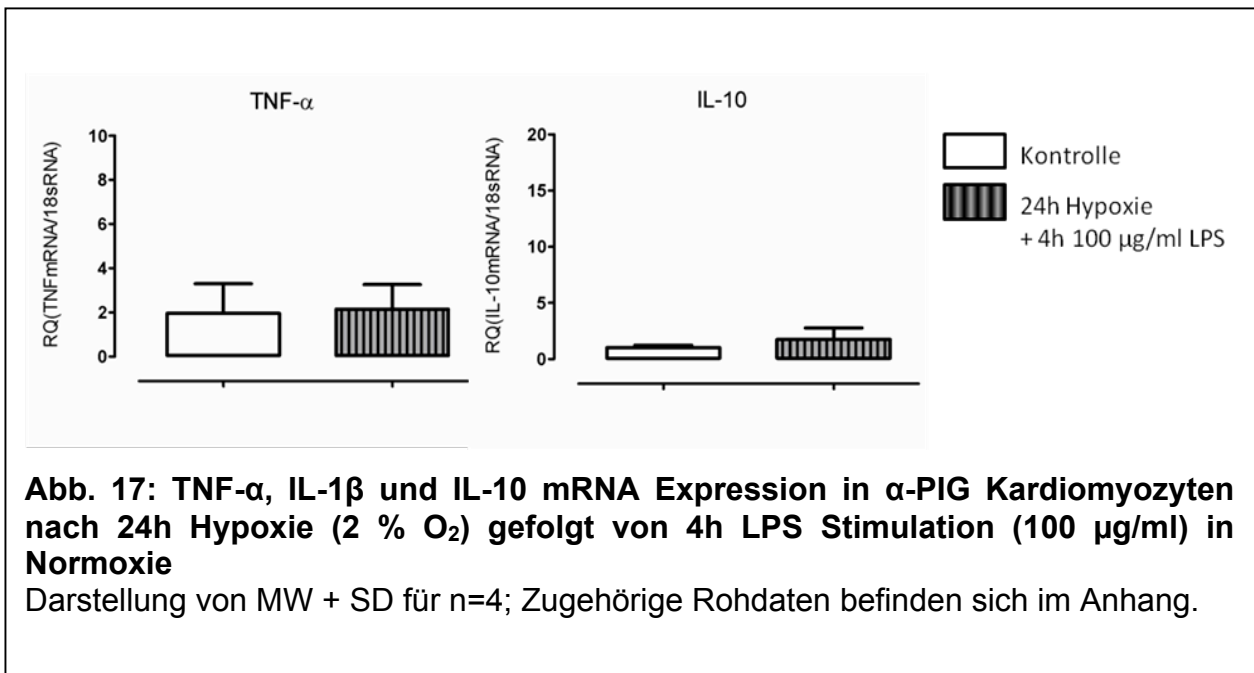
Darstellung von MW + SD für n=4; Zugehörige Rohdaten befinden sich im Anhang.

3.4 Kombination von LPS Stimulation und Hypoxie

Da weder durch Hypoxie noch durch LPS alleine eine proinflammatorische Reaktion in α -PIG Kardiomyozyten provoziert werden konnte, wurden die beiden Stimuli in einer weiteren Experimentserie kombiniert. So erfolgte nach 24-stündiger hypoxischer Inkubation eine Stimulation mit LPS in Konzentrationen von 1 μ g/ml und 100 μ g/ml für 2 (Abb. 16) und 4 (Abb. 17) Stunden unter Normoxie. In den Kontrollgruppen wurde kein zweiter inflammatorischer Reiz gesetzt, hier wurde nach 24-stündiger Hypoxie mit PBS inkubiert.



Nach 24-stündiger Hypoxie gefolgt von 2- und 4-stündiger LPS Stimulation (1 und 100 μ g/ml) blieb weiterhin ein Nachweis von IL-1 β mRNA in den α -PIG Kardiomyozyten aus. Allerdings konnten nach Kombination der beiden Stimuli erstmalig eine schwache Expression der TNF- α mRNA beobachtet werden. Die statistische Auswertung lieferte allerdings keine signifikanten Induktionen. Die Graphen der Stimulationen einer 24-stündigen Hypoxie gefolgt von 1 μ g/ml LPS über 2 und 4 Stunden sind im Anhang dargestellt.



3.5 Verändertes Verhalten der α -PIG Kardiomyozyten in Anwesenheit von Immunzellen

In einem Infarktgebiet sind Immunzellen an zahllosen Umbauprozessen beteiligt. Durch die Infarzierung sind die Immunzellen aktiviert und regen ihre Umgebung zu verschiedenen Reaktionen an.

Eine Kokultur der α -PIG Kardiomyozyten mit Immunzellen sollte die Bedingungen der Transplantation dieser Zellen in ein Infarktgebiet simulieren. Durch diese Anordnung sollte die Hypothese überprüft werden, ob α -PIG Kardiomyozyten in Anwesenheit von Immunzellen eine veränderte inflammatorische Aktivierbarkeit zeigen. Für die Kokultur mit α -PIG Kardiomyozyten wurden THP-1 Zellen, eine humane Monozyten Zelllinie, gewählt. Die Kokultur der murinen α -PIG Kardiomyozyten mit den humanen Immunzellen hat den Vorteil, dass durch den Einsatz von speziesspezifischen PCR Sonden nach der gemeinsamen Stimulation mit LPS eine genaue Zuordnung der PCR Signale zu den beteiligten Zelllinien ermöglicht wird. Die eingesetzten PCR Sonden wurden vor Einsatz auf ihre speziesspezifische Bindung überprüft, hierbei konnten keine Signale der humanen Sonden an muriner cDNA und ebenfalls keine Signale der murinen Sonden an humaner cDNA nach 40 Zyklen PCR detektiert werden. Nachdem beide Zelllinien zusammengeführt wurden, erfolgte die Stimulation mit LPS 100 μ g/ml

über 4 Stunden bzw. die Stimulation mit entsprechenden Volumina PBS der Kontrollgruppe.

Es konnte beobachtet werden, dass die THP-1 Zellen auf die LPS Stimulation mit einer starken Hochregulation pro- und antiinflammatorischer Zytokine antworten. Nach 4-stündiger Stimulation konnte eine signifikante Induktion von TNF- α , IL-1 β sowie IL-10 mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigten die α -PIG Kardiomyozyten keinerlei Reaktion auf die Stimulation mit LPS (Abb. 18). Auch nach 4-stündiger Stimulation unter den Kokulturbedingungen konnte keine Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-10 nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von aktivierten Immunzellen führte somit nicht zu einer Veränderung der inflammatorischen Aktivierbarkeit der α -PIG Kardiomyozyten.

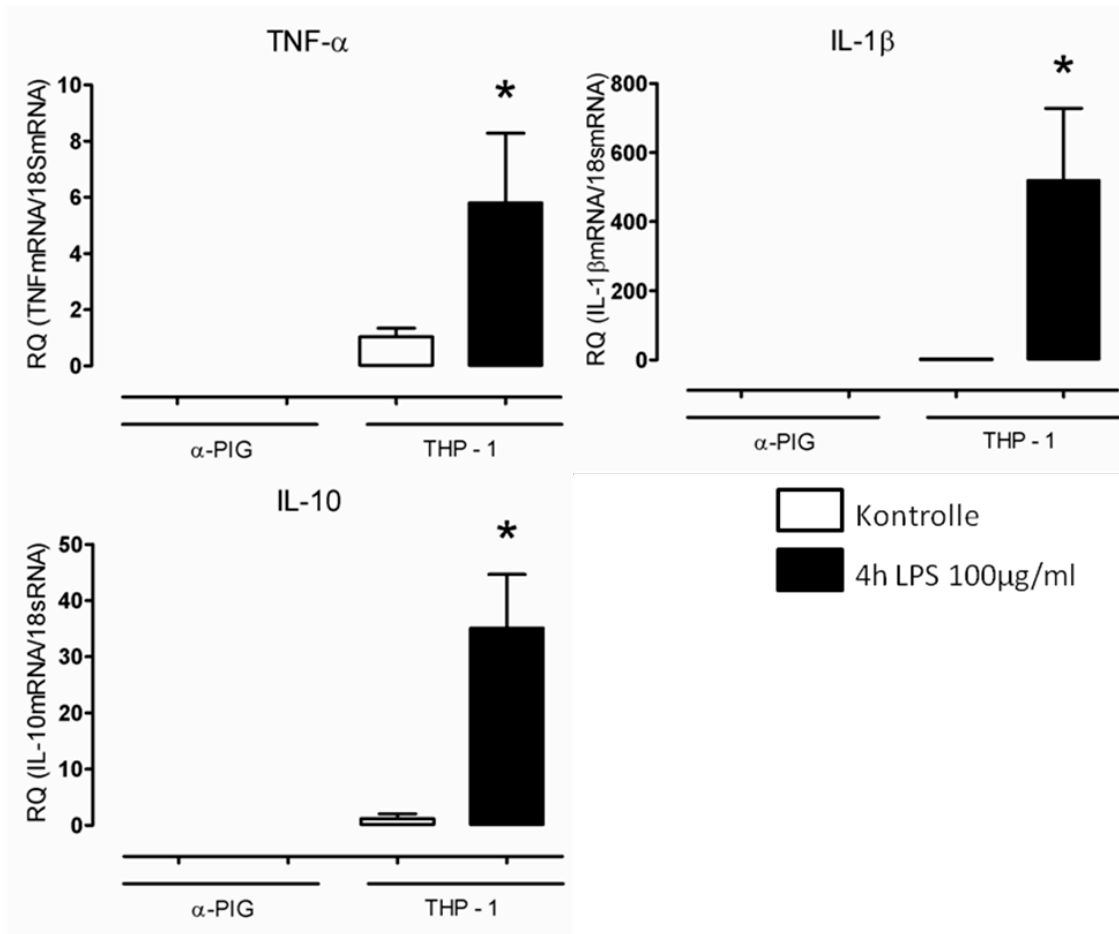


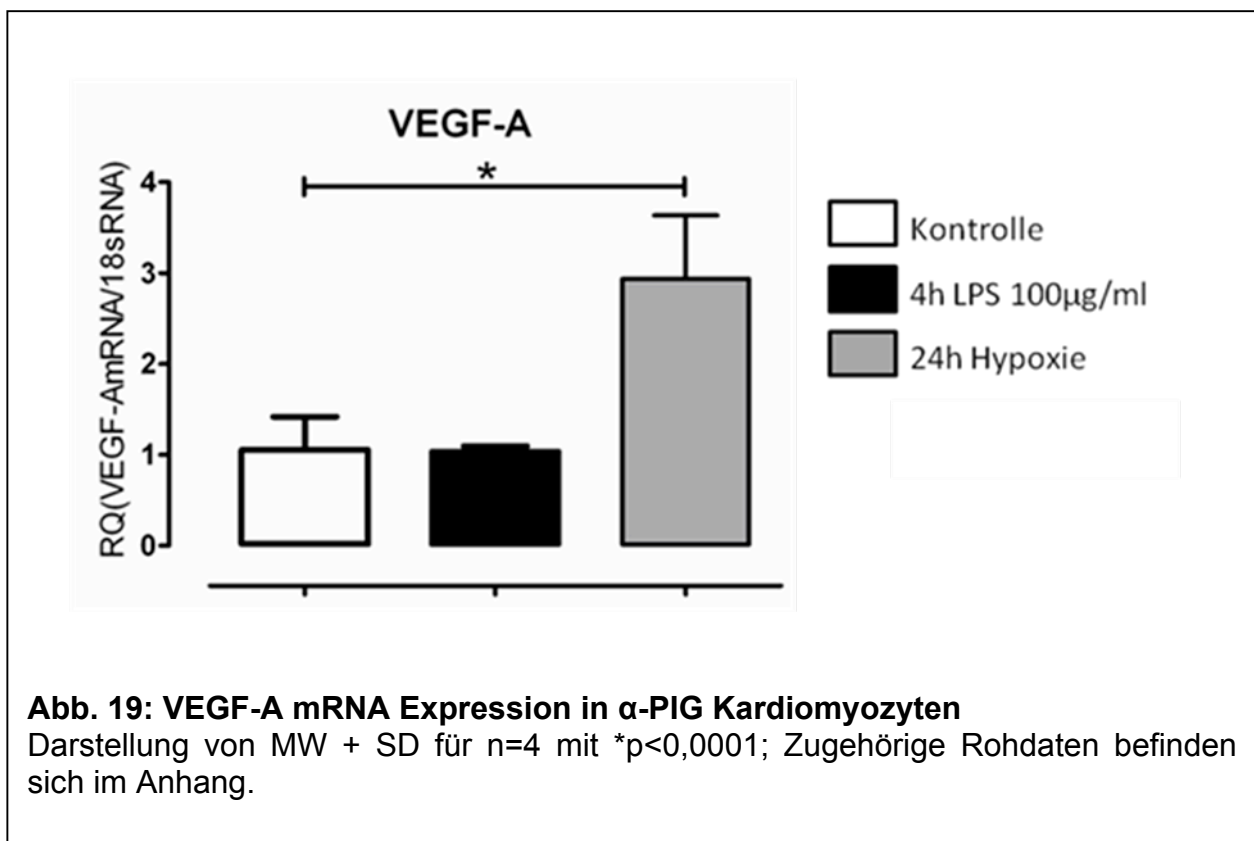
Abb. 18: TNF- α , IL-1 β und IL-10 mRNA Expression von Kokulturen aus α -PIG Kardiomyozyten und THP-1 Zellen nach 4h LPS Stimulation (100 μ g/ml)

Darstellung von MW + SD für n=4 mit *p<0,01; Zugehörige Rohdaten befinden sich im Anhang.

3.6 VEGF-A

Als abschließende Untersuchung zur Charakterisierung der α -PIG Kardiomyozyten und deren möglichen zellulären Reaktionen bei Transplantation in ein Infarktgebiet, wurde eine Analyse für den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A (VEGF-A) durchgeführt. VEGF-A ist ein wichtiger Faktor der Angiogenese, der für die erfolgreiche Transplantation von Zellen in ein Infarktgebiet die Versorgung dieser Zellen mit Sauerstoff und anderen Nährstoffen induzieren soll. Deshalb wurden für die bis hierhin beschriebenen Versuche RT-qPCRs für VEGF-A mRNA (Abb. 19) in den α -PIG Kardiomyozyten durchgeführt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass α -PIG Kardiomyozyten über eine basale Expression der VEGF-A mRNA verfügen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass keine Veränderung dieser Expression durch 4-stündige Stimulation mit 100 μ g/ml LPS erzielt werden kann. Eine signifikante Induktion der VEGF-A Expression in den α -PIG Kardiomyozyten konnte allerdings durch eine 24-stündige hypoxische Stimulation erreicht werden.



3.7 Vergleich mit primärer Kardiomyozytenkultur

Um die Ergebnisse aus den α -PIG Kardiomyozytenkulturen besser beurteilen zu können, sollte eine vergleichende Analyse an murinen primären embryonalen Kardiomyozyten erfolgen. Diese Zellkultur wurde bisher in unterschiedlichen Arbeitsgruppen als mögliche Zellpopulation zur Charakterisierung von Kardiomyozyten eingesetzt. Die Gewinnung und Kultivierung der primären embryonalen Kardiomyozyten ist im Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Die auf diese Art und Weise kultivierten Kardiomyozyten können allerdings nicht als hochreine Kardiomyozytenkultur gewonnen werden. So kommt es zwangsläufig zu einer Mischkultur mit Fibroblasten. Durch verschiedene Verfahren wird versucht das Verhältnis von Fibroblasten zu Kardiomyozyten zu Gunsten der Kardiomyozyten zu verschieben. Solche Verfahren sind beispielsweise Bestrahlung, die an sich schneller teilenden Zellen, in diesem Fall den Fibroblasten, größeren Schaden verursacht, oder das Preplating. Hierbei lässt man die isolierten Zellen nach der Vereinzelnung für ca. 10 Minuten in einer 10 cm Schale mit Medium absinken. Da Fibroblasten schneller am Boden der Kulturschale anhaften, wird nach 10 Minuten das Medium erneut abgenommen und mit den noch nicht adhären Zellen in eine zweite Schale überführt. Durch derartige Verfahren erreicht man Kulturen mit einem Anteil an Kardiomyozyten von 60 % bis 70 %.

Zum Ausschluss von inflammatorischen Reaktionen der stets vorhandenen Fibroblasten, wurde zu Beginn der Arbeit mit primären Zellen das Verhalten der Fibroblasten analysiert.

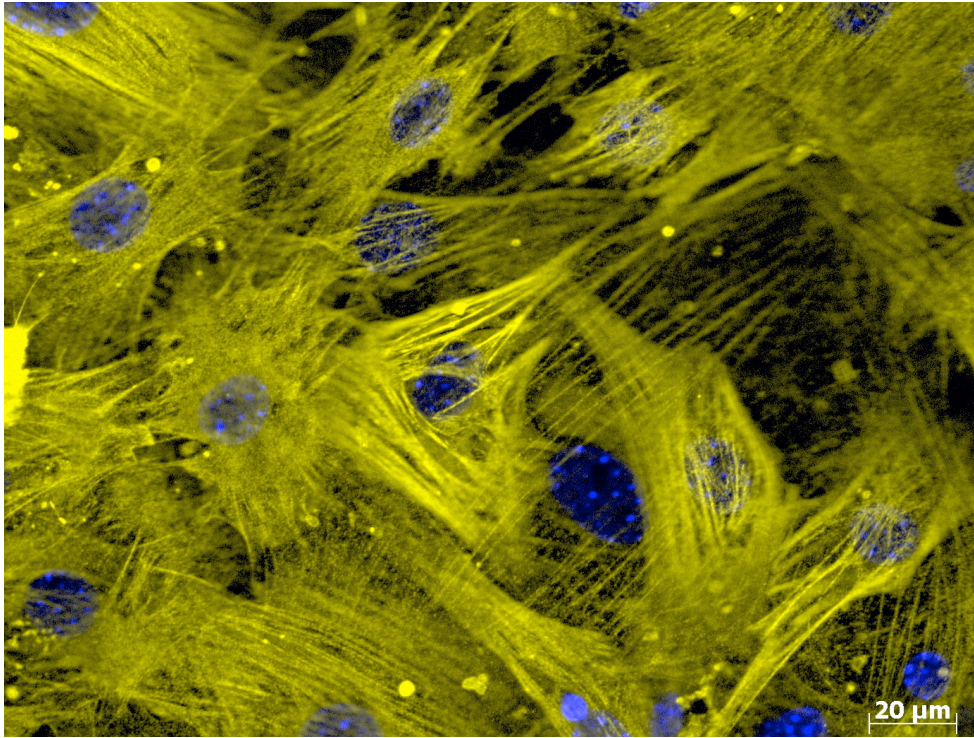
Hierzu erfolgte kein Preplating während der Zellpräparation. Außerdem wurden die primären Zellen vor Einsatz in den Versuchen über 2 Wochen kultiviert. In dieser Zeit erfolgten regelmäßige Subkultivierung mit aggressivem Trypsinverdau. Mit Hilfe dieses Vorgehens sollte ein Absterben der Kardiomyozyten sowie das Überwachsen der Fibroblasten erreicht werden, um in Stimulationsversuchen die alleinige Reaktion der Fibroblasten beurteilen zu können.

3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung primäre Zellkultur

Zur Kontrolle des erfolgreichen Überwachsens der primären Fibroblasten wurde nach 14 Tagen und 5-maligem Passagieren mit Trypsin eine PFA Fixierung mit

anschließender Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durchgeführt. Da fetale kardiale Fibroblasten das α -Glattmuskulatur Aktin (α -smak) exprimieren (Pedram et al., 2010), kann eine Färbung von α -smak zur Detektion von Fibroblasten herangezogen werden (Abb. 20a). Ebenso wurde eine Färbung auf α -Aktinin durchgeführt. Dieses Zytoskelettelement diente dem Ausschluss von weiterhin vorhandenen Kardiomyozyten. Abschließend wurde durch die Färbung von *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule* (PECAM) (Abb. 20b) das Vorliegen von Endothelzellen nachgewiesen. In den durchgeführten Färbungen konnten keine Endothelzellen oder Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Hierdurch wurde bestätigt, dass es sich bei diesen primären Kulturen um reine Fibroblastenkulturen handelt, die im Folgenden auf ihre möglichen Störeffekte bei der Untersuchung von Kardiomyozyten charakterisiert werden konnten.

a)



b)

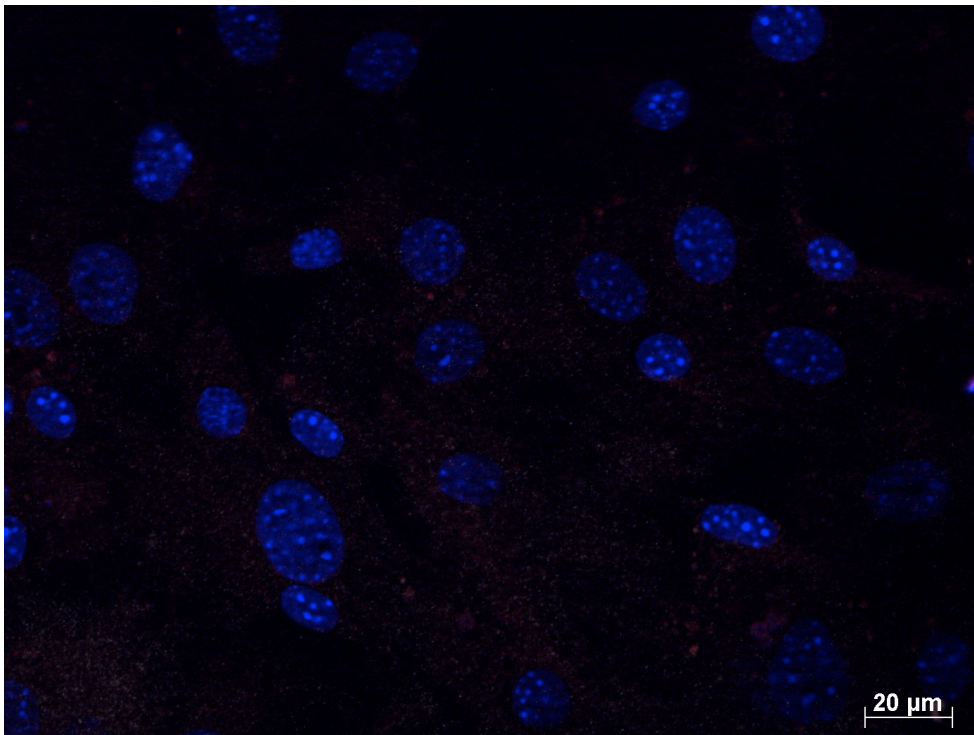


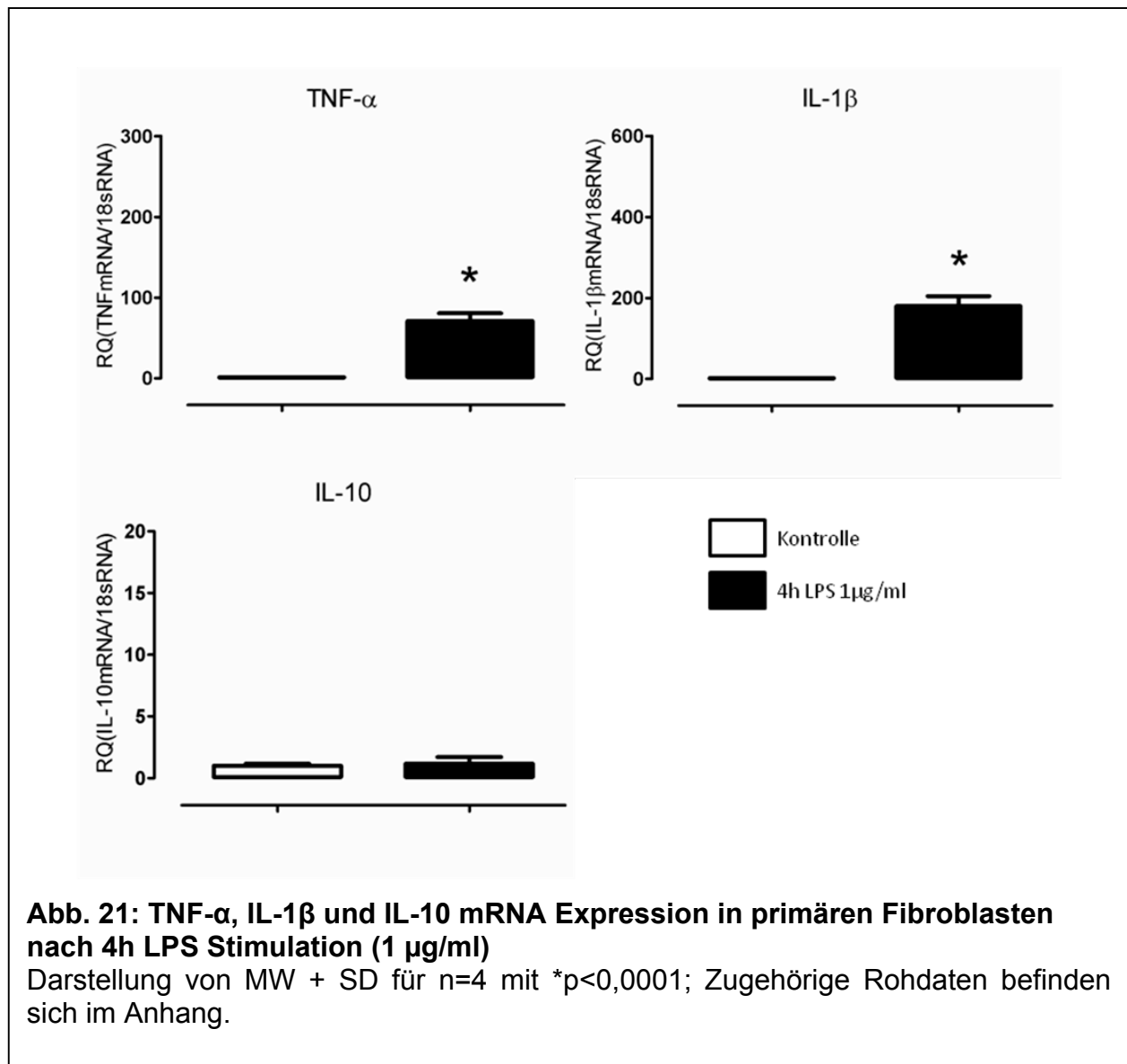
Abb. 20: Primäre Fibroblasten Fluoreszenzfärbung

a) α -smak- und Kernfärbung b) α -Aktinin-, PECAM- und Kernfärbung der primären Kultur (Fluoreszenzbild (40x))

3.7.2 LPS Stimulation primärer Zellkultur

Die hoch reinen primären Fibroblastenkulturen wurden über einen Zeitraum von 4h mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Kontrollgruppe wurde mit entsprechenden Volumina PBS stimuliert.

Zunächst wurde eine quantitative Real-Time PCR Analyse auf TLR4 mRNA durchgeführt. Hier konnte das Vorhandensein von TLR4 mRNA nachgewiesen und kein signifikanter Effekt von LPS auf die TLR4 mRNA Expression beobachtet werden. In der folgenden Zytokinanalyse konnte eine signifikante Induktion von TNF-α und IL-1β durch LPS Stimulation der Fibroblasten nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu wurde keine signifikante Veränderung der IL-10 mRNA Spiegel festgestellt (Abb. 21).



Diese Erkenntnisse über primäre embryonale Fibroblasten zeigen eindeutig, dass durch die zwangsläufig kokultivierten Fibroblasten deutliche interferierende Effekte bei der Untersuchung der Eigenschaften von primären Kardiomyozyten zu erwarten sind. Auf dem Boden dieser Überlegung wurde vom weiteren Einsatz dieser Zellkultur zur Einordnung der über α -PIG Kardiomyozyten nachgewiesenen immunmodulatorischen Eigenschaften abgesehen.

4. Diskussion

Das Maximalziel in der Herzinfarkttherapie ist die *restitutio ad integrum* und damit die Wiederherstellung von Funktionsgewebe nach Myokardinfarkt. Dieses Ziel könnte durch die Transplantation von Kardiomyozyten erreicht werden.

Parallel dazu konnten verschiedene Arbeitsgruppen Hinweise auf die Immunkompetenz von adulten Kardiomyozyten beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden immunmodulatorische Fähigkeiten von aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten im Hinblick auf einen Einsatz in der Zellersatztherapie untersucht.

Hierdurch wurde am Konfliktgebiet der folgenden Hypothesen angesetzt. Die Transplantation einer immunkompetenten Zelle könnte zur Folge haben, dass einerseits die Integration der transplantierten Zellen gestört wird und es zu Abstoßungsreaktionen kommt. Andererseits könnte durch eine immunkompetente Zelle der Myokardschaden weiter vorangetrieben werden. Diese möglichen negativen Folgen müssen bei der Etablierung einer Therapie verhindert oder zumindest minimiert werden.

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Fähigkeiten dienten LPS und Hypoxie als Stimuli der Kardiomyozyten. Die eingesetzten Kardiomyozyten wurden aus murinen embryonalen Stammzellen differenziert und über ein kardiomyozyten-spezifisches Selektionsgen (α -PIG) gewonnen.

4.1 Das Modell der α -PIG Kardiomyozyten

Die Aufreinigung von Kardiomyozyten aus ESZs gelingt durch die Transfektion der ESZs mit Vektoren, die eine Antibiotikaresistenz in bestimmte Zellen einbringen. Hierdurch wird gewährleistet, dass sich bei Gabe des entsprechenden Antibiotikums andere Zellen nicht weiter entwickeln können. Die beobachteten Effekte sind daher den α -PIG Kardiomyozyten zuzuordnen. In der Transfektion liegt jedoch eine potentielle Gefahrenquelle, da durch den zufälligen Einbau des Vektors in die DNA das Erbgut verändert wird. Um funktionelle Änderungen des Kardiomyozyten-Phänotyps auszuschließen wurden α -PIG Kardiomyozyten schon in verschiedenen Versuchen auf

ihre kardiomyozytären Eigenschaften untersucht. So konnte bisher gezeigt werden, dass die für adulte Kardiomyozyten typische Ionenkanäle zum Aufbau eines Membranpotentials und eines Aktionspotentials auch in α -PIG Kardiomyozyten vorhanden sind (Stoelzle et al., 2011). Desweiteren ist der spezifische Promotor α -MHC aktiv, und die Zellen verfügen über ein streng geordnetes Zytoskelett mit α -Aktinin Filamenten, welche ebenfalls typisch für Kardiomyozyten sind (Klug et al., 1996). Daneben sind die Eigenschaften der spontanen Kontraktion, sowie das synchrone Schlagen der α -PIG Kardiomyozyten in der konfluenten Zellkultur – ein Hinweis auf das Vorhandensein von GAP-Junctions (Rook et al., 1990) – ebenfalls Zeichen der Herzmuskelzellen.

Da α -PIG Kardiomyozyten aber nur 15 Tage differenzieren und damit niemals die Reifung eines adulten Kardiomyozyten erlangen, handelt sich eher um fetale Kardiomyozyten, die eventuell über andere Eigenschaften verfügen als der spätere adulte Kardiomyozyt. Besonders im Hinblick auf immunmodulierende Fähigkeiten könnte dieser Faktor eine entscheidene Rolle spielen. Desweiteren muss die zugrunde liegenden Stammzelllinie kritisch betrachtet werden. Bei den mit dem α -PIG Konstrukt transfizierten Stammzellen handelt es sich um Stammzellen der D3-Linie. Diese gilt als gut zu transfizierende kardiogene Stammzelllinie, deren Zellen sich spontan zu einem etwas größeren Anteil in Kardiomyozyten differenzieren. Vor- oder Nachteile dieser Zelllinie bei der Untersuchung von immunologischen Eigenschaften oder immunomodulatorischen Fähigkeiten sind bisher nicht bekannt. Ergebnisse der immunologischen Forschung am Mausmodell belegen, dass auch die Wahl des Mausstammes für die Ergebnisse entscheidend sein kann (Asanuma et al., 2007). Dabei variieren nicht die zu Grunde liegenden Mechanismen, sondern Sensibilität und Vulnerabilität gegenüber immunologischen Reizen differieren von Stamm zu Stamm. Die Zelllinie D3 entstammt aus 129S2/SvPas Mäusen, diese sind bisher in der immunologischen Forschung nicht näher charakterisiert worden (Mouse Phenome Database, 2013).

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss neben dem reinen Zellmodell auch das für das Zellmodell gewählte Analyse-System betrachtet werden. Im hier vorliegenden Fall wurde die Bildung von Zytokinen als Zielgröße für immunologische Reaktion gewählt. Dabei wurden proinflammatorische sowie antiinflammatorische Zytokine betrachtet, für die eine

Induktion durch die eingesetzten Stimulatoren bekannt ist. Selbstverständlich kann eine immunmodulatorische Fähigkeit auch andersartig als hier festgelegt gestaltet sein. So ist eine Vielzahl anderer Botenstoffe, die hier nicht untersucht wurden, an der Ausbildung der Entzündung beteiligt (Neri et al., 2013). Für eine umfassende Charakterisierung der α -PIG Kardiomyozyten müssten weitreichendere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen auch eine indirektere Beeinflussung der Entzündungsreaktion, beispielsweise über vasoaktive Substanzen oder Chemotaxis, als *read-out* der immunologischen Fähigkeiten definiert werden.

4.2 LPS und Hypoxie als Entzündungsinduktoren

LPS und Hypoxie sind als starke Induktoren von inflammatorischen Reaktionen bekannt. LPS wird via LBP über den Mustererkennungsrezeptor TLR4 (Wright et al., 1989) zusammen mit dem membranständigen Korezeptor CD14 (Wright et al., 1990) gebunden und startet eine Signalkaskade, an deren Endstrecke die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern steht (Kawai und Akira, 2007). Diese Endstrecke teilt sich die TLR4 Signalkaskade unter anderem mit der von HIF-1 (Rius et al., 2008).

Das HIF-1 Protein wird unter normoxischen Bedingungen stetig synthetisiert und zweifach hydroxyliert. Während dieses Schritts ist das Vorhandensein von Sauerstoff für die verantwortlichen Enzyme (FIH-1 und PHD/HPHs) unumgänglich. Die Hydroxylgruppen werden an Seitenketten in der *oxygen dependent degradation domain* (ODD) der zytoplasmatischen α -Untereinheit des HIF-1 angebracht und dienen als Angriffspunkte für das von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein, das den proteasomalen Abbau von HIF-1 α durch Polyubiquitinierung einleitet (Huang et al., 1998; Pugh et al., 1997). Bei Sauerstoffmangel kommt es zum Ausbleiben der Hydroxylierung und damit zur Stabilisierung der HIF-1 α -Untereinheit und nachfolgend zur Translokation in den Zellkern. Dort findet eine Heterodimerisierung mit der β -Untereinheit statt, an deren Anschluss HIF-1 die Transkription von hypoxieinduzierten Genen wie beispielsweise GLUT1, iNOS oder GAPDH initiiert. Für HIF-1 ist ebenfalls ein enger Zusammenhang mit dem besonders in der Endstrecke der TLR-

Signalkaskade vorkommenden Transkriptionsfaktor NF κ B bekannt. So konnte gezeigt werden, dass HIF-1 während Hypoxie die Apoptose von neutrophilen Immunzellen durch Regulation von NF κ B verhindert (Walmsley et al., 2005). Desweiteren wurde nachgewiesen, dass HIF-1 über NF κ B die Aktivität des angeborenen Immunsystems induziert (Rius et al., 2008). Aufgrund dieser engen Zusammenhänge von HIF und NF κ B ist die Kombination von Experimenten mit LPS- und Hypoxiestimulation zur Einschätzung immunmodulatorischer Eigenschaften besonders geeignet und wurde als Versuchsgrundlage gewählt.

4.2.1 LPS-Stimulation von α -PIG Kardiomyozyten

In den durchgeführten Experimenten konnte der TLR4 von α -PIG Kardiomyozyten auf mRNA-Ebene eindeutig nachgewiesen werden. Daneben wurde durch eine Färbung des TLR4 Proteins das Vorhandensein von TLR4 auf α -PIG Kardiomyozyten bestätigt. Die erforderliche Zielstruktur der LPS-Stimulation darf daher als vorhanden vorausgesetzt werden. Außerdem wurde eine Induktion der TLR4 Expression unter LPS Stimulation beobachtet. Die geringe aber dennoch signifikante (Faktor 1,5) Induktion der TLR4 Expression durch LPS Stimulation ist im Hinblick auf Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen aus dem Gebiet der rheumatoiden Krankheitsbilder (Juarranz et al., 2006) und der Atherosklerose (Niessner et al., 2006) als regelrecht zu bewerten.

Stimulationen mit LPS wurden bereits an vielen verschiedenen Zelltypen durchgeführt, hierbei wurden typischerweise LPS-Konzentrationen von 1 ng/ml bis 1 μ g/ml eingesetzt. In Zellen der angeborenen Immunität, wie Makrophagen oder Monozyten, induziert die LPS-Stimulation primär die Expression von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α oder IL-1 β (Bailly et al., 1990). Für die verschiedenen Zytokine konnten unterschiedliche Kinetiken ausgemacht werden. So wurde gezeigt, dass für TNF- α eine Hochregulation auf mRNA-Ebene innerhalb der ersten Stunde beginnt und ein Maximum nach 3-4 Stunden erreicht (Schook et al., 1994). Für IL-1 β sowie für IL-10 wurde eine langsamere Kinetik beschrieben. So wurde eine beginnende Induktion von IL-1 β und IL-10 ab der 3. - 4. Stunde nach LPS-Stimulation mit Expressionsmaxima nach 12 - 24 Stunden beschrieben (Chang et al., 2007; Lee et al., 1993).

In Anlehnung an die Expressionskinetiken für Zellen der angeborenen Immunität wurden die LPS-Stimulationszeiträume für die durchgeführten Experimente auf 2 und 4 Stunden

festgelegt. Zu diesen Zeitpunkten sollte die maximale TNF- α mRNA Induktion sowie gleichzeitig die Induktionen von IL-1 β mRNA und IL-10 mRNA erfasst werden. Zu Beginn erfolgte die Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS - einer bezogen auf die oben genannten Stimulationen von Zellen der angeborenen Immunität als eher hoch anzusehende Konzentration. Da unter diesen Bedingungen zu keinem der gewählten Zeitpunkte ein Nachweis der untersuchten Zytokine auf mRNA-Ebene gelang, wurde im Folgenden die LPS-Konzentration gesteigert (10 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$ und schließlich mit 100 $\mu\text{g/ml}$). Die Konzentrationserhöhungen führte zu keinem Nachweis der zu untersuchenden proinflammatorischen Zytokine auf mRNA-Ebene.

Durch die Versuche an Mischkulturen (Kapitel 3.2) konnte ein fehlerhafter Versuchsaufbau sowie eine Beschädigung der Zielgene in den α -PIG Stammzellen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde ein Mangel des Korezeptors CD14 in α -PIG Kardiomyozyten festgestellt. Das Vorkommen von CD14 auf Kardiomyozyten und seine zentralen Rolle bei der LPS induzierten TNF- α Expression wurde im Rattenmodell beschrieben (Comstock et al., 1998). Daher ist davon auszugehen, dass es in α -PIG Kardiomyozyten bei fehlender CD14 Expression zu einer fehlerhaften Rezeptor-Ligand-Interaktion kommt. Durch die Substitution von gelöstem CD14 in Stimulationsversuchen sollte die korrekte Interaktion ermöglicht werden. Eine proinflammatorische Reaktion der Zellen blieb allerdings weiterhin aus. Inwiefern die Substitution von gelöstem CD14 den Mangel an membranständigen CD14 ersetzen kann ist derzeit nicht abschließend zu beurteilen. Es wurde allerdings eine Induktion von NF- κB durch gelösten CD14 und LPS-Stimulation in murinen B-Zellen ohne membranständigen CD14 beschrieben (Dziarski et al., 2000).

Bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS über 2h konnte in den durchgeführten Versuchen eine signifikante Induktion der IL-10 mRNA beschrieben werden (Abb. 10). Diese signifikante Induktion muss am ehesten als unspezifisch und damit nicht über TLR4 verlaufend eingestuft werden, da die eingesetzte Konzentration als höchst unphysiologisch zu bewerten ist (Opal et al., 1999).

4.2.2 Hypoxie an α -PIG Kardiomyozyten

Die Expression immunmodulatorisch wirksamer Zielgene Fähigkeiten unter Hypoxie können durch HIF-1 vermittelt werden. HIF-1 ist der wichtigste Regulator der zellulären

Antwort auf Hypoxie und wird ubiquitär im Organismus exprimiert (Berra et al., 2006). Die Geschwindigkeit der Akkumulation von HIF-1 bei Eintritt von hypoxischen Bedingungen ist zelltypabhängig. In Makrophagen konnte ein Maximum der HIF-1 Induktion nach 4-6 Stunden gezeigt werden. Andere Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten oder renale Zellen, zeigen eine entsprechende Akkumulation bereits nach einer Stunde (Frede et al., 2006). Um sowohl akute als auch chronische hypoxische Bedingungen abbilden zu können, wurden als Stimulationszeiträume 6 und 24 Stunden gewählt. Zur Kontrolle der erfolgreichen hypoxischen Stimulation erfolgte die Untersuchung der HIF-1 regulierten Gene iNOS (Jung et al., 2000) und GLUT1 (Chen et al., 2001). Diese Untersuchungen können als indirekter Nachweis für HIF-1 Induktion und Aktivität in α -PIG Kardiomyozyten gewertet werden. Der Nachweis der Aktivierung der HIF-1 Signalkaskade gelang bereits in verschiedenen Kardiomyozytenmodellen. So konnte beispielsweise für die Zelllinie HL-1 (Claycomb et al., 1998) beschrieben werden, dass Hypoxie auch hier zur Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit führt (Nguyen und Claycomb, 1999).

In den durchgeführten Hypoxieversuchen zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach LPS-Stimulationen - proinflammatorische Zytokine konnten auf mRNA-Ebene erneut nicht nachgewiesen werden. Ebenfalls gelang der Nachweis von IL-10 mRNA, es ließ sich jedoch lediglich eine geringfügige, aber nicht signifikante, Induktion unter Hypoxie beobachten. Die Rolle von aus Kardiomyozyten freigesetztem IL-10 ist bisher nicht eingehend beschrieben worden. Allerdings konnte für das gesamte Herz gezeigt werden, dass die Infarktgebiete bei IL-10 defizienten Mäusen signifikant größer sind als die der Wildtypen (Jones et al., 2001). IL-10 kann daher als kardioprotektiver Faktor eingestuft werden (Markowski et al., 2013).

Um eine maximale Stimulation der Zellen zu erreichen, wurde daher im Folgenden die Kombination von Hypoxie und LPS eingesetzt. Durch dieses Vorgehen konnten in den Versuchen erstmals eine sehr geringe Expression der TNF- α mRNA nachgewiesen werden. Die Induktion von TNF- α war jedoch erst nach 26 bzw. 28 Stunden detektierbar und erreichte kein Signifikanzniveau. Diese Versuchsanordnungen blieben die einzigen bei denen in α -PIG Kardiomyozyten mRNA von proinflammatorischen Zytokinen detektiert werden konnte. Die beschriebenen Ergebnisse weisen auf eine proinflammatorische Trägheit der α -PIG Kardiomyozyten hin, die einen Unterschied zu

anderen Kardiomyozyten bedeutet. In primären Rattenkardiomyozyten wurde der Zusammenhang von HIF-1 und der Expression von TNF- α beschrieben: Es zeigte bereits nach einer Stunde Hypoxie eine signifikante Induktion von TNF- α mRNA, die ihr Maximum zwischen 12 und 24 Stunden fand (Yu et al., 2012).

4.3 Kokultur Stimulationen

Ziel der Stimulationen von α -PIG Kardiomyozyten in Anwesenheit von Immunzellen war die Simulation der Bedingungen während einer Transplantation der Zellen in ein Infarktgebiet. Es wurde beobachtet, dass während der gemeinsamen LPS-Stimulation von α -PIG Kardiomyozyten und THP-1 Zellen die monozytäre Zelllinie THP-1 mit einer signifikanten Induktion der untersuchten Zytokine IL-10, IL-1 β und TNF- α auf mRNA-Ebene reagierte. In Anwesenheit der THP-1 Zellen wurde jedoch keine veränderte Reaktion der α -PIG Kardiomyozyten auf den Stimulus beobachtet. Weiterhin konnten keine proinflammatorischen Zytokine auf mRNA-Ebene in α -PIG Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

Die Auswahl der humanen THP-1 Zelllinie lieferte zwar den Vorteil, dass nach Abschluss der Stimulation über speziesspezifische Sonden eine Trennung der detektierten PCR-Signale für THP-1 Zellen und α -PIG Kardiomyozyten erfolgen konnte, sie stellt allerdings gleichzeitig einen Kritikpunkt der Versuchsanordnung dar. Denn auch wenn davon ausgegangen wird, dass sich das murine vom humanem Genom nur in ca. 20 % unterscheidet (Emes et al., 2003) konnte trotz dieser geringen Unterschiede mittels speziesspezifische PCR-Sonden zwischen beiden Zellreihen differenziert werden. Diese Tatsache weist darauf hin, dass es entscheidende Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen System im Bereich der Zielgene geben muss. Das Ausbleiben eines veränderten Reaktionsmusters der α -PIG Kardiomyozyten in Anwesenheit der aktivierten THP-1 Zellen könnte also darin begründet sein, dass von THP-1 Zellen freigesetzte humane Zytokine nicht als spezifische Liganden an den murinen Rezeptoren der α -PIG Kardiomyozyten binden.

4.4 VEGF

VEGF ist einer der wichtigsten Induktoren der Angiogenese. Diese Eigenschaft ist nicht nur während der embryonalen Entwicklung besonders wichtig, sondern auch für Gefäßneubildungen im Rahmen der Wundheilung (Folkman und Klagsbrun, 1987). Die prominente Rolle von VEGF wurde anhand von Untersuchungsergebnissen deutlich, die zeigten, dass bereits der Verlust eines VEGF Allels zum Tod während der embryonalen Phase führt (Carmeliet et al., 1996). Allerdings nimmt die VEGF vermittelte Angiogenese auch zentrale Bedeutung bei der Entstehung von unterschiedlichen Krankheitsbildern wie der Tumervaskularisierung, der altersabhängigen Makuladegeneration, der rheumatoiden Arthritis oder der Psoriasis (Folkman und Klagsbrun, 1987) ein. VEGF ist bei all diesen Prozessen ein sehr potenter Induktor der Mitose - vor allem von Endothelzellen in Arterien, Venen oder Lymphgefäßen (Ferrara und Davis-Smyth, 1997). Gleichzeitig ist beschrieben worden, dass VEGF auch Mitosen in anderen Zelltypen auslöst (Connolly et al., 1989; Leung et al., 1989). Mittlerweile ist VEGF in der Therapie verschiedener Malignome zu einem beliebten Zielprotein geworden, da so die Tumorangio-genese und damit die Versorgung der entarteten Zellen unterbrochen werden kann (Sharma et al., 2013).

Desweiteren wurde beschrieben, dass die VEGF Expression nach Myokardinfarkt im gesamten Herzen (Li et al., 1996) sowie auch im Serum (Hojo et al., 2000) deutlich erhöht ist. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass VEGF eine zentrale Rolle in der kompensatorischen Herzhypertrophie und damit bei der Erhaltung der Pumpleistung nach Myokardinfarkt einnimmt (Zentilin et al., 2010). In den durchgeführten Versuchen konnte das Vorhandensein von VEGF auf mRNA Ebene in α -PIG Kardiomyozyten beschrieben werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Induktion von VEGF durch Hypoxie. Da VEGF als HIF-1 abhängiges Protein bekannt ist (Dery et al., 2005), kann die beobachtete Induktion als zu erwartend bewertet werden. Inwieweit der VEGF Nachweis in α -PIG Zellen als Chance auf eine Revaskularisierung des Infarktgebietes sowie auf Verbesserung der Pumpleistung als zusätzliche Vorteile bewertet werden darf, ist aus den durchgeführten Experimenten noch nicht abzuleiten.

4.5 Schlussfolgerung und Perspektiven

In der hier vorgestellten Arbeit wurden aus Stammzellen entwickelte Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit LPS oder durch Hypoxie stimuliert und die Expression von pro- sowie antiinflammatorischen Zytokinen analysiert. In den beschriebenen Experimenten konnte den α -PIG Kardiomyozyten keinerlei proinflammatorische Kompetenz zugesprochen werden. Es konnte allerdings eine Induktion des antiinflammatorischen und kardioprotektiven (Dhingra et al., 2009) IL-10 beobachtet werden. Ob diese IL-10 Induktion charakteristisch für mögliche antiinflammatorische Eigenschaften der α -PIG Kardiomyozyten ist, konnte im Rahmen der Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die vorgestellten Ergebnisse lassen aus Stammzellen entwickelte Kardiomyozyten insofern als geeignete Zellen zur Transplantation in ein kardiales Infarktgebiet erscheinen, da keine Interaktion mit den in Abschnitt 1.4 beschriebenen Hauptakteuren des Postinfarkt-Geschehens festgestellt wurde und damit keine Induktion eines zusätzlichen schädigenden Ereignissen am Myokard zu erwarten ist.

In Zukunft könnte die Zellersatztherapie mit aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten als zusätzliche Therapieoption zur Verfügung stehen. Dem Einsatz von embryonalen Stammzellen sind allerdings Grenzen gesetzt: So ist eine Übertragung des Vorgehens aus dem murinen in das humane System aus ethischen Gründen nicht möglich. In Deutschland ist es durch das aktuelle Embryonenschutzgesetz verboten, menschliche Embryonen für Forschungszwecke herzustellen, zu klonen oder zu zerstören. Der entsprechende ethische Konflikt besteht jedoch nicht bei der Nutzung der induziert pluripotenten Stammzellen (IPS), die erstmalig von Shin`ya Yamanaka beschrieben wurden. Bei IPS handelt es sich um pluripotente Stammzellen, die aus nicht-pluripotenten somatischen Zellen, beispielsweise Fibroblasten der Haut, durch Reprogrammierung hergestellt wurden (Takahashi und Yamanaka, 2006). Für die Entdeckung der IPSs wurde Shin`ya Yamanaka und John Gurdon bereits 2012 der Nobelpreis für Medizin verliehen.

Neben dieser Entwicklung sind zudem neue Methoden der Selektion von Kardiomyozyten aus Stammzellen entwickelt worden. Diese Methoden können die

arbeitsintensive Transfektion eines Resistenzgens für Kardiomyozyten und damit gleichzeitig eine mögliche Quelle für Fehlfunktionen der Zellen überflüssig machen.

Auf der einen Seite konnte eine modifizierte Reprogrammierung von somatischen Zellen direkt in Kardiomyozyten erreicht werden, sodass die Entwicklung und die Selektion der Kardiomyozyten aus pluripotenten Zellen umgangen werden kann (Inagawa und Ieda, 2013), auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Kardiomyozyten als einziger Zelltyp in der Lage sind, Laktat als Energiequelle zu verstoffwechseln. Diese Beobachtung macht es bei der Differenzierung von Kardiomyozyten aus Stammzellen möglich, eine reine Kardiomyozytenkultur durch den Einsatz von Medium mit Laktat anstelle von Glucose zu generieren (Tohyama et al., 2013).

Die Zellersatztherapie nach Myokardinfarkt als eine vielversprechende Therapieoption steht derzeit weltweit im Fokus zahlreicher Forschungsgruppen, sodass in nächster Zeit weitere Fortschritte in Richtung Anwendbarkeit beim Menschen erwartet werden dürfen.

5. Zusammenfassung

Die Transplantation von aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten stellt derzeit eine vielversprechende neue Therapieoption für infarktgeschädigtes Myokard dar und könnte als erste Therapiemaßnahme überhaupt eine *restitutio ad integrum* des Infarktgebiet durch das Generieren von Funktionsgewebe ermöglichen. Für eine erfolgreiche Etablierung dieser Therapieoption wird es von zentraler Bedeutung sein, dass die in ein Infarktgebiet transplantierten Zellen nicht negativ in das infarktbedingte Entzündungsgeschehen eingreifen.

Das vorgestellte Projekt sollte die Reaktion von aus Stammzellen entwickelten Kardiomyozyten auf hypoxische und inflammatorische Reize sowie ihre Interaktion mit Immunzellen untersuchen und damit Aussagen über das mögliche Verhalten dieser Zellen bei der Transplantation erlauben.

Es wurden murine transgene Stammzellen der D3-Linie eingesetzt, bei denen der für Kardiomyozyten spezifische Promotor α -myosin heavy chain (α -MHC) die Expression der Puromyazinresistenz sowie via einer *internal ribosome entry site* (IRES) die Expression des *enhanced green fluorescence protein* (eGFP) treibt. Dadurch konnten nach Differenzierung der Stammzellen zu 99 % reine und synchron schlagende Monolayer aus Kardiomyozyten generiert werden, an denen verschiedene Stimulationsversuche durchgeführt wurden. Im Anschluss wurde die Expression verschiedener Rezeptoren (TLR4, CD14) und Zytokine (Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-10, *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A)) mittels RT-qPCR untersucht.

Hierbei konnte weder durch Hypoxie, Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder Aktivierung durch Anwesenheit von Immunzellen eine proinflammatorische Reaktion der Kardiomyozyten induziert werden. Dagegen konnte eine vermehrte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 beobachtet werden. Außerdem konnte eine verstärkte Expression von VEGF-A nachgewiesen und mögliche Wege der Modulation, beispielsweise über Hypoxie, gefunden werden.

Aufgrund des Fehlens von proinflammatorischen Eigenschaften scheinen sich hochreine Kardiomyozytenkulturen aus Stammzellen aus immunologischer Sicht gut zur Transplantation zu eignen, da sie das Ischämie-induzierte inflammatorische Geschehen

nicht zusätzlich verstärken. Darüber hinaus lässt sich eine kardioprotektive Wirkung über die Bildung von IL-10 unter bestimmten Bedingungen vermuten. Ein weiterer Vorteil könnte eine Induktion der Revaskularisierung des infarzierten Gewebes über VEGF-A sein.

6. Anhang

Daten zu Abbildung 8

Probe	CT 18S	CT TLR4	Δ CT	Mittelwert Δ CT K1-4	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K1	20,71212	30,95513	10,24301	10,55455	-0,31154	1,24103
K2	20,84595	31,45186	10,60590		0,05135	0,96503
K3	20,80691	31,37332	10,56640		0,01185	0,99182
K4	20,56513	31,36802	10,80289		0,24834	0,84186
S1	20,92156	31,00278	10,08122		-0,47334	1,38832
S2	20,75772	30,88943	10,13170		-0,42285	1,34057
S3	21,43410	31,48237	10,04828		-0,50627	1,42038
S4	20,90627	30,77862	9,87234		-0,68221	1,60459
Mittelwerte/SEM		K	1.010 \pm 0.08367 N=4			
		S	1.438 \pm 0.05775 N=4			
Probe	CT 18S	CT CD14	Δ CT	Mittelwert Δ CT K1-4	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K1	20,71212	Undetermined				
K2	20,84595	Undetermined				
K3	20,80691	Undetermined				
K4	20,56513	Undetermined				
S1	20,92156	Undetermined				
S2	20,75772	Undetermined				
S3	21,43410	Undetermined				
S4	20,90627	Undetermined				

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K5-8	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K5	21,14769	41*	19,85231	19,76255	0,08975	0,93968
K6	21,04893	41*	19,95107		0,18852	0,87750
K7	21,18329	41*	19,81671		0,05416	0,96316
K8	21,56988	41*	19,43012		-0,33243	1,25913
S5	20,60327	36,59585	15,99258		-3,76997	13,64192
S6	20,85486	36,51713	15,66227		-4,10028	17,15169
S7	20,29248	36,72908	16,43660		-3,32595	10,02793
S8	20,76140	37,69375	16,93235		-2,83020	7,11174
Mittelwerte/SEM		K	1.010 \pm 0.08503 N=4			
		S	11.98 \pm 2.180 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe;

Probe	CT 18S	CT TLR4	Δ CT	Mittelwert Δ CT K9-12	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K9	18,37021	27,99421	9,62400	9,66886	-0,04486	1,03159
K10	18,22259	27,99578	9,77318		0,10432	0,93024
K11	18,16504	27,90799	9,74295		0,07409	0,94994
K12	18,10501	27,64032	9,53531		-0,13355	1,09699
S9	18,26058	27,95270	9,69212		0,02326	0,98401
S10	18,23295	27,90883	9,67588		0,00702	0,99515
S11	18,22788	28,00356	9,77568		0,10682	0,92863
S12	18,19313	27,92892	9,73579		0,06693	0,95467
S13	18,24965	27,98212	9,73247		0,06361	0,95686
Mittelwerte/SEM		K	1.002 \pm 0.03847 N=4			
		S	0.9639 \pm 0.01175 N=5			
Probe	CT 18S	CT CD14	Δ CT	Mittelwert Δ CT K9-K12	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K9	18,37021	29,79036	11,42015	11,80014	-0,37999	1,30133
K10	18,22259	30,13319	11,91060		0,11046	0,92629
K11	18,16504	30,15534	11,99029		0,19015	0,87651
K12	18,10501	29,98453	11,87952		0,07938	0,94646
S9	18,26058	27,47592	9,21533		-2,58481	5,99936
S10	18,23295	27,63377	9,40082		-2,39932	5,27553
S11	18,22788	27,48956	9,26168		-2,53846	5,80967
S12	18,19313	27,64103	9,44789		-2,35225	5,10619
S13	18,24965	27,56372	9,31407		-2,48607	5,60249
Mittelwerte/SEM		K	1.013 \pm 0.09734 N=4			
		S	5.559 \pm 0.1649 N=5			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Daten zu Abbildung 12

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K9-12	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K9	18,37021	33,36511	14,99490	15,20162	-0,20672	1,15406
K10	18,22259	33,51099	15,28839		0,08677	0,94163
K11	18,16504	33,62804	15,46300		0,26138	0,83429
K12	18,10501	33,16519	15,06018		-0,14144	1,10301
S9	18,26058	25,71615	7,45557		-7,74605	214,68128
S10	18,23295	25,52168	7,28873		-7,91289	240,99982
S11	18,22788	25,45308	7,22521		-7,97641	251,84878
S12	18,19313	25,60517	7,41204		-7,78958	221,25679
S13	18,24965	25,69003	7,44039		-7,76123	216,95218
Mittelwerte/SEM	K		1.008 \pm 0.07356 N=4			
	S		229.1 \pm 7.335 N=5			
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K9-12	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K9	18,37021	35,96876	17,59855	17,58475	0,01380	0,99048
K10	18,22259	35,76926	17,54667		-0,03808	1,02675
K11	18,16504	36,02272	17,85768		0,27293	0,82764
K12	18,10501	35,44111	17,33610		-0,24865	1,18810
S9	18,26058	27,00415	8,74356		-8,84119	458,63021
S10	18,23295	27,10852	8,87557		-8,70918	418,52711
S11	18,22788	26,81881	8,59094		-8,99381	509,80790
S12	18,19313	26,84900	8,65587		-8,92888	487,37302
S13	18,24965	26,77698	8,52734		-9,05741	532,78596
Mittelwerte/SEM	K		1.008 \pm 0.07395 N=4			
	S		481.4 \pm 19.94 N=5			
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K9-12	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K9	18,37021	35,66381	17,29360	17,20157	0,09203	0,93820
K10	18,22259	35,76293	17,54033		0,33877	0,79072
K11	18,16504	35,19475	17,02971		-0,17186	1,12651
K12	18,10501	35,04764	16,94262		-0,25894	1,19660
S9	18,26058	34,00462	15,74404		-1,45753	2,74638
S10	18,23295	33,49309	15,26015		-1,94142	3,84083
S11	18,22788	33,26933	15,04145		-2,16011	4,46950
S12	18,19313	33,92790	15,73476		-1,46680	2,76409
S13	18,24965	33,94727	15,69762		-1,50395	2,83617
Mittelwerte/SEM	K		1.013 \pm 0.09201 N=4			
	S		3.331 \pm 0.3510 N=5			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Daten zu Abbildung 13

Probe	CT 18S	CT GLUT-1	Δ CT	Mittelwert Δ CT K13-16	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K13	21,85121	21,20046	-0,65075	-0,61642	-0,03433	1,02408
K14	21,36231	21,11607	-0,24624		0,37018	0,77369
K15	22,21234	21,53876	-0,67358		-0,05716	1,04042
K16	21,92618	21,03108	-0,89510		-0,27869	1,21309
S14	20,46891	19,28690	-1,18201		-0,56560	1,48000
S15	20,43433	19,53483	-0,89950		-0,28308	1,21679
S16	20,90777	19,82075	-1,08703		-0,47061	1,38569
S17	21,05955	20,03175	-1,02780		-0,41138	1,32996
Mittelwerte/SEM	K		1.013 \pm 0.09045 N=4			
	S		1.353 \pm 0.05499 N=4			
Probe	CT 18S	CT iNOS	Δ CT	Mittelwert Δ CT K13-16	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K13	21,85121	34,77593	12,92472	13,07609	-0,15138	1,11063
K14	21,36231	34,11856	12,75626		-0,31984	1,24819
K15	22,21234	35,52780	13,31546		0,23937	0,84712
K16	21,92618	35,23412	13,30794		0,23185	0,85154
S14	20,46891	29,07926	8,61035		-4,46575	22,09652
S15	20,43433	29,39338	8,95905		-4,11704	17,35217
S16	20,90777	29,48540	8,57763		-4,49847	22,60337
S17	21,05955	29,48953	8,42998		-4,64611	25,03914
Mittelwerte/SEM	K		1.014 \pm 0.09934 N=4			
	S		21.77 \pm 1.607 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Daten zu Abbildung 14

Probe	CT 18S	CT GLUT-1	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	21,49528	-0,32646	0,00496	-0,33142	1,25825
K18	20,80281	21,10814	0,30533		0,30036	0,81205
K19	20,95668	21,57306	0,61639		0,61142	0,65455
K20	20,64252	20,06713	-0,57539		-0,58036	1,49522
S18	20,70889	19,42944	-1,27945		-1,28442	2,43583
S19	20,69245	19,62638	-1,06607		-1,07103	2,10094
S20	20,85432	19,75608	-1,09824		-1,10321	2,14832
S21	20,80657	19,44923	-1,35733		-1,36230	2,57095
Mittelwerte/SEM		K	1.055 \pm 0.1946 N=4			
		S	2.314 \pm 0.1132 N=4			
Probe	CT 18S	CT GLUT-1	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	35,81658	13,99484	14,40988	-0,41504	1,33334
K18	20,80281	35,33454	14,53173		0,12185	0,91901
K19	20,95668	36,02488	15,06820		0,65832	0,63362
K20	20,64252	34,68727	14,04475		-0,36513	1,28799
S18	20,70889	32,18047	11,47158		-2,93830	7,66509
S19	20,69245	32,46981	11,77736		-2,63252	6,20106
S20	20,85432	32,25886	11,40454		-3,00534	8,02965
S21	20,80657	31,39950	10,59294		-3,81694	14,09335
Mittelwerte/SEM		K	1.043 \pm 0.1651 N=4			
		S	8.997 \pm 1.744 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Daten zu Abbildung 15

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	undetermined				
K18	20,80281	undetermined				
K19	20,95668	undetermined				
K20	20,64252	undetermined				
S18	20,70889	undetermined				
S19	20,69245	undetermined				
S20	20,85432	undetermined				
S21	20,80657	undetermined				

Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	undetermined				
K18	20,80281	undetermined				
K19	20,95668	undetermined				
K20	20,64252	undetermined				
S18	20,70889	undetermined				
S19	20,69245	undetermined				
S20	20,85432	undetermined				
S21	20,80657	undetermined				

Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	41*	19,17826	19,00742	0,17084	0,88833
K18	20,80281	41*	20,19719		1,18977	0,43837
K19	20,95668	41*	20,04333		1,03591	0,48771
K20	20,64252	37,25343	16,61090		-2,39651	5,26529
S18	20,70889	36,76048	16,05159		-2,95583	7,75877
S19	20,69245	41,00000	20,30755		1,30013	0,40609
S20	20,85432	37,43876	16,58444		-2,42297	5,36276
S21	20,80657	36,31285	15,50628		-3,50113	11,32261

Mittelwerte/SEM	K	1.770 \pm 1.169 N=4
	S	6.213 \pm 2.290 N=4

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe; *=als 41 definiert

Daten zu Abbildung 16

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K21-24	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K21	20,53338	35,83983	15,30645	16,05688	-0,75044	1,68230
K22	20,88595	36,90366	16,01771		-0,03918	1,02753
K23	20,64341	36,82565	16,18224		0,12536	0,91678
K24	20,24522	36,96636	16,72114		0,66426	0,63101
S22	20,00990	36,16761	16,15771		0,10083	0,93250
S23	20,12422	35,91742	15,79320		-0,26368	1,20054
S24	19,75566	36,06524	16,30958		0,25270	0,83933
S25	20,26383	35,19337	14,92954		-1,12735	2,18457
Mittelwerte/SEM	K		1.064 \pm 0.2223 N=4			
	S		1.289 \pm 0.3081 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K21-24	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K21	20,53338	undetermined				
K22	20,88595	undetermined				
K23	20,64341	undetermined				
K24	20,24522	undetermined				
S22	20,00990	undetermined				
S23	20,12422	undetermined				
S24	19,75566	undetermined				
S25	20,26383	undetermined				
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K21-24	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K21	20,53338	35,57935	15,04597	16,48927	-1,44330	2,71943
K22	20,88595	37,03544	16,14948		-0,33979	1,26557
K23	20,64341	41*	20,35659		3,86732	0,06852
K24	20,24522	34,65026	14,40504		-2,08423	4,24048
S22	20,00990	34,41304	14,40314		-2,08613	4,24608
S23	20,12422	34,68653	14,56231		-1,92696	3,80253
S24	19,75566	34,88519	15,12953		-1,35974	2,56639
S25	20,26383	34,74599	14,48216		-2,00711	4,01976
Mittelwerte/SEM	K		2.073 \pm 0.9030 N=4			
	S		3.659 \pm 0.3752 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe; *=als 41 definiert

Daten zu Abbildung 17

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K25-28	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K25	20,11242	41*	20,88758	16,80814	4,07944	0,05915
K26	19,85537	35,42798	15,57261		-1,23553	2,35468
K27	20,31933	35,45972	15,14039		-1,66775	3,17719
K28	20,22362	35,85560	15,63198		-1,17616	2,25975
S26	21,18773	36,35453	15,16680		-1,64134	3,11955
S27	20,93603	37,90727	16,97124		0,16310	0,89311
S28	21,16034	36,36494	15,20460		-1,60354	3,03889
S29	21,37404	37,53569	16,16165		-0,64649	1,56536
Mittelwerte/SEM	K		1.963 \pm 0.6671 N=4			
	S		2.154 \pm 0.5516 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K25-28	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K25	20,11242	undetermined				
K26	19,85537	undetermined				
K27	20,31933	undetermined				
K28	20,22362	undetermined				
S26	21,18773	undetermined				
S27	20,93603	undetermined				
S28	21,16034	undetermined				
S29	21,37404	undetermined				
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K25-28	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K25	20,11242	35,31457	15,20215	14,84129	0,36086	0,77870
K26	19,85537	34,89956	15,04419		0,20290	0,86880
K27	20,31933	34,91020	14,59087		-0,25042	1,18955
K28	20,22362	34,75156	14,52794		-0,31335	1,24259
S26	21,18773	34,38809	13,20036		-1,64093	3,11867
S27	20,93603	34,80740	13,87137		-0,96992	1,95873
S28	21,16034	36,01827	14,85792		0,01664	0,98853
S29	21,37404	36,24235	14,86831		0,02702	0,98144
Mittelwerte/SEM	K		1.020 \pm 0.1152 N=4			
	S		1.762 \pm 0.5072 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe; *=als 41 definiert

Daten zu Abbildung 18 – α -PIG Kardiomyozyten Auswertung

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K29-32	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K29	23,73679	undetermined				
K30	22,34440	undetermined				
K31	24,59419	undetermined				
K32	24,91075	undetermined				
S30	22,63844	undetermined				
S31	22,85369	undetermined				
S32	22,86272	undetermined				
S33	20,94934	undetermined				
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K29-32	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K29	23,73679	undetermined				
K30	22,34440	undetermined				
K31	24,59419	undetermined				
K32	24,91075	undetermined				
S30	22,63844	undetermined				
S31	22,85369	undetermined				
S32	22,86272	undetermined				
S33	20,94934	undetermined				
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K29-32	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K29	23,73679	undetermined				
K30	22,34440	undetermined				
K31	24,59419	undetermined				
K32	24,91075	undetermined				
S30	22,63844	undetermined				
S31	22,85369	undetermined				
S32	22,86272	undetermined				
S33	20,94934	undetermined				

Daten zu Abbildung 18 – THP-1 Auswertung

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K33-36	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K33	23,89371	29,82287	5,92916	6,10869	-0,17953	1,13252
K34	21,90743	28,01081	6,10339		-0,00531	1,00368
K35	23,99873	30,75584	6,75711		0,64842	0,63798
K36	24,64759	30,29270	5,64511		-0,46358	1,37896
S34	22,87691	27,09768	4,22077		-1,88792	3,70101
S35	23,49130	26,39590	2,90460		-3,20409	9,21569
S36	22,70101	26,22454	3,52354		-2,58516	6,00081
S37	20,94338	24,95732	4,01394		-2,09475	4,27153
Mittelwerte/SEM		K	1.038 \pm 0.1545 N=4			
		S	5.797 \pm 1.240 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K33-36	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K33	23,89371	33,57638	9,68267	9,58938	0,09329	0,93739
K34	21,90743	31,87978	9,97235		0,38297	0,76686
K35	23,99873	33,66038	9,66165		0,07227	0,95114
K36	24,64759	33,68845	9,04086		-0,54852	1,46259
S34	22,87691	23,86022	0,98331		-8,60607	389,66060
S35	23,49130	23,41832	-0,07298		-9,66237	810,32991
S36	22,70101	23,24440	0,54340		-9,04598	528,58240
S37	20,94338	22,08800	1,14462		-8,44476	348,43915
Mittelwerte/SEM		K	1.029 \pm 0.1503 N=4			
		S	519.3 \pm 104.4 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K33-36	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K33	23,89371	41*	17,10629	16,40561	0,70068	0,61528
K34	21,90743	37,06989	15,16247		-1,24314	2,36713
K35	23,99873	41*	17,00127		0,59566	0,66174
K36	24,64759	41*	16,35241		-0,05320	1,03756
S34	22,87691	34,54989	11,67298		-4,73263	26,58662
S35	23,49130	34,33932	10,84801		-5,55760	47,09812
S36	22,70101	33,84495	11,14395		-5,26166	38,36356
S37	20,94338	32,52900	11,58562		-4,81999	28,24629
Mittelwerte/SEM		K	1.170 \pm 0.4099 N=4			
		S	35.07 \pm 4.779 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe; *=als 41 definiert

Daten zu Abbildung 19

Probe	CT 18S	CT VEGF-A	Δ CT	Mittelwert Δ CT K1-4	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K1	20,71212	22,40215	1,69003	2,20200	-0,51197	1,42600
K2	20,84595	23,51008	2,66413		0,46213	0,72591
K3	20,80691	22,85179	2,04488		-0,15712	1,11506
K4	20,56513	22,97409	2,40897		0,20696	0,86636
S1	20,92156	23,05226	2,13070		-0,07130	1,05066
S2	20,75772	23,01027	2,25255		0,05055	0,96557
S3	21,43410	23,51799	2,08389		-0,11811	1,08531
Mittelwerte/SEM		K	1.033 \pm 0.1536 N=4			
		S	1.034 \pm 0.03557 N=3			
Probe	CT 18S	CT VEGF-A	Δ CT	Mittelwert Δ CT K17-20	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K17	21,82174	22,29300	0,47126	0,87259	-0,40133	1,32073
K18	20,80281	22,15958	1,35676		0,48417	0,71491
K19	20,95668	22,64236	1,68569		0,81310	0,56916
K20	20,64252	20,61917	-0,02335		-0,89594	1,86082
S18	20,70889	19,95349	-0,75540		-1,62799	3,09083
S19	20,69245	20,59818	-0,09427		-0,96686	1,95458
S20	20,85432	20,09553	-0,75879		-1,63138	3,09810
S21	20,80657	19,82928	-0,97728		-1,84987	3,60468
Mittelwerte/SEM		K	1.116 \pm 0.2967 N=4			
		S	2.937 \pm 0.3489 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Daten zu Abbildung 21

Probe	CT 18S	CT TNF- α	Δ CT	Mittelwert Δ CT K37-40	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K37	18,89816	24,57516	5,67699	5,80488	-0,12789	1,09269
K38	18,79495	24,73585	5,94090		0,13602	0,91003
K39	18,81016	24,65702	5,84686		0,04198	0,97132
K40	18,77619	24,53096	5,75477		-0,05011	1,03535
S38	18,72812	18,60986	-0,11826		-5,92314	60,67966
S39	18,60310	18,38551	-0,21759		-6,02247	65,00460
S40	18,91558	18,46003	-0,45555		-6,26043	76,66153
S41	18,99028	18,45176	-0,53852		-6,34341	81,19991
Mittelwerte/SEM	K		1.002 \pm 0.03951 N=4			
	S		70.89 \pm 4.817 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-1 β	Δ CT	Mittelwert Δ CT K37-40	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K37	18,89816	25,60126	6,70310	6,85243	-0,14933	1,10906
K38	18,79495	25,98296	7,18801		0,33558	0,79247
K39	18,81016	25,92710	7,11695		0,26451	0,83248
K40	18,77619	25,17787	6,40167		-0,45076	1,36676
S38	18,72812	17,85015	-0,87796		-7,73040	212,36434
S39	18,60310	17,92178	-0,68132		-7,53375	185,30422
S40	18,91558	18,46266	-0,45292		-7,30535	158,17225
S41	18,99028	18,46886	-0,52142		-7,37386	165,86379
Mittelwerte/SEM	K		1.025 \pm 0.1339 N=4			
	S		180.4 \pm 12.08 N=4			
Probe	CT 18S	CT IL-10	Δ CT	Mittelwert Δ CT K37-40	$\Delta\Delta$ CT	RQ
K37	18,89816	31,90586	13,00770	12,98625	0,02146	0,98524
K38	18,79495	31,54632	12,75137		-0,23487	1,17680
K39	18,81016	31,72030	12,91014		-0,07610	1,05417
K40	18,77619	32,05196	13,27576		0,28952	0,81817
S38	18,72812	32,27892	13,55080		0,56456	0,67616
S39	18,60310	32,17585	13,57275		0,58650	0,66595
S40	18,91558	31,20684	12,29126		-0,69498	1,61886
S41	18,99028	31,24261	12,25233		-0,73392	1,66315
Mittelwerte/SEM	K		1.009 \pm 0.07482 N=4			
	S		1.156 \pm 0.2802 N=4			

K= Kontrollgruppe; S= Stimulationsgruppe

Graphen zu Kapitel 3.2.2

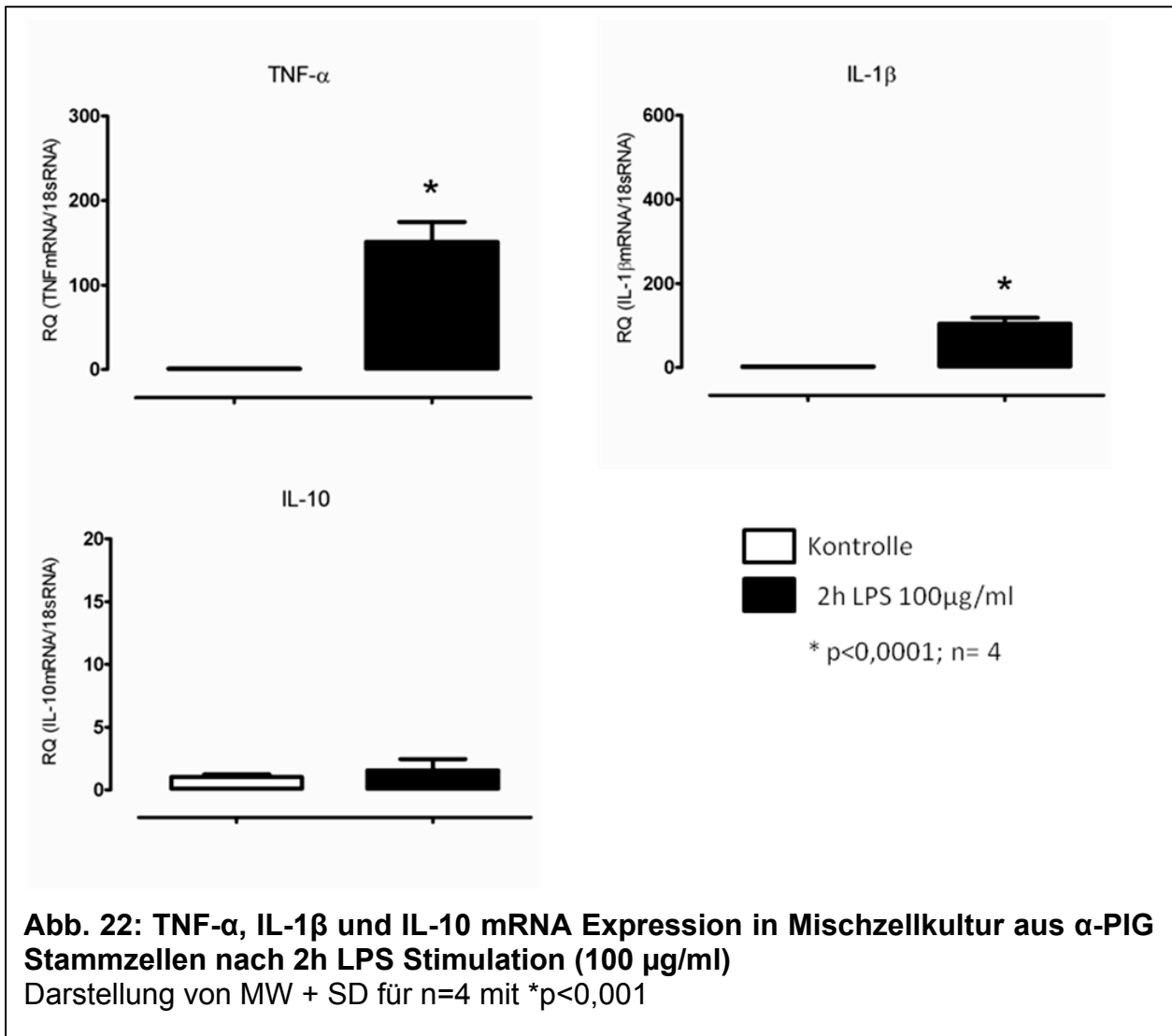
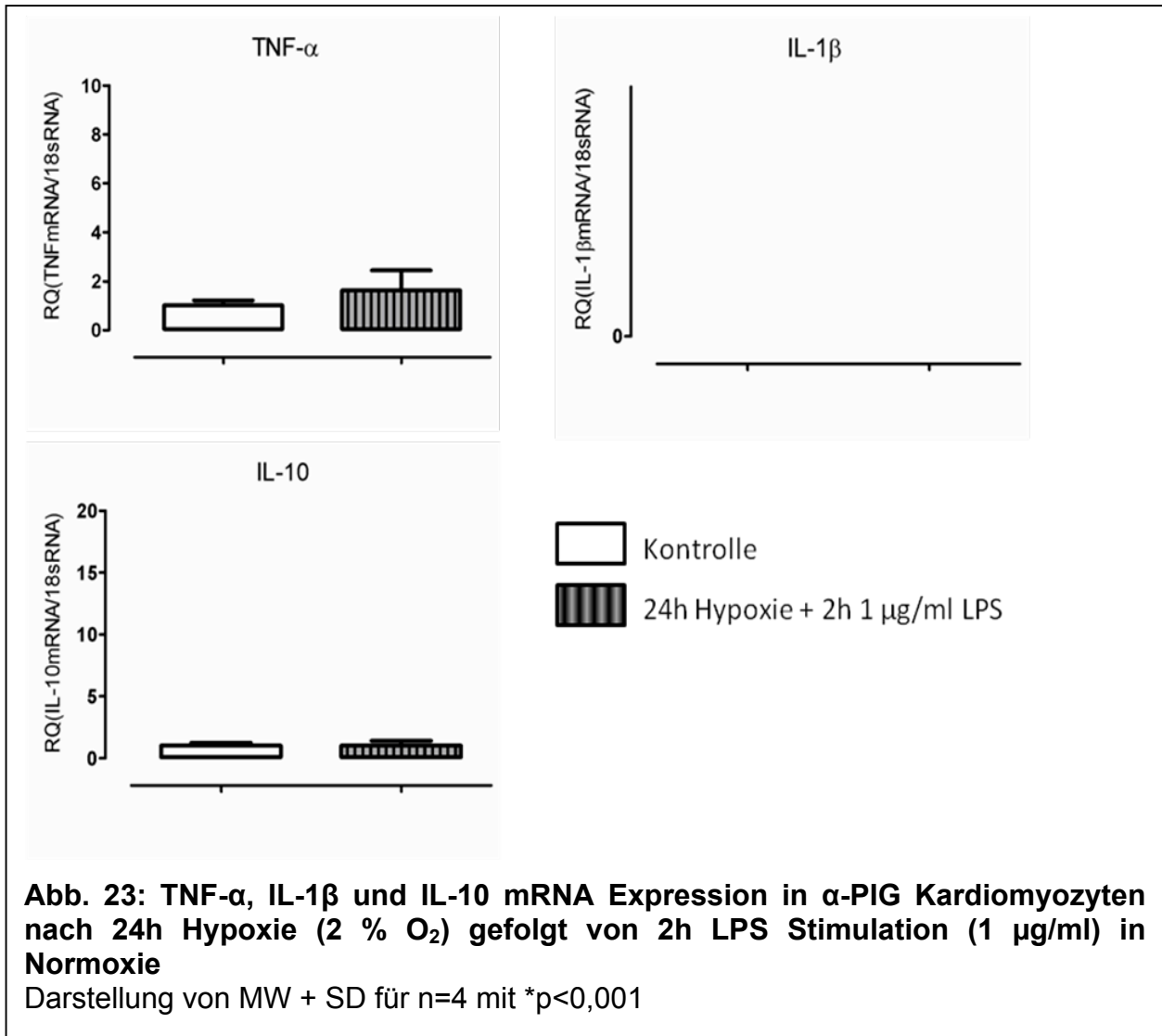
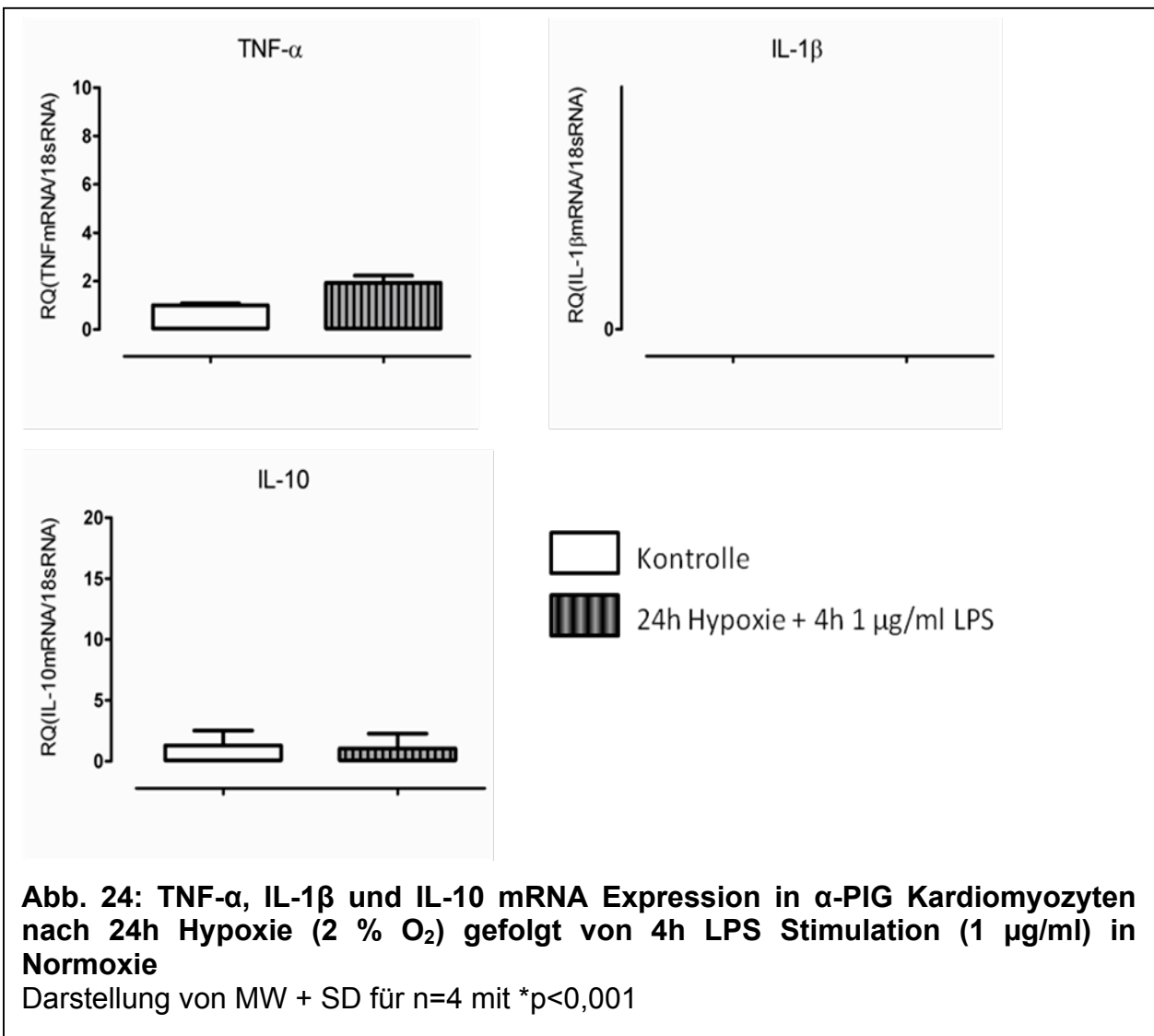


Abb. 22: TNF- α , IL-1 β und IL-10 mRNA Expression in Mischzellkultur aus α -PIG Stammzellen nach 2h LPS Stimulation (100 μ g/ml)
Darstellung von MW + SD für n=4 mit *p<0,001

Graphen zu Kapitel 3.4





7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: α -PIG Konstrukt	17
Abb. 2: α -PIG Stammzellkultur	18
Abb. 3: α -PIG EBs Tag 9 der Differenzierung	19
Abb. 4: α -PIG EBs Tag 12 der Differenzierung	20
Abb. 5: α -PIG Kardiomyozyten vor Experiment	22
Abb. 6: Lambert-Beersche Gesetz	27
Abb. 7: RNA Qualitätskontrolle	28
Abb. 8: α -PIG Kardiomyozyten Rezeptorenanalyse	39
Abb. 9: Fluoreszenzfärbung unstimulierter α -PIG Kardiomyozyt	40
Abb. 10: IL-10 Expression nach LPS Stimulation der α -PIG Kardiomyozyten	41
Abb. 11: Mischkultur Rezeptorenanalyse	43
Abb. 12: Mischzellkultur Zytokinanalyse	44
Abb. 13: Kontrolle hypoxischer Reiz 6h	45
Abb. 14: Kontrolle hypoxischer Reiz 24h	46
Abb. 15: Zytokinanalyse Hypoxische Stimulation α -PIG Kardiomyozyten	46
Abb. 16: Kombinierte Stimulation an α -PIG Kardiomyozyten 26h	47
Abb. 17: Kombinierte Stimulation an α -PIG Kardiomyozyten 28h	48
Abb. 18: Kokultur von α -PIG Kardiomyozyten und THP-1 Zellen	50
Abb. 19: VEGF-A mRNA Expression in α -PIG Kardiomyozyten	51
Abb. 20: Primäre Fibroblasten Fluoreszenzfärbung	54
Abb. 21: LPS Stimulation Primäre Fibroblasten	55
Abb. 22: Mischzellkultur Zytokinanalyse 2h	81
Abb. 23: Kombinierte Stimulation an α -PIG Kardiomyozyten 26h	82
Abb. 24: Kombinierte Stimulation an α -PIG Kardiomyozyten 28h	83

8. Literaturverzeichnis

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413: 732-738

Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 13-19

Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985; 42: 791-798

Asanuma H, Fujihashi K, Miyakoshi T, Yoshikawa T, Fujita-Yamaguchi Y, Kojima N, Nakata M, Suzuki Y, Tamura S, Kurata T, Sata T. Long- and short-time immunological memory in different strains of mice given nasally an adjuvant-combined nasal influenza vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 39-40

Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dober N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-3017

Bailly S, Ferrua B, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA. Differential regulation of IL 6, IL 1 A, IL 1 beta and TNF alpha production in LPS-stimulated human monocytes: role of cyclic AMP. *Cytokine* 1990; 2: 205-210

Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668-673

Baumgarten G, Kim SC, Stapel H, Vervolgyi V, Bittig A, Hoefft A, Meyer R, Grohe C, Knuefermann P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. *Basic Res Cardiol* 2006a; 101: 427-435

Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoefft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer, R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006b; 25: 43-49

Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12: 393-416

Berra E, Ginouves A, Pouyssegur J. The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 2006; 7: 41-45

Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X. Genetic analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. *Adv Exp Med Biol* 2005; 560: 29-39

Boyd JH, Mathur S, Wang Y, Bateman RM, Walley KR. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 384-393

Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, Fries JW, Tiemann K, Bohlen H, Hescheler J, Welz A, Bloch W, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007; 110: 1362-1369

Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D. Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res* 2011; 2011: 207326

Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25: 169-193

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeys S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380: 435-439

Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002; 297: 1299

Chang EY, Guo B, Doyle SE, Cheng G. Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production. *J Immunol* 2007; 178: 6705-6709

Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1-12

Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-9525

Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo NJ Jr. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2979-2984

Comstock KL, Krown KA, Page MT, Martin D, Ho P, Pedraza M, Castro EN, Nakajima N, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. LPS-induced TNF-alpha release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 2761-2775

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470-1478

Dasu MR, Devaraj S, Jialal I. High glucose induces IL-1beta expression in human monocytes: mechanistic insights. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E337-E346

- Dery MA, Michaud MD, Richard DE. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 535-540
- Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* 2009; 82: 59-66
- Dziarski R, Gupta D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *J Endotoxin Res* 2000; 6: 401-405
- Dziarski R, Viriyakosol S, Kirkland TN, Gupta D. Soluble CD14 enhances membrane CD14-mediated responses to peptidoglycan: structural requirements differ from those for responses to lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2000; 68: 5254-5260
- Ehrentraut S, Lohner R, Schwederski M, Ehrentraut H, Boehm O, Noga S, Langhoff P, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. In vivo Toll-like receptor 4 antagonism restores cardiac function during endotoxemia. *Shock* 2011; 36: 613-620
- Emes RD, Goodstadt L, Winter EE, Ponting CP. Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 701-709
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18: 4-25
- Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-447
- Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J* 2006; 396: 517-527
- Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351: 355-356
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 225-260
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52: 269-279
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410: 1099-1103
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745
- Herold G. Kardiologie. In: Herold G. ed. *Herold Innere Medizin*. Köln: 2010: 239

Hojo Y, Ikeda U, Zhu Y, Okada M, Ueno S, Arakawa H, Fujikawa H, Katsuki T, Shimada K. Expression of vascular endothelial growth factor in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 968-973

Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-7992

Inagawa K, Ieda M. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiac myocytes. *J Cardiovasc Transl Res* 2013; 6: 37-45

Ishihara M, Sato H, Tateishi H, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Sakai K, Ueda K. Implications of prodromal angina pectoris in anterior wall acute myocardial infarction: acute angiographic findings and long-term prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 970-975

Jones SP, Trocha SD, Lefer DJ. Cardioprotective actions of endogenous IL-10 are independent of iNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H48-H52

Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Arranz A, Martinez C, Abad C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP. VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF-alpha treatment in human synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1070: 359-364

Jung F, Palmer LA, Zhou N, Johns RA. Hypoxic regulation of inducible nitric oxide synthase via hypoxia inducible factor-1 in cardiac myocytes. *Circ Res* 2000; 86: 319-325

Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; 13: 460-469

Kim SC, Ghanem A, Stapel H, Tiemann K, Knuefermann P, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, Knowlton AA, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 deficiency: smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiol* 2007; 7: 5

Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-224

Knuefermann P, Nemoto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG. Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? *Chest* 2002a; 121: 1329-1336

Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002b; 106: 2608-2615

Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates Staphylococcus aureus-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004a; 110: 3693-3698

Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rudiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohe C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26-35

Knuefermann P, Vallejo J, Mann DL. The role of innate immune responses in the heart in health and disease. *Trends Cardiovasc Med* 2004b; 14: 1-7

Kolossov E, Bostani T, Roell W, Breitbach M, Pillekamp F, Nygren JM, Sasse P, Rubenchik O, Fries JW, Wenzel D, Geisen C, Xia Y, Lu Z, Duan Y, Kettenhofen R, Jovinge S, Bloch W, Bohlen H, Welz A, Hescheler J, Jacobsen SE, Fleischmann BK. Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium. *J Exp Med* 2006; 203: 2315-2327

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377

LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234

Lagasse E, Shizuru JA, Uchida N, Tsukamoto A, Weissman IL. Toward regenerative medicine. *Immunity* 2001; 14: 425-436

Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 beta. *J Immunol* 1993; 150: 2659-2667

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86: 973-983

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246: 1306-1309

Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 1996; 270: H1803-H1811

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274: 33419-33425

Markowski P, Boehm O, Goelz L, Haesner AL, Ehrentraut H, Bauerfeld K, Tran N, Zacharowski K, Weisheit C, Langhoff P, Schwederski M, Hilbert T, Klaschik S, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Knuefermann P. Pre-conditioning with synthetic CpG-oligonucleotides attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via IL-10 up-regulation. *Basic Res Cardiol* 2013; 108: 376

McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 1341-1346

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-344

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397

Meybohm P, Zacharowski K, Cremer J, Roesner J, Kletzin F, Schaelte G, Felzen M, Strouhal U, Reyher C, Heringlake M, Schon J, Brandes I, Bauer M, Knuefermann P, Wittmann M, Hachenberg T, Schilling T, Smul T, Maisch S, Sander M, Moormann T, Boening A, Weigand MA, Laufenberg R, Werner C, Winterhalter M, Treschan T, Stehr SN, Reinhart K, Hasenclever D, Brosteanu O, Bein B. Remote ischaemic preconditioning for heart surgery. The study design for a multi-center randomized double-blinded controlled clinical trial--the RIPHeart-Study. *Eur Heart J* 2012; 33: 1423-1426

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKecher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000; 290: 1779-1782

Mouse Phenome Database, 2013: Mouse strain: 129S2/SvPas
<http://phenome.jax.org/db/q?rtn=strains/details&strainid=840> (20.05.2013)

Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668

Neri M, Fineschi V, Di PM, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani D. Cardiac Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Response After Myocardial Infarction. *Curr Vasc Pharmacol* 2013 (Epub)

Nguyen SV, Claycomb WC. Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 265: 382-386

Niessner A, Steiner S, Speidl WS, Pleiner J, Seidinger D, Maurer G, Goronzy JJ, Weyand CM, Kopp CW, Huber K, Wolzt M, Wojta J. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis* 2006; 189: 408-413

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494-501

Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis* 1999; 180: 1584-1589

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705

Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 2152-2165

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088

Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation* 2009; 120: 2105-2112

Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001; 155: 733-738

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem* 1997; 272: 11205-11214

Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature* 2008; 453: 807-811

Rook MB, de Jonge B, Jongsma HJ, Masson-Pevet MA. Gap junction formation and functional interaction between neonatal rat cardiocytes in culture: a correlative physiological and ultrastructural study. *J Membr Biol* 1990; 118: 179-192

Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H1723-H1741

Sanchez A, Jones WK, Gulick J, Doetschman T, Robbins J. Myosin heavy chain gene expression in mouse embryoid bodies. An in vitro developmental study. *J Biol Chem* 1991; 266: 22419-22426

Schook LB, Albrecht H, Gally P, Jongeneel CV. Cytokine regulation of TNF-alpha mRNA and protein production by unprimed macrophages from C57Bl/6 and NZW mice. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 514-520

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 17406-17409

Sharma T, Dhingra R, Singh S, Sharma S, Tomar P, Malhotra M, Bhardwaj TR. Aflibercept: A novel VEGF targeted agent to explore the future perspectives of anti-angiogenic therapy for the treatment of multiple tumors. *Mini Rev Med Chem* 2013; 13: 530-540

Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, Aupetit JF, Bonnefoy E, Finet G, Andre-Fouet X, Ovize M. Postconditioning the human heart. *Circulation* 2005; 112: 2143-2148

Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-46

Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, Knuefermann P, Hoefft A, Meyer R, Grohe C, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail* 2006; 8: 665-672

Statistisches Bundesamt, 2012: Todesursachen in Deutschland 2011
<https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html> (15.12.2012)

Stoelzle S, Haythornthwaite A, Kettenhofen R, Kolosov E, Bohlen H, George M, Bruggemann A, Fertig N. Automated patch clamp on mESC-derived cardiomyocytes for cardiotoxicity prediction. *J Biomol Screen* 2011; 16: 910-916

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3516-3521

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676

Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, Andre-Fouet X, Macia JC, Raczka F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 2008; 117: 1037-1044

Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 127-137

Velten M, Duerr GD, Pessies T, Schild J, Lohner R, Mersmann J, Dewald O, Zacharowski K, Klaschik S, Hilbert T, Hoefft A, Baumgarten G, Meyer R, Boehm O, Knuefermann P. Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc Res* 2012; 96: 422-432

Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259

Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med* 2005; 201: 105-115

Wang N, Gates KL, Trejo H, Favoreto S Jr, Schleimer RP, Sznajder JI, Beitel GJ, Sporn PH. Elevated CO₂ selectively inhibits interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and decreases phagocytosis in the macrophage. *FASEB J* 2010; 24: 2178-2190

Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433

Wright SD, Tobias PS, Ulevitch RJ, Ramos RA. Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages. *J Exp Med* 1989; 170: 1231-1241

Yu X, Deng L, Wang D, Li N, Chen X, Cheng X, Yuan J, Gao X, Liao M, Wang M, Liao Y. Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol* 2012; 53: 848-857

Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J* 2008; 3: 112-123

Zentilin L, Puligadda U, Lionetti V, Zacchigna S, Collesi C, Pattarini L, Ruozi G, Camporesi S, Sinagra G, Pepe M, Recchia FA, Giacca M. Cardiomyocyte VEGFR-1 activation by VEGF-B induces compensatory hypertrophy and preserves cardiac function after myocardial infarction. *FASEB J* 2010; 24: 1467-1478

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Pascal Knüfermann für die Möglichkeit meiner Promotion und das in mich gesetzte Vertrauen. Ich bin sehr dankbar für die zuverlässige, umfassende und sehr freundliche Unterstützung während des gesamten Verlaufs.

Herrn Prof. Dr. Bernd K. Fleischmann sowie Herrn Prof. Dr. Andreas Hoeft danke ich für die Möglichkeit der Mitarbeit in den Laboren ihrer Institute.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Daniela Wenzel, Frau PD Dr. Stilla Frede und Herrn Dr. Olaf Boehm bedanken. Sie standen mir bei jeglichen Fragen stets zur Seite. Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Baumgarten/Knüfermann sowie denen der AG Fleischmann, die mir ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen und mir das Arbeiten in angenehmer Atmosphäre erleichterten.

Außerdem danke ich Laura und meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung und Motivation in den vergangenen Jahren.