

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün**

**Identifizierung und Charakterisierung  
koronarer Gefäßwand-residenten Stammzellen**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Kornelia Löw**

**aus Haibach**

**Würzburg, Dezember 2019**

**Referent:** Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Korreferent:** Prof. Dr. med. Christoph Maack

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2020**

**Die Promovendin ist Ärztin**

**Geh nicht nur die glatten Straßen. Geh Wege, die noch niemand ging,  
damit du Spuren hinterlässt und nicht nur Staub.**

Antoine de Saint-Exupéry (1900-1944)

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Kardiovaskuläres System	1
1.1.1	Anatomie und Funktionsweise des Herzens	1
1.1.2	Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems	2
1.2	Angiogenese in Entwicklung und pathologischen Prozessen	4
1.2.1	Vaskulogenese und Angiogenese in der Embryonalentwicklung	4
1.2.2	Angiogenese in pathologischen Prozessen	5
1.3	Regulation und Steuerung der Angiogenese	6
1.3.1	Bedeutung der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF	6
1.3.2	Inhibierung der Angiogenese durch den Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib	8
1.3.3	Bedeutung und Beeinflussungsmöglichkeiten des Wnt-Signalwegs	8
1.4	Stammzellen	9
1.4.1	Ursprung und Charakteristika embryonaler und adulter Stammzellen	9
1.4.2	Stammzellmarker	10
1.4.2.1	CD34	10
1.4.2.2	CD44	11
1.4.3	Gefäßwand-residente Stamm- und Progenitorzellen	11
1.4.3.1	Stammzellnischen der Gefäßwand	12
1.4.3.2	Merkmale und Differenzierungspotenzial Gefäßwand-residenter Stamm- und Progenitorzellen	12

1.4.3.3 Rolle Gefäßwand-residenter Stamm- und Progenitorzellen in pathologischen Prozessen	14
1.5 Myokardinfarkt	14
1.5.1 Grundlagen und Pathophysiologie des Myokardinfarkts	15
1.5.2 Therapie und kardioregenerative Ansätze	15
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Material</b>	<b>18</b>
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Zellkulturchemikalien	19
2.1.3 Zellkulturmedien	20
2.1.4 Puffer und Lösungen	20
2.1.5 Antikörper	21
2.1.6 Zytokine und Inhibitoren	22
2.1.7 Kits	22
2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.9 Software	24
<b>2.2 Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1 Cardiac Angiogenesis Assay	25
2.2.1.1 Präparation des murinen kardialen Gewebes	25
2.2.1.2 Einbettung des Gewebes in Kollagenmatrix	25

2.2.1.3 Kultivierung des Gewebes und Dokumentation des Sproutings	26
2.2.1.4 Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes	28
2.2.1.5 Herstellung der Paraffinschnitte	29
2.2.2 Methoden zur Antigendetektion	30
2.2.2.1 Auswahl adäquater Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
2.2.2.2 Immunhistochemie	31
2.2.2.3 Immunfluoreszenz	32
2.2.3 Quantifizierung und statistische Analyse	33
2.2.3.1 Quantifizierung des Sproutings im CAA	33
2.2.3.2 Histologische Quantifizierung	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 Etablierung verschiedener Kultivierungsbedingungen für den CAA und deren Auswirkungen auf das Sprouting	35
3.1.1 Maximales Sprouting wird durch die Kultivierung basisnaher Herzsegmente unter Normoxie und Zugabe von PDGF-BB erreicht	35
3.1.2 Inhibierung des Wnt-Signalwegs resultiert in verringertem Sprouting	38
3.1.3 Clodronat-Liposomen induzieren eine Veränderung der Morphologie des Sproutings	39
3.1.4 Lenvatinib bewirkt eine Blockade des Sproutings	42
3.2 Histologische Untersuchungen an kardialen Gewebeproben	44
3.2.1 Kultivierung im CAA resultiert in einer veränderten Gewebemorphologie	44

3.2.2	Charakterisierung Gefäßwand-residenter CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	45
3.2.2.1	Kardiales Sprouting induziert eine Aktivierung und Mobilisierung von CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	45
3.2.2.2	In frisch isoliertem Gewebe besteht eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1	49
3.2.2.3	Lenvatinib reduziert die Aktivierung und Mobilisierung von CD34 <sup>+</sup> Stammzellen	50
3.2.3	Gefäßwand-residente CD44 <sup>+</sup> Stammzellen im CAA	51
3.2.3.1	Kardiales Sprouting erhöht den Anteil proliferativer CD44 <sup>+</sup> Zellen im CAA	52
3.2.3.2	Lenvatinib verringert die Anzahl und die Migration von CD44 <sup>+</sup> Zellen im CAA	53
3.2.4	Charakterisierung von F4/80 <sup>+</sup> Zellen	54
3.2.4.1	Lenvatinib bewirkt eine Blockade von F4/80 <sup>+</sup> Zellen im CAA	54
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
4.1	Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Angiogenese-Kapazität im CAA	56
4.2	Auswirkungen der Kultivierung im CAA auf histologischer Ebene	57
4.3	Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Angiogenese im CAA	60
4.4	Einfluss der Clodronat-vermittelten Depletion der Makrophagen auf die Angiogenese <i>ex vivo</i>	61

4.5	Auswirkungen von Lenvatinib auf die Angiogenese-Kapazität im CAA und auf histologischer Ebene	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	

## 1. Einleitung

### 1.1 Kardiovaskuläres System

#### 1.1.1 Anatomie und Funktionsweise des Herzens

Mit einer Pumpleistung von über 7000 Litern Blut pro Tag stellt das Herz die Versorgung des menschlichen Körpers mit Sauerstoff und Nährsubstraten sicher.

Bestehend aus einer rechten und einer linken Herzhälfte mit jeweils einem Atrium und einem Ventrikel, liegt das circa 300 g schwere Organ, umgeben von Perikard, im mittleren unteren Mediastinum des Thorax. Der gerichtete Blutstrom durch das Herz wird durch die Ventilfunktion der Segelklappen zwischen Vorhöfen und Kammern sowie der Taschenklappen an der Grenze zu *Truncus pulmonalis* bzw. Aorta gewährleistet (Gavaghan, 1998). Dabei fließt das venöse, desoxygenierte Blut aus dem Körperkreislauf über die *Vena cava superior* und *inferior* in das rechte Atrium und von dort über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel. Nach Erreichen der Lunge über die Pulmonalklappe und den *Truncus pulmonalis* gelangt das oxygenierte Blut über die vier Pulmonalvenen in das linke Herz, das aus linkem Atrium, Mitralklappe und linkem Ventrikel besteht. In jeder Systole werden physiologisch circa 70 ml des sich im Ventrikel befindlichen Blutvolumens durch die Aortenklappe in die *Aorta ascendens* und damit in den Körperkreislauf ausgeworfen (Flanigan and Gaskell, 2004). Dieser sogenannten Austreibungsphase ist, als zweiter Abschnitt der Systole, die isovolumetrische Anspannungsphase vorgeschaltet, in der sich der Ventrikellinnendruck durch Kontraktion des Myokards erhöht. Das Öffnen der Taschenklappen markiert den Beginn der Austreibungsphase. Mit zunehmendem Schlagvolumen fällt der Druck in den Ventrikeln ab, was zum Schluss der Taschenklappen und damit zum Ende der Systole führt. Anschließend beginnt die Diastole mit der isovolumetrischen Entspannungsphase, die durch einen weiteren Druckabfall in den Ventrikeln gekennzeichnet ist. Diese endet, sobald sich die Segelklappen öffnen. In der nachfolgenden Füllungsphase nimmt das in den Ventrikeln befindliche Blutvolumen sowohl durch den passiven Einstrom des Blutes aus den Atrien als auch durch die Vorhofkontraktion zu (Pape et al., 2014; Gekle et al., 2015).

Die Diastole dient jedoch nicht nur der Entspannung und Füllung der Ventrikel, sondern weiterhin wird in dieser Phase die Blutversorgung des Herzens selbst sichergestellt.

Diese wird durch die beiden Koronararterien *Arteria coronaria sinistra (LCA)* und *Arteria coronaria dextra (RCA)*, die als erste Äste aus der *Aorta ascendens* hervorgehen, gewährleistet. Nach kurzem Verlauf zwischen dem *Truncus pulmonalis* und dem linken Herzohr verzweigt sich die LCA als Größere der beiden Koronararterien in ihre zwei Hauptäste *Ramus interventricularis anterior (RIVA)* und *Ramus circumflexus (RCX)*. Der RIVA führt anschließend im *Sulcus interventricularis anterior* zum Apex des Herzens und gibt sowohl Septaläste zur Versorgung des vorderen Ventrikelseptums als auch Diagonaläste zur Vorderwand des linken Ventrikels ab. Der RCX verläuft dahingegen im *Sulcus coronarius* zwischen Atrien und Ventrikeln und versorgt mit seinem größten Ast *Ramus marginalis sinister* die Seitenwand des linken Ventrikels. Analog dazu zieht die RCA nach ihrem Ursprung aus der Aorta durch den rechten Abschnitt des *Sulcus coronarius* zur *Facies diaphragmatica* des Herzens und läuft als *Ramus interventricularis posterior* Richtung Herzspitze. Auf ihrem Weg dorthin zweigen Äste zur Versorgung des Sinusknotens, des AV-Knotens und der Wand des rechten Ventrikels ab (Kini et al., 2007; Hosapatna et al., 2013).

### **1.1.2 Aufbau und Funktion des Blutgefäßsystems**

Die Blutgefäße fungieren als Transportsystem für das Blut vom Herzen zur Peripherie sowie von der Peripherie wieder zurück zum Herzen und sind damit wesentlich an der kontinuierlichen Versorgung des Körpers mit Sauerstoff, Nährstoffen und Elektrolyten sowie am Abtransport von Kohlenstoffdioxid und Stoffwechselprodukten beteiligt (Pugsley and Tabrizchi, 2000).

Durch die Unterteilung des Blutkreislaufs anhand des intravaskulären Drucks in ein Hochdruck- und ein Niederdrucksystem ergeben sich die unterschiedlichen Funktionen der Gefäßabschnitte. Die Arterien des Körperkreislaufs, in denen der mittlere Druck circa 100 mmHg beträgt und die zusammen mit dem linken Ventrikel das Hochdrucksystem bilden, erfüllen vor allem eine Druckspeicherfunktion. Das während der Systole pulsatil aus dem linken Ventrikel ausgeworfene Blut führt zu einer Wanddehnung der Aorta und der großen Arterien, die die dadurch gespeicherte Energie in der Diastole wiederum an das Blut abgeben. Dieser auch als Windkesselfunktion bezeichnete Mechanismus ermöglicht eine kontinuierliche Blutströmung durch die Blutgefäße (Pape et al., 2014; Schünke et al., 2014; Gekle et al., 2015). Zur Peripherie hin verkleinert sich

der Durchmesser der einzelnen Gefäße, wodurch der Einfluss auf die Stromstärke und den Strömungswiderstand deutlich zunimmt. Erklären lässt sich dies durch das Hagen-Poiseuille-Gesetz, nach dem die Stromstärke und damit das pro Zeiteinheit durch ein Gefäß fließende Volumen sich direkt und der Widerstand sich indirekt proportional zur vierten Potenz des Gefäßinnenradius verhält. Mit Hilfe der glatten Muskelzellen gelingt es somit den kleinen Arterien und Arteriolen, durch Vasokonstriktion und -dilatation, die Organdurchblutung effektiv zu regulieren. Weiterhin fungieren sie als Widerstandsgefäße, in denen der Blutdruck stark abfällt. Das sich anschließende Niederdrucksystem umfasst neben den Kapillaren und dem venösen System auch das rechte Herz, den Lungenkreislauf, das linke Atrium und während der Diastole ebenso den linken Ventrikel (Pape et al., 2014; Gekle et al., 2015). Durch ausgeprägte Verzweigungen vergrößert sich die Gesamtquerschnittsfläche des Kapillarnetzes und der postkapillären Venolen auf ein Vielfaches des übrigen Gefäßsystems, was wiederum eine Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit zur Folge hat. Dies begünstigt den in diesem Abschnitt stattfindenden Stoffaustausch zwischen Blut und Interstitium. Die Venen, durch die das sauerstoffarme Blut zurück zum Herz gelangt, dienen aufgrund der hohen Dehnbarkeit zudem als Kapazitätsgefäße. Damit erfüllt das Niederdrucksystem, das circa 80 % der gesamten Blutmenge aufnimmt, eine Volumenspeicherfunktion (Pape et al., 2014).

Die unterschiedlichen Funktionen spiegeln sich ebenso in der histologischen Beschaffenheit der Gefäße wider. Im Vergleich zum dreischichtigen Aufbau größerer Gefäße besitzen Kapillaren nur eine relativ dünne Wand, die den Gas- und Stoffaustausch ermöglicht. Dabei kleiden Endothelzellen (ECs) das Lumen aus, während die umgebenden Perizyten die kontraktile Komponente darstellen. Eingebettet sind sie in eine gemeinsame Basallamina (Ergün et al., 2011). Im Gegensatz dazu weisen die als Widerstandsgefäße dienenden Arteriolen bereits glatte Muskelzellen auf (Wörsdörfer et al., 2017). Die Struktur größerer Arterien oder Venen, die sich prinzipiell nicht voneinander unterscheidet, gliedert sich in die drei Schichten *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia*. Bestehend aus dem Endothel, dem subendothelialen Bindegewebe und der *Membrana elastica interna*, bildet die Intima eine Barriere zum angrenzenden Gefäßlumen. Während sich die Media aus glatten Muskelzellen und der *Membrana elastica externa* zusammensetzt, stellt die Adventitia einen Verband aus lockerem Bindegewebe dar (Ergün et al., 2011; Wörsdörfer et al.,

2017). Dieser dient der Verankerung des Gefäßes in der Umgebung und enthält Fibroblasten, Progenitor- und Immunzellen sowie Nerven, Lymph- und Blutgefäße, die als *Vasa vasorum* äußere Wandschichten größerer Gefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Ergün et al., 2011; Stenmark et al., 2013). Der eben beschriebene dreischichtige Aufbau variiert jedoch in verschiedenen Abschnitten des vaskulären Systems. Herzferne, kleinere Arterien vom muskulären Typ enthalten dicht gepackte, glatte Muskelzellen, wohingegen die *Membrana elastica externa* und *Vasa vasorum* fehlen können. Dahingegen gehören größere, herznahe Arterien zum elastischen Typ. Bei diesen ermöglicht ein großer Anteil an elastischen Fasern den bereits erörterten Windkesselmechanismus, der eine kontinuierliche Blutströmung sicherstellt. Auch die insgesamt dünnere Wand der Venen zeigt die Unterteilung in Intima, Media und Adventitia, wobei sich die *Tunica media* meist aufgelockert mit eingelagertem Bindegewebe präsentiert. Durch das größere Lumen wird zudem die Funktion als Volumenspeicher gewährleistet (Benninghoff et al., 2011).

### **1.2 Angiogenese in Entwicklung und pathologischen Prozessen**

Die Entstehung von Gefäßen stellt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise bei Wundheilung, Arteriosklerose oder Tumorwachstum, einen zentralen Faktor dar. Dabei lassen sich zwei grundlegende Prinzipien voneinander unterscheiden: die Vaskulogenese und die Angiogenese. Als Vaskulogenese wird die *de novo* Bildung von Blutgefäßen durch embryonale oder aus dem Knochenmark stammende Vorläuferzellen bezeichnet. Diese spielt vor allem während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, tritt aber ebenso im adulten Organismus auf. Demgegenüber steht die Angiogenese, die die Formierung von Gefäßen ausgehend von einem bereits bestehenden vaskulären System beschreibt (Risau, 1997; Carmeliet, 2000, 2004; Ergün et al., 2011).

#### **1.2.1 Vaskulogenese und Angiogenese in der Embryonalentwicklung**

Die Vaskulogenese setzt in der dritten Woche der Embryonalperiode ein. Aus dem Mesoderm entstehen zunächst die Hämangioblasten, die sich zu inselartigen Aggregaten, den sogenannten Blutinseln, formieren. Die peripher gelegenen Angioblasten der Blutinseln differenzieren im Laufe der Entwicklung zu ECs, während

die zentral gelegenen Zellen als Vorläufer von hämatopoetischen Zellen dienen (Risau and Flamme, 1995; Benninghoff et al., 2011). Nach der Differenzierung entsteht durch die Anordnung der ECs ein Lumen, weiterhin kommt es zur Ablagerung einer Basallamina. Zusammen mit der Fusion der Blutinseln resultiert dies schließlich in der Bildung eines primären Gefäßplexus (Risau and Flamme, 1995). Der überwiegende Anteil der embryonalen Gefäße wird jedoch durch Angiogenese gebildet. Einen Mechanismus stellt dabei das gezielte Auswachsen von Gefäßen, das sogenannte Sprouting, dar, das im Folgenden näher beschrieben werden soll. Zunächst steht der proteolytische Abbau der Basallamina und die Loslösung der Perizyten von den Kapillaren im Vordergrund (Patel-Hett and DAmore, 2011). Unter dem Einfluss von VEGF (Vascular endothelial growth factor) -A als angiogenetischer Stimulus kommt es zur Migration der ECs, insbesondere der sogenannten tip cells (Gerhardt and Betsholtz, 2005), die sich an der Spitze der Aussprossungen befinden. Durch Proliferation der sich anschließenden Zellen, den stalk cells (Gerhardt and Betsholtz, 2005), formiert sich eine endotheliale Röhre mit dazugehörigem Lumen. Die Entstehung einer Basallamina und die Anlagerung von Perizyten bzw. glatten Muskelzellen bewirken schließlich eine Stabilisierung des neuen Gefäßes (Risau, 1997; Gerhardt et al., 2003; Gerhardt and Betsholtz, 2005; Patel-Hett and DAmore, 2011).

### **1.2.2 Angiogenese in pathologischen Prozessen**

In zahlreichen pathologischen Prozessen kommt der Angiogenese eine zentrale Bedeutung zu. Als wichtigstes Beispiel dienen dabei maligne Tumore. Überschreitet die Größe eines Tumors die maximale Diffusionsstrecke für Sauerstoff, wird durch die Neubildung von Gefäßen dessen Versorgung sichergestellt (Chung and Ferrara, 2011). Jedoch stellt die Angiogenese auch für das Wachstum arteriosklerotischer Läsionen einen entscheidenden Mechanismus dar. So resultiert die Behandlung der für Arteriosklerose anfälligeren Apolipoprotein-E-defizienten Mäuse mit einem Angiogeneseinhibitor in einer reduzierten Plaquegröße (Moulton et al., 1999). Im Rahmen von solchen pathologischen Vorgängen ist die stattfindende Gefäßneubildung häufig mit einer Inflammationsreaktion assoziiert. Dies ist durch die Einwanderung von Immunzellen sowie durch Verminderung des Sauerstoffanteils, der sogenannten Hypoxie, gekennzeichnet (Szade et al., 2015). Der hypoxische Zustand führt zur

Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF), ein für die Regulation der Angiogenese und der Inflammation bedeutender Transkriptionsfaktor (Eltzschig und Carmeliet, 2011; Szade et al., 2015). HIF bewirkt unter anderem die vermehrte Expression von proinflammatorischen und proangiogenen Faktoren, wie beispielsweise VEGF-A oder PDGF (Platelet-derived growth factor) (Kaidi et al., 2006; Szade et al., 2015). Von zentraler Bedeutung bei der Induktion und Regulation der Angiogenese sind weiterhin die durch eine hohe Expression des Glykoproteins F4/80 gekennzeichneten Makrophagen. Durch Freisetzung verschiedener proangiogener Faktoren, wie zum Beispiel VEGF-A, fördern diese Immunzellen die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Sanberg et al., 2009; Kang et al., 2017). Auch die Bildung von Matrix-Metalloproteinasen und weiteren proteolytischen Enzymen, die zur Auflockerung der Extrazellulärmatrix führt, erleichtert die für die Angiogenese wichtige Migration der ECs (Dirkx et al., 2006; Sanberg et al., 2009).

### **1.3 Regulation und Steuerung der Angiogenese**

Die Regulation der Angiogenese unterliegt einem komplexen Zusammenspiel unterschiedlichster Zellen, Faktoren und Signalketten. Im Folgenden sollen die für die vorliegende Arbeit wichtigen Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF, deren Rezeptoren sowie eine mögliche Inhibierung dieser durch den Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib beschrieben werden. Auch der für die Angiogenese bedeutende Wnt-Signalweg soll genauer erörtert werden.

#### **1.3.1 Bedeutung der Wachstumsfaktoren VEGF und PDGF**

In der Regulation der Angiogenese nimmt der Wachstumsfaktor VEGF-A eine Schlüsselrolle ein (Carmeliet und Jain, 2011). Als Vertreter der VEGF-Familie bindet er an die auf ECs vorkommenden Rezeptortyrosinkinasen VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) -1 und VEGFR-2. Dies führt zur Konformationsänderung und Dimerisierung des Rezeptors, was die Autophosphorylierung von eigenen Tyrosinresten ermöglicht. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen wiederum als Bindungsstellen für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle, die unterschiedliche Signalketten in Gang setzen können (Koch und Claesson-Welsh, 2012). VEGFR-1 besitzt nur eine geringe Tyrosinkinaseaktivität, weist jedoch im Vergleich zu VEGFR-2 eine höhere

Bindungsaffinität zu VEGF-A auf. Erklären lässt sich dies durch die hemmende Funktion des Rezeptors, der VEGF-A bindet und somit die Menge des freien VEGF-A, das für die Aktivierung von VEGFR-2 zur Verfügung steht, reguliert (Carmeliet und Jain, 2011; Koch und Claesson-Welsh, 2012). Homozygote Mutationen im VEGFR-1-Gen hatten daher im Mausmodell eine erhöhte Anzahl an Angioblasten während der Embryonalperiode zur Folge sowie eine abnorme Anordnung der sich daraus entwickelnden ECs (Fong et al., 1995). Neben ECs wird VEGFR-1 jedoch auch auf Makrophagen exprimiert und fördert so die postnatale Angiogenese durch Anlocken der Immunzellen (Murakami et al., 2008). Erfolgte im Mausmodell nur ein Abschalten der Tyrosinkinaseaktivität ohne die Bindungsregion für VEGF-A zu beeinträchtigen, resultierte zwar eine normale Gefäßentwicklung, jedoch war eine verminderte Migration der Makrophagen zu beobachten (Hiratsuka et al., 1998). VEGFR-2, der in Mäusen auch als Flk-1 (= Fetal liver kinase-1) bezeichnet wird, weist in der Gegenüberstellung mit VEGFR-1 eine zehnfach höhere Tyrosinkinaseaktivität auf (Koch und Claesson-Welsh, 2012; Shibuya, 2013). Exprimiert wird der Rezeptor vor allem auf ECs und deren embryonalen Vorläuferzellen und nimmt damit eine essentielle Rolle in der endothelialen Differenzierung, Proliferation und Migration ein (Millauer, 1993; Koch und Claesson-Welsh, 2012). In der Embryonalentwicklung von Flk-1-defizienten Mäusen zeigte sich daher eine abnorme Entwicklung der ECs sowie ein Fehlen von Blutinseln und organisierten Blutgefäßen (Shalaby et al., 1995).

Einen weiteren für die Regulation der Angiogenese bedeutenden Wachstumsfaktor stellt PDGF dar. Es existieren die vier Isomere PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D, die als Homodimer oder als Heterodimer PDGF-AB vorliegen (Patel-Hett und D'Amore, 2011). Das von proliferierenden ECs gebildete Homodimer PDGF-B interagiert mit PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) - $\beta$ , der unter anderem auf Perizyten exprimiert wird. Somit fungiert PDGF-B als Lockmittel zur Rekrutierung dieser Zellen, die zur Stabilisierung von Kapillaren beitragen (Lindahl et al., 1997; Gaengel et al., 2009). PDGF-B-defiziente Mäuse zeigten während der Embryonalperiode nicht nur eine verminderte Anzahl an Perizyten, sondern entwickelten zudem kapilläre Mikroaneurysmen (Lindahl et al., 1997; Hellström et al., 1999).

### **1.3.2 Inhibierung der Angiogenese durch den Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib**

Das Medikament Lenvatinib (E7080), das in der Therapie von Patienten mit fortgeschrittenem, Radiojod-refraktärem Schilddrüsenkarzinom eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bewirkt, stellt einen Multi-Tyrosinkinaseinhibitor dar (Schlumberger et al., 2015). Dabei hemmt es unter anderem die Kinaseaktivität von VEGFR1-3, FGFR (fibroblast growth factor receptor) 1-4 und PDGFR- $\alpha$  und greift so in die Regulation der Angiogenese ein (Matsui et al., 2008a; Tohyama et al., 2014). In Experimenten mit humanen ECs, die aus der Nabelschnur isoliert worden waren, konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Lenvatinib die Proliferation und die Bildung endothelialer Röhren *in vitro* hemmt (Yamamoto et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde der Tyrosinkinaseinhibitor eingesetzt, um den Effekt auf die Angiogenese *ex vivo* zu eruieren und damit Rückschlüsse auf die Wirkung von VEGF-A zu ziehen.

### **1.3.3 Bedeutung und Beeinflussungsmöglichkeiten des Wnt-Signalwegs**

Der Wnt-Signalweg ist während der Embryonalperiode nicht nur bei der Entwicklung des Herzens von Bedeutung, sondern er ist auch an der Neubildung von Gefäßen und insbesondere an deren Stabilisierung beteiligt (Phng et al., 2009; Gessert und Kühl, 2010). Beispielsweise führte im Mausmodell die Inaktivierung des Gens für  $\beta$ -Catenin in ECs, welches eine zentrale Rolle im klassischen Wnt-Signalweg einnimmt, zur beeinträchtigten Ausbildung normaler Gefäßstrukturen und zum Auftreten diffuser Blutungen (Cattellino et al., 2003). Im postnatalen Organismus erfolgt eine Aktivierung zudem nach einem stattgehabten Myokardinfarkt (Fu et al., 2019). Im Folgenden soll daher der klassische Wnt-Signalweg beschrieben werden. In der nicht aktivierten Zelle liegt nur eine niedrige Konzentration des Proteins  $\beta$ -Catenin vor. Dies wird gewährleistet durch einen phosphorylierenden Komplex, bestehend aus GSK3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$ ), Axin, CK1 $\alpha$  (Kaseinkinase 1 $\alpha$ ) und dem APC (Adenomatöses Polyposis Coli) - Protein. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird ubiquitinyliert und so für den proteolytischen Abbau markiert. Bindet ein Ligand der Wnt-Familie an den auf der Zelloberfläche gelegenen Rezeptorkomplex, der sich aus dem Protein Frizzled und dem Korezeptor LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) zusammensetzt, wird der Komplex, der  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, inaktiviert. Es kommt zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und zur Translokation des Proteins in den Zellkern, wo es die Transkrip-

tion verschiedener Zielgene reguliert (Willert und Nusse, 1998; Dejana, 2010; Maruotti et al., 2013; Reis und Liebner, 2013). Das Molekül CHIR 99021, welches als GSK3-Inhibitor fungiert, kann experimentell genutzt werden, um die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin zu verhindern. In Versuchen mit murinen embryonalen Stammzellen konnte so der klassische Wnt-Signalweg aktiviert werden (Naujok et al., 2014). Im Gegensatz dazu bewirkt IWR-1 die Stabilisierung von Axin und damit des phosphorylierenden Komplexes. Dies resultiert in der Inhibierung der Wnt-Signalkaskade (Narwal et al., 2012). Beide Substanzen wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um den Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Angiogenese *ex vivo* zu untersuchen.

### **1.4 Stammzellen**

Stammzellen besitzen per definitionem sowohl die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in unterschiedlichste Zelltypen (Lee und Walsh, 2016). Dabei lassen sich anhand Herkunft und Differenzierungspotenzial embryonale von adulten Stammzellen unterscheiden. Davon abzugrenzen sind Progenitorzellen, die nicht in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und die sich in der Regel nur zu einer Zellart differenzieren können (Dulak et al., 2015).

#### **1.4.1 Ursprung und Charakteristika embryonaler und adulter Stammzellen**

Die Differenzierung in spezialisierte Zellen stellt eine essentielle Stammzeleigenschaft dar. Der Umfang dieser Fähigkeit variiert jedoch zwischen embryonalen und adulten Stammzellen. Die Zygote und die daraus hervorgehenden ersten embryonalen Stammzellen weisen zunächst die Eigenschaft der Totipotenz auf, die es ihnen ermöglicht, sich zu einem kompletten Embryo zu entwickeln. Mit zunehmenden Teilungen im Rahmen der Embryonalentwicklung und mit Erreichen des Vier- bis Achtzellstadiums geht dieses Merkmal verloren. Sie besitzen jedoch weiterhin das Potenzial, sich zu Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, was als Pluripotenz bezeichnet wird. Derartige Zellen können beispielsweise nach einer In-vitro-Fertilisation aus der inneren Zellmasse des Blastozysten gewonnen werden (Brignier und Gewirtz, 2010). Im Gegensatz dazu stellen die im postnatalen Organismus vorkommenden adulten Stammzellen häufig multipotente Zellen dar, aus denen sich verschiedene Zelltypen innerhalb einer Zelllinie bilden können (Dulak et al., 2015). Neben vielen anderen Geweben, wie beispielsweise

der Haut oder dem Gastrointestinaltrakt, dient dabei vor allem das Knochenmark als Reservoir. In diesem finden sich unter anderem hämatopoetische Stammzellen, aus denen sich die Blutzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe entwickeln sowie mesenchymale Stammzellen, die als Vorläufer von Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten dienen (Bryder et al., 2006; Dulak et al., 2015).

Die Definition einer Stammzelle schließt jedoch nicht nur die Möglichkeit zur Differenzierung, sondern auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung mit ein (Lee und Walsh, 2016). Dies wird durch die asymmetrische Zellteilung ermöglicht, in der nur eine der beiden Tochterzellen Stammzeleigenschaften erhält, während die andere als differenzierende Vorläuferzelle aus der mitotischen Teilung hervorgeht (Knoblich, 2008).

### **1.4.2. Stammzellmarker**

Auf Stamm- und Progenitorzellen des embryonalen sowie des postnatalen Organismus findet sich eine Vielzahl verschiedener Oberflächenmarker. Dazu gehören beispielsweise c-kit oder Sca-1, die nicht nur auf Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems exprimiert werden, sondern auch in vielen weiteren Geweben und Organen vorkommen (Holmes and Stanford, 2007; Rojas-Sutterlin et al., 2014). In den beiden folgenden Abschnitten sollen die Oberflächenantigene CD34 und CD44 näher beschrieben werden, die für die vorliegende Arbeit von größter Bedeutung sind.

#### **1.4.2.1 CD34**

Das Transmembranprotein CD34, das 1984 zunächst auf hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen identifiziert wurde, stellt einen weit verbreiteten Oberflächenmarker dar und wird beispielsweise auch auf mesenchymalen Stammzellen oder Vorläuferzellen von Epithel- und Endothelzellen exprimiert (Civin et al., 1984; Sidney et al., 2014). Mit einem Molekulargewicht von circa 115 kDa besitzt es neben einer Transmembrandomäne einen unter anderem durch N- bzw. O-Glykosylierungen modifizierten extrazellulären Anteil und ein kurzes zytoplasmatisches Ende. Während die Struktur des Oberflächenantigens in der Literatur ausführlich beschrieben ist, wurde die Funktion von CD34 bisher jedoch nur unzureichend geklärt. Neben seiner teils widersprüchlich dargestellten Rolle bei der Adhäsion von Lymphozyten, scheint CD34 zudem an der Regulation der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt zu sein (Nielsen und

McNagny, 2008). Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD34 und dem Grad der Differenzierung festgestellt werden. Während CD34<sup>+</sup> Zellen die Charakteristika von Stamm- bzw. Progenitorzellen und ein breites Differenzierungspotenzial aufweisen, wird die Expression des Oberflächenantigens im Laufe der Differenzierung herunterreguliert (Sidney et al., 2014).

### **1.4.2.2 CD44**

Identifiziert wurde CD44 zunächst als Oberflächenantigen von Lymphozyten, bei denen es an der Migration in die Lymphknoten beteiligt ist (Gallatin et al., 1983). Jedoch wird das Glykoprotein in unterschiedlichen Isoformen auf einer Vielzahl von Zellen exprimiert (Zöller, 2011). So dient CD44 beispielsweise auch als Marker von Tumorstammzellen oder kommt neben CD73 und CD90 auf der Oberfläche von mesenchymalen Stammzellen vor (Ullah et al., 2015; Thapa and Wilson, 2016). Dabei entstehen die auf verschiedenen Zellen vorliegenden Isoformen durch alternatives Spleißen und durch die Modifikation der N- bzw. O-Glykosylierungen, während die Grundstruktur, die sich aus sieben extrazellulären Anteilen, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Ende zusammensetzt, bestehen bleibt (Idzerda et al., 1989; Screaton et al., 1992; Zöller, 2011). Funktionell spielt CD44 nicht nur während der Embryonalentwicklung und in der Tumorprogression eine wichtige Rolle, sondern es ist zudem an der Regulation der Migration, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt (Ruiz et al., 1995; Yan et al., 2015).

### **1.4.3 Gefäßwand-residente Stamm- und Progenitorzellen**

Während lange Zeit hauptsächlich das Knochenmark im Mittelpunkt der Forschung an adulten Stammzellen stand, rückte in den letzten Jahren vermehrt auch die Gefäßwand als Nische für Vorläuferzellen in den Fokus der Wissenschaft. Die sogenannten Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen kommen sowohl in der Wand von Arterien als auch von Venen und Kapillaren vor und können zu unterschiedlichsten Zellen differenzieren (Torsney et al., 2005; Zengin et al., 2006; Klein et al., 2010; Ergün et al., 2011; Wörsdörfer et al., 2017). Im Folgenden soll ein Überblick gegeben werden, wobei das Hauptaugenmerk auf den CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Zellen liegt.

#### **1.4.3.1 Stammzellnischen der Gefäßwand**

Innerhalb der Gefäßwand finden sich verschiedene Nischen, die als Reservoir für Stamm- und Progenitorzellen dienen. In der *Tunica media* konnten beispielsweise  $Sc\alpha 1^+$  Zellen, aus denen sich *in vitro* ECs und glatte Muskelzellen bilden können, identifiziert werden (Sainz et al., 2006). Neben der Media fungieren jedoch auch die sub-endotheliale Zone der Intima und die Adventitia als Stammzellnische. Ein erster Hinweis auf die Existenz von Progenitorzellen innerhalb des Endothels ergab sich durch Experimente mit humanen ECs, die aus Umbilikalvenen beziehungsweise aus Aorten isoliert worden waren. Diese bildeten in der Zellkultur gut abgrenzbare Kolonien und zeigten eine ausgeprägte Proliferationsrate (Ingram et al., 2005). In weiteren Untersuchungen konnte das Vorkommen von endothelialen Stammzellen in der Intima bestätigt werden (Fang et al., 2012; Naito et al., 2012). Ein Großteil der Gefäßwand-residenten Vorläuferzellen befindet sich jedoch in der Adventitia. Insbesondere die an der Grenze zur glatten Muskulatur der Media gelegene sogenannte vaskulogene Zone dient als Nische für zahlreiche, teils multipotente Stamm- und Progenitorzellen (Zengin et al., 2006; Ergün et al., 2011; Wörsdörfer et al., 2017). Innerhalb dieser Stammzellpopulation wurden 2001 zunächst humane, embryonale  $CD34^+CD31^-$  Zellen identifiziert, die *in vitro* zu  $CD31^+$  ECs differenzierten und anschließend zur Bildung gefäßartiger Strukturen beitrugen (Alessandri et al., 2001). Zudem konnte eine Vielzahl weiterer Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen in den letzten Jahren nachgewiesen werden. Einen Überblick soll der folgende Abschnitt verschaffen.

#### **1.4.3.2 Merkmale und Differenzierungspotenzial Gefäßwand-residenter Stamm- und Progenitorzellen**

Neben den bereits erwähnten endothelialen Vorläuferzellen beherbergt die Gefäßwand viele weitere Stamm- und Progenitorzellen, die sich zu verschiedensten Zellen, wie beispielsweise glatten Muskelzellen, Perizyten oder Makrophagen differenzieren können (Passman et al., 2008; Ergün et al., 2011; Psaltis et al., 2012, 2014; Wörsdörfer et al., 2017). Auf die unterschiedlichen Vorläuferzellen des postnatalen Organismus soll nun im Einzelnen eingegangen werden.

Endotheliale Progenitorzellen (EPCs), die sich *in vitro* zu reifen ECs differenzierten, wurden erstmalig 1997 zunächst im peripheren Blut entdeckt (Asahara et al., 1997). Nachfolgend konnten sie, wie bereits beschrieben, zudem in der Intima von humanen Blutgefäßen, wie der Aorta und der Umbilikalvene, lokalisiert werden (Ingram et al., 2005). Mittels immunhistochemischer Färbungen gelang darüber hinaus die Identifizierung von CD34<sup>+</sup>VEGFR-2<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> EPCs innerhalb der vaskulogenen Zone der Adventitia der menschlichen *Arteria thoracica interna* (Zengin et al., 2006). Untersuchungen an murinem Gewebe halfen die Existenz von endothelialen Vorläuferzellen innerhalb der Gefäßwand zu belegen, die nicht nur die Fähigkeit zur Selbsterneuerung als essentielle Stammzeleigenschaft aufwiesen, sondern zudem in der Lage waren, funktionsfähige Blutgefäße *in vivo* zu bilden (Fang et al., 2012; Naito et al., 2012). Neben den eben dargestellten endothelialen Vorläuferzellen existiert noch eine Reihe weiterer Progenitorzellen, die sich unter anderem zu  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> SMCs differenzieren können. Einen ersten Anhaltspunkt dazu gaben murine Sca-1<sup>+</sup> Zellen, die aus kultiviertem adventitiellem Gewebe isoliert worden waren. Diese entwickelten sich unter dem Einfluss von PDGF-BB *in vitro* zu SMCs (Hu et al., 2004). Zudem konnten in der Adventitia adulter Mäuse Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> Zellen als Vorläuferzellen von SMCs lokalisiert werden (Passman et al., 2008). Zusätzlich zur Adventitia finden sich in der *Tunica media* Progenitorzellen, die das Potenzial aufweisen, sich zu SMCs zu differenzieren, wie beispielsweise Sca-1<sup>+</sup> Zellen (Sainz et al., 2006). Die Gefäßwand dient jedoch nicht nur als Nische für Vorläuferzellen von ECs oder SMCs, sondern auch für Progenitorzellen der hämatopoetischen Reihe. In der Adventitia gelegene CD45<sup>+</sup> Zellen können sich beispielsweise in Makrophagen differenzieren (Zorzi et al., 2010; Psaltis et al., 2014). Anhand des Immunphänotyps lassen sich weiterhin bisher zwei Gruppen multipotenter Stammzellen innerhalb der Adventitia unterscheiden (Wörsdörfer et al., 2017). Die in der vaskulogenen Zone vorkommenden CD44<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD31<sup>-</sup> Zellen exprimieren die für mesenchymale Stammzellen charakteristischen Oberflächenantigene CD90 und CD73 und entwickelten sich in Kultur zu Adipozyten, Chondroblasten und Osteoblasten. Auch die Differenzierung in Perizyten und SMCs, die sich anschließend in die Wand neu gebildeter gefäßartiger Strukturen einfügten, war möglich (Klein et al., 2011). Darüber hinaus wurden in der Adventitia unterschiedlicher humaner Gewebe CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> Zellen identifiziert. Diese wiesen ebenfalls die Oberflächenmarker und das multipotente Differenzierungspotenzial mesenchymaler

Stammzellen auf (Campagnolo et al., 2010; Corselli et al., 2012). Neuere Erkenntnisse belegen zudem die Entstehung spontan schlagender Kardiomyozyten *in vitro* aus Flk-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> Zellen der Adventitia muriner Aorta (Mekala et al., 2018). Wurden diese Vorläuferzellen in das Herz von Hühnerembryonen übertragen, entwickelten sich auch *in vivo* Zellen, die einen den Kardiomyozyten ähnlichen Phänotyp aufwiesen (Mekala et al., 2018).

### **1.4.3.3 Rolle Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen in pathologischen Prozessen**

Bei den wissenschaftlichen Erkenntnissen, die sich auf die Rolle der Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen in pathologischen Prozessen beziehen, steht meist die Thematik der Arteriosklerose im Vordergrund (Wörsdörfer et al., 2017). So wurde bereits 1962 eine Korrelation zwischen dem Schweregrad arteriosklerotischer Plaques und dem Ausmaß der zellulären Infiltration der Adventitia arterieller Gefäße beschrieben (Schwartz and Mitchell, 1962). Mit Hilfe von Apolipoprotein-E-defizienten Mäusen und Sca-1<sup>+</sup> Zellen konnte weiterhin eine Beteiligung der aus der Adventitia stammenden Zellen an der Formation arteriosklerotischer Läsionen in der Intima gezeigt werden (Hu et al., 2004). Zugleich nehmen jedoch auch Prozesse der angeborenen und der adaptiven Immunantwort eine grundlegende Rolle in der Entwicklung und Progression der Arteriosklerose ein (Campbell et al., 2012). Es wird angenommen, dass die in der Adventitia ablaufenden Immunreaktionen zur Differenzierung der Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen beitragen. Dies wiederum fördert die Entstehung von Arteriosklerose und begünstigt damit Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie beispielsweise Myokardinfarkte (Wörsdörfer et al., 2017).

## **1.5 Myokardinfarkt**

Mit einer Inzidenz von circa 11 Millionen und mit 3,8 Millionen Toten pro Jahr allein in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie gehören Erkrankungen des kardiovaskulären Systems zu den häufigsten in Europa. Dabei stellen die Myokardinfarkte neben den Apoplexien eine der Haupttodesursachen dar (Atlas Writing Group et al., 2018).

### **1.5.1 Grundlagen und Pathophysiologie des Myokardinfarkts**

Das akute Koronarsyndrom (ACS) umfasst neben dem plötzlichen Herztod auch die instabile Angina pectoris, den Nicht-ST-Hebungsinfarkt und den ST-Hebungsinfarkt. Jeder neu aufgetretene oder sich verschlechternde Brustschmerz ohne Anstieg der Herzenzyme ist dabei als instabile Angina pectoris definiert (Troost und Lange, 2011). Im Gegensatz dazu ergibt sich die Diagnose des Myokardinfarkts aus dem Anstieg des Troponins zusammen mit der typischen klinischen Symptomatik, dem Nachweis eines intrakoronaren Thrombus, Wandbewegungsstörungen in der Bildgebung oder ischämietypischen EKG-Veränderungen (Thygesen et al., 2012). Allen Unterformen des ACS liegt jedoch eine gemeinsame Pathophysiologie zugrunde. Diese basiert auf einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf der Kardiomyozyten, was zu einer myokardialen Ischämie führt (Thygesen et al., 2012). Während Emboli, Vasospasmen oder Dissektionen der Koronararterien seltene Auslöser darstellen, sind in den meisten Fällen arteriosklerotische Plaques, die im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit auftreten, ursächlich. Die Exposition von subendotheliales Bindegewebe oder des lipidreichen Plaquekerns durch die Erosion bzw. Ruptur eines instabilen Plaques resultiert in der Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Bildung eines Thrombus (Davies, 2000). Verschließt dieser das Lumen der Koronararterie, so kommt es zum Untergang des kardialen Gewebes und zu einer sich von endokardial nach subepikardial ausbreitenden Nekrose (Skyschally et al., 2008). In der Folge tritt zunächst eine Entzündungsreaktion ein, die unter anderem der Beseitigung von geschädigtem Zellmaterial und extrazellulären Matrixbestandteilen dient. Durch die Proliferation von Fibroblasten und die Ablagerung von Bindegewebe entsteht anschließend eine Narbe, die als Residuum des stattgehabten Myokardinfarkts verbleibt. Abhängig vom Ausmaß des Infarkts und dem Verlust von vitalem Herzgewebe besteht ein erhöhtes Risiko für einen strukturellen Umbau und die damit einhergehende Hypertrophie oder Dilatation des Herzens. Dies kann letztendlich zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz führen (Frantz et al., 2008; Frangogiannis, 2012).

### **1.5.2 Therapie und kardioregenerative Ansätze**

Das therapeutische Vorgehen nach Diagnosestellung eines Myokardinfarkts beinhaltet vor allem die Wiederherstellung der koronaren Perfusion, um so die Größe des In-

farktareals und die Mortalität auf ein Minimum zu reduzieren. Dabei stellt die perkutane koronare Intervention (PCI) mit Aufdehnung des verschlossenen Gefäßes und Einsetzen eines Stents das Mittel der Wahl dar. Als medikamentöse Therapie können in der Akutphase neben Thrombozytenaggregationshemmern und Antikoagulantien auch Morphin, Nitrate und Betablocker verabreicht werden. Diese senken den Sauerstoffbedarf und verbessern zudem die Versorgung des Myokards. In der Langzeitbehandlung spielen wiederum Betablocker sowie eine duale Thrombozytenaggregationshemmung, Statine und ACE-Hemmer eine Rolle (Trost und Lange, 2011, 2012). Letztere verhindern den kardialen Umbau und vermindern damit das Risiko für die Entstehung einer Herzinsuffizienz (Blaufarb und Sonnenblick, 1996).

Dieses Ziel verfolgen auch kardioregenerative Therapieansätze, die im Rahmen klinischer Studien erprobt werden. In der Postinfarkttherapie wird dabei beispielsweise eine intravenöse oder intrakoronare Gabe von adulten Stamm- oder Progenitorzellen angewandt. Jedoch zeigten sich hierbei divergente Ergebnisse. Während beispielsweise in der BOOST-Studie die Verabreichung von autologen Stammzellen aus dem Knochenmark nach einem Myokardinfarkt eine Verbesserung der Ejektionsfraktion bewirkte (Wollert et al., 2004), konnte in der TIME-Studie kein Effekt nachgewiesen werden (Traverse et al., 2012). Auch neuere Erkenntnisse der Doppelblindstudie BOOST2, in der keine Vorteile gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden konnten, spiegeln diese Auffassung wider (Wollert et al., 2017). Die Behandlung mit mesenchymalen Stammzellen scheint zu einer signifikanten Erholung der linksventrikulären Funktion zu führen. Diese wurde jedoch nur in kleineren Studien getestet (Hare et al., 2009; Kim et al., 2018). Dahingegen brachten murine Versuche mit embryonalen Stammzellen Probleme, wie die Bildung von Teratomen, niedrige Differenzierungsraten oder Abstoßungsreaktionen mit sich (Swijnenburg et al., 2005; Nussbaum et al., 2007; Boudoulas and Hatzopoulos, 2009). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bereits einige Therapieansätze existieren, die aufgrund divergenter Studienergebnisse zur Wirksamkeit oder der mit der Verabreichung verbundenen Probleme bisher jedoch nicht in der klinischen Anwendung überzeugen konnten.

## 1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Wie bereits erörtert, konnte die in Studien getestete intravenöse oder intrakoronare Verabreichung von Stammzellen im Rahmen der Postinfarkttherapie bislang in der klinischen Anwendung nicht überzeugen. Daher ist die Forschung an neuen Ansätzen der kardioregenerativen Therapie von zentraler Bedeutung. Diese könnten beispielsweise Stamm- und Progenitorzellen miteinbeziehen, die in der Adventitia von Gefäßen und damit auch in Koronargefäßen im Herz vorliegen. Um diese lokalen Vorläuferzellen zu mobilisieren und therapeutisch nutzen zu können, ist deren genauere Charakterisierung unabdingbar. In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Angiogenese-Kapazität murinen Herzgewebes unter verschiedenen Bedingungen sowie die Rolle koronarer Gefäßwand-residenter Stammzellen bei der Neubildung von Gefäßen analysiert werden. Insbesondere standen folgende Fragestellungen, die sich zum Teil auch erst im Laufe der Untersuchungen ergaben, im Mittelpunkt der Arbeit:

1. Unter welchen Kultivierungsbedingungen wird maximales Sprouting im kardialen Angiogenese Assay (Cardiac Angiogenesis Assay = CAA) erreicht?
2. Hat die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs einen Effekt auf die Angiogenese-Kapazität im CAA?
3. Wirkt sich die Depletion der Makrophagen durch Clodronat auf die Quantität oder die Morphologie des Sproutings im CAA aus?
4. Beeinflusst der Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib die Angiogenese im CAA?
5. Führt die Kultivierung im CAA zu einer veränderten Morphologie des Gewebes auf histologischer Ebene?
6. Welche Rolle spielen die koronaren Gefäßwand-residenten CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Stammzellen während der Angiogenese im CAA?
7. Welchen Effekt hat der Einsatz von Lenvatinib auf die koronaren Gefäßwand-residenten CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Stammzellen und die F4/80<sup>+</sup> Makrophagen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 1:** Übersicht über verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Aluminiumsulfat-18-hydrat	Merck
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chloralhydrat	AppliChem
DABCO®	Carl Roth
DePeX	Serva
D(+)-Glucose	AppliChem
4',6-Diamidino-2'-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI)	Roche
Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB)	Sigma-Aldrich
di-Natriumhydrogenphosphat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Einbettautomat TP 1020	Leica
Eosin Gelblich	AppliChem
Ethanol 96 %	Nordbrand Nordhausen
Ethanol mind. 99 %	Nordbrand Nordhausen
Gießstation 2080/K	Bavimed
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich
Glycerin	AppliChem
Hämatoxylin	Carl Roth
Histosec® Pastillen	Merck
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat	AppliChem
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem

---

Kernechtrot	Merck
Mowiol® 4-88	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumjodat	Merck
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Merck
Normales Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich
Normales Kaninchenserum (NRS)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth
Trizma® Base	Sigma-Aldrich
Trizma® Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 30 %	AppliChem
Xylol	Redestillation Uni Würzburg
Zitronensäure	AppliChem

---

### 2.1.2 Zellkulturchemikalien

**Tabelle 2:** Übersicht über verwendete Zellkulturchemikalien

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Ampuwa®	Fresenius Kabi
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Minimales Essentielles Medium (MEM)	Sigma-Aldrich
Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %)	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	AppliChem
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich
Penicillin G Natriumsalz	Sigma-Aldrich
PureCol®, Bovine Kollagenlösung, Typ I, 3 mg/ml	Advanced BioMatrix
Streptomycin Sulfatsalz	Sigma-Aldrich

---

### 2.1.3 Zellkulturmedien

**Tabelle 3:** Übersicht über verwendete Zellkulturmedien

<b>Medium</b>	<b>Zusätze</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	10 % FCS; 0,5 % Penicillin/Streptomycin	Life Technologies

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4:** Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Hämalaun nach Mayer (1000 ml)	1 g Hämatoxylin; 0,2 g Natriumjodat; 50 g Kaliumaluminiumsulfat; 50 g Chloralhydrat; 1g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest.
Citratpuffer (1000 ml)	18 ml 0,1 M Zitronensäure; 82 ml 0,1 M tri-Natriumcitrat Dihydrat in 900 ml Aqua dest.
DAB-Lösung	22,5 mg DAB in 1 ml Tris-NaCl Puffer
0,1 % Kernechtrot-Lösung	50 g Aluminiumsulfat-18-hydrat; 1 g Kernechtrot in 1000 ml Aqua dest.
Mowiol-DABCO	0,6 g Glycerin; 2,4 g Mowiol; 6,0 ml Aqua dest.; 12 ml 0,2 M Tris-HCl; 25 mg/ml DABCO®
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) (5000 ml)	40,03 g Natriumchlorid; 1 g Kaliumchlorid; 6,8 g di-Natiumhydrogenphosphat; 1 g Kaliumdihydrogenphosphat in 5000 ml Aqua dest.
Phosphatpuffer 0,1 M pH 7,4 (PB-Puffer) (2000 ml)	4,9 g Kaliumdihydrogenphosphat; 23,3 g di-Natiumhydrogenphosphat in 2000 ml Aqua dest.
Tris-NaCl Puffer (1000 ml)	6,1g Trizma® Base; 8,8 g Natriumchlorid in 1000 ml Aqua dest.

### 2.1.5 Antikörper

**Tabelle 5:** Übersicht über verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies/ Isotyp</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Primärantikörper</b>				
Anti- $\alpha$ smooth muscle Actin (ab5694)	Kaninchen IgG	1:400/1:100	Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz	Abcam
Anti-CD34 (ab1858)	Ratte IgG2a	1:50	Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz	Abcam
Anti-CD44 (103002)	Ratte IgG2b	1:300/1:50	Immunhistochemie/ Immunfluoreszenz	Biolegend
Anti-F4/80 (ab6640)	Ratte IgG2b	1:200	Immunhistochemie	Abcam
Anti-F4/80 (ab16911)	Ratte IgG2a	1:25/1:50	Immunhistochemie	Abcam
Anti-Flk-1 (sc-48161)	Ziege IgG	1:50	Immunfluoreszenz	Santa Cruz
Anti-Ki67 (ab16667)	Kaninchen IgG	1:100	Immunhistochemie	Abcam
<b>Sekundärantikörper</b>				
Anti-Kaninchen Cy5	Ziege	1:400	Immunfluoreszenz	Dianova
Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:250	Immunhistochemie	Vector
Anti-Ratte Alexa Fluor® 647	Ziege	1:200 (CD34)/ 1:250 (CD44)	Immunfluoreszenz	Dianova
Anti-Ratte IgG, biotinyliert	Ziege	1:250/ 1:100 (Ly6c)	Immunhistochemie	Vector
Anti-Ratte Cy3	Esel	1:1200	Immunfluoreszenz	Dianova
Anti-Ziege Cy5	Esel	1:200	Immunfluoreszenz	Dianova

### 2.1.6 Zytokine und Inhibitoren

**Tabelle 6:** Übersicht über verwendete Zytokine und Inhibitoren

<b>Zytokin/Inhibitor</b>	<b>Hersteller</b>
CHIR 99021	Axon Medchem
Clodronat-Liposomen	Liposoma B.V.
IWR-1	Sigma-Aldrich
Lenvatinib (E7080)	Merck
Murines PDGF-BB	PeproTech
Murines VEGF-A	PeproTech
PBS-Liposomen	Liposoma B.V.

### 2.1.7 Kits

**Tabelle 7:** Übersicht über verwendete Kits

<b>Kit</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Vectastain® ABC Kit	Vector Laboratories

### 2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 8:** Übersicht über verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	Heraeus
Chirurgisches Einwegskalpell	B. Braun Aesculap
CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell 240i	Thermo Fischer Scientific
Dampfautoklav HG-133	HMC Europe
Deckgläser 24 x 50 mm	Marienfeld
Einbettkassetten	Labortechnik Süsse
Fasspinzette	Hammacher
Flockeneisbereiter AF 100	Scotsman
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	Keyence
Inverses Mikroskop DM IL LED	Leica

---

Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler
Kühlplatte EG1150 C	Leica
Kühlschrank	Bauknecht
Magnetrührer MAG-H	Gerhardt
Makroskop M420	Leica
Mikroskop	Carl Zeiss
Mikrowelle NN-E201WMEPG	Panasonic
Objektträger SuperFrost® plus	R. Langenbrinck
Paraffin-Streckbad	GFL
pH-Meter pH 525	WTW
Pinzette	Dumont
Pipette Research® plus 10 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus 100 µl	Eppendorf
Pipette Research® plus 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitze 20 µl	Sarstedt
Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt
Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand
Präzisionswaage PLJ 3500-2NM	Kern
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt
Rundfilter 185 mm	A. Hartenstein
Schlittenmikrotom SM2010 R	Leica
Serologische Pipette 5 ml	Greiner Bio-One
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt
Serologische Pipette 25 ml	Greiner Bio-One
Sterican® Standardkanüle, G 20	B. Braun
Sterilbank LaminAir® HB 2448	Heraeus
Trockenschrank	Memmert
Tube 15 ml	Sarstedt
Tube 50 ml	Sarstedt
Vortex Genie 2	Bender & Hobein

---

---

Wasserbad	GFL
24-well Multiwell Platte	Greiner Bio-One
Zell-Kultur-Schalen 100 x 20 mm	Greiner Bio-One
Zentrifuge Z 160 M	Hermle

---

### 2.1.9 Software

**Tabelle 9:** Übersicht über verwendete Software

---

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Excel 2013	Microsoft
ImageJ	Wayne Rasband
Keyence BZ II Analyzer	Keyence
Keyence BZ II Viewer	Keyence
Leica Application Suite V4.3	Leica
PhotoFiltre7	Antonio Da Cruz
PowerPoint 2013	Microsoft

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Cardiac Angiogenesis Assay

Zur Identifizierung und Charakterisierung koronarer Gefäßwand-residenter Stammzellen diente der sogenannte kardiale Angiogenese Assay (Cardiac Angiogenesis Assay = CAA) als *ex vivo* Ansatz. Hierbei kommt es im Laufe der Kultivierung zur Bildung gefäßartiger Strukturen, die zur Quantifizierung der Angiogenese-Kapazität des murinen Gewebes herangezogen werden können. Zusätzlich kann mittels nachgeschalteter histologischer und immunhistochemischer Analysen (immunphänotypische Charakterisierung der Zellen) die Lokalisation und Aktivierung Gefäßwand-residenter Stammzellen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht werden.

#### 2.2.1.1 Präparation des murinen kardialen Gewebes

Nach zervikaler Dislokation der Wildtyp-Mäuse erfolgte die Eröffnung des Thorax unter Verwendung von Schere und Pinzette und nach Absetzen der *Aorta ascendens* die Entnahme des Herzens. Die vorübergehende Gabe in PBS verhinderte dabei das Austrocknen des Organs, bevor die Übertragung in eine leere Petrischale folgte. Ein Makroskop half anschließend bei der Identifizierung der *Arteria coronaria sinistra* und der Bifurkation in ihre beiden Hauptäste *Ramus interventricularis anterior* und *Ramus circumflexus*, anhand derer ein medianer Längsschnitt mit Hilfe eines Einmalskalpells durchgeführt wurde. Um ein hohes Maß an größeren Koronarabschnitten im Gewebe zu gewährleisten, wurde ausschließlich die Hälfte mit dem am stärksten ausgeprägten RIVA in circa 1 mm breite Querschnitte geteilt, die sich einerseits den Atrien und andererseits den basis- oder apexnahen Ventrikelanteilen zuordnen ließen. Für den späteren histologischen Vergleich wurden vereinzelt frisch isolierte Stücke in 4 % PFA/PBS fixiert, wohingegen die überwiegende Anzahl in PBS auf Eis gelagert und der Kultivierung im CAA zugeführt wurde.

#### 2.2.1.2 Einbettung des Gewebes in Kollagenmatrix

Die Kultivierung des murinen kardialen Gewebes erfolgte in einer Kollagenmatrix bestehend aus zwei aufeinanderliegenden Schichten. Diese wurden in 24-well-Platten an-

gefertigt. Die Zusammensetzung der dabei verwendeten Kollagenmatrix ist in Tabelle 10 eingetragen.

**Tabelle 10:** Zusammensetzung der Kollagenmatrix (10 ml)

<b>Reagenz/Lösung</b>	<b>Volumen</b>
Ampuwa-Wasser	3,77 ml
MEM	1,08 ml
200 mM L-Glutamin	108 µl
100 mM Natrium-Pyruvat	108 µl
PureCol® Kollagenlösung	4,31 ml
Natriumbicarbonat-Lösung 7,5 %	539 µl
Penicillin/Streptomycin	43 µl
100 mM Natriumhydroxid pH 7,4	43 µl

Nach dem Einbringen von 400 µl des auf Eis gekühlten Kollagengels pro Well und einer Polymerisationsdauer von 60 min bei 37 °C folgte das mittige Einsetzen der Organstücke mit Hilfe einer Pinzette. Im Anschluss an weitere 10 min bei 37 °C im Brutschrank wurden erneut jeweils 400 µl der Kollagenlösung auf das Gewebe pipettiert und mittels einer feinen Pipettenspitze eine Adhärenz zwischen den beiden Kollagenschichten hergestellt. Die Polymerisation der zweiten Kollagenschicht war nach 120 min im Brutschrank abgeschlossen.

### 2.2.1.3 Kultivierung des Gewebes und Dokumentation des Sproutings

Die Kultivierung fand unter unterschiedlichen Konditionen statt, wobei DMEM versetzt mit 10 % FCS und 0,5 % Penicillin/Streptomycin als Basisnährmedium diente. Zunächst erfolgte die Aufteilung des kardialen Gewebes in die verschiedenen Organabschnitte und die Zugabe der Wachstumsfaktoren PDGF-BB bzw. VEGF-A zu 1 ml Medium pro Well. In Tabelle 11 sind die diversen Kulturbedingungen zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Übersicht über verwendetes Gewebe und Wachstumsfaktoren

<b>Gewebe</b>	<b>Wachstumsfaktor</b>
Atrium	Kontrolle (ohne Zugabe von Faktoren)
Atrium	10 ng/ml PDGF-BB

Atrium	50 ng/ml VEGF-A
basisnaher Ventrikel	Kontrolle (ohne Zugabe von Faktoren)
basisnaher Ventrikel	10 ng/ml PDGF-BB
basisnaher Ventrikel	50 ng/ml VEGF-A
apexnaher Ventrikel	Kontrolle (ohne Zugabe von Faktoren)
apexnaher Ventrikel	10 ng/ml PDGF-BB
apexnaher Ventrikel	50 ng/ml VEGF-A

Die Ansätze wurden sowohl unter Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) als auch unter Hypoxie (2 % O<sub>2</sub>) 11 – 13 Tage bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dabei sorgte ein spätestens nach vier Tagen durchgeführter Mediumwechsel für die adäquate Versorgung des Gewebes.

Aufgrund des ausgedehnteren Sproutings ergab sich im weiteren Verlauf die Fokussierung auf die 13-tägige Kultivierung ausschließlich basisnaher Herzsegmente bei einem O<sub>2</sub>-Gehalt von 21 % und unter generellem Zusatz von 10 ng/ml PDGF-BB zu 500 µl Medium pro Well. Zunächst wurde die Beeinflussung des Wnt-Signalwegs durch die Zugabe des Aktivators CHIR 99021 bzw. Inhibitors IWR-1 zum Medium und die dadurch entstehenden Auswirkungen auf das Sprouting untersucht. Die dabei verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 12 eingetragen.

**Tabelle 12:** Beeinflussung des Wnt-Signalwegs mittels CHIR 99021 bzw. IWR-1

<b>Aktivierung des Wnt-Signalwegs</b>	<b>Inhibierung des Wnt-Signalwegs</b>
4 µM CHIR 99021, gelöst in DMSO	5 µM IWR-1, gelöst in DMSO
8 µM CHIR 99021, gelöst in DMSO	10 µM IWR-1, gelöst in DMSO
<b>Kontrolle</b>	<b>Kontrolle</b>
Keine Zugabe von CHIR/IWR-1	Keine Zugabe von CHIR/IWR-1

Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch mit dem Einsatz von 100 µl bzw. 150 µl Clodronat-Liposomen pro ml Medium die Depletion kardialer Makrophagen beabsichtigt. Als Kontrolle dienen hierbei Ansätze ohne Liposomen bzw. mit identischen Konzentrationen an PBS-Liposomen.

**Tabelle 13:** Depletion kardialer Makrophagen mit Hilfe von Clodronat-Liposomen

<b>Depletion der Makrophagen</b>	<b>Kontrolle 1</b>	<b>Kontrolle 2</b>
100 µl/ml Clodronat-Liposomen	100 µl/ml PBS-Liposomen	Keine Zugabe von Liposomen
150 µl/ml Clodronat-Liposomen	150 µl/ml PBS-Liposomen	Keine Zugabe von Liposomen

Um einen möglichen Effekt des VEGFs auf der Ebene des Rezeptorsignalwegs zu überprüfen, wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib (= E7080) in den folgenden Versuchen in einer Konzentration von 10 µM zusammen mit 50 ng/ml VEGF-A zum Standardmedium zugegeben. Ansätze ohne Zusatz bzw. mit 50 ng/ml VEGF-A alleine fungierten hierbei als Vergleich. Zur detaillierteren Betrachtung der Wirkung auf die Differenzierung der Gefäßwand-residenten Stammzellen wurde anschließend der Zugabebeginn des Tyrosinkinaseinhibitors auf zwei unterschiedliche Zeitpunkte festgelegt. Daraufhin folgte ein einheitlicher Behandlungszeitraum von sechs Tagen. Tabelle 14 fasst die Bedingungen zusammen.

**Tabelle 14:** Beginn der Faktorenzugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten

<b>Behandlung mit</b>	<b>Zugabe der Faktoren ab</b>	<b>Kultivierungsdauer</b>
–	–	9 Tage
50 ng/ml VEGF-A	Tag 3	9 Tage
50 ng/ml VEGF-A, 10 µM E7080	Tag 3	9 Tage
–	–	13 Tage
50 ng/ml VEGF-A	Tag 7	13 Tage
50 ng/ml VEGF-A, 10 µM E7080	Tag 7	13 Tage

Nach 13-tägiger Kultivierung erfolgte die Dokumentation des Sproutings in 2- bzw. 5- sowie bei ausgewählten Bereichen in 10-facher Vergrößerung.

#### **2.2.1.4 Fixierung und Paraffineinbettung des Gewebes**

Zur Fixierung des Gewebes wurde nach Entfernung des Mediums 900 µl 4 % PFA/PBS pro Well über 24 h bei RT eingesetzt. Um das Herauslösen der Kollagengele zu erleichtern, folgte im Anschluss an das Abpipettieren des Fixiermittels das Umranden der

Wells mittels einer Kanüle. Daraufhin konnte das in Kollagen eingebettete Gewebe mit Hilfe einer Pinzette in beschriftete Einbettkassetten und diese wiederum in 70 % Ethanol übertragen werden. Nach zweimaligem Waschen in 70 % Ethanol für jeweils 60 min, folgte die in Tabelle 15 beschriebene Einbettung des Gewebes in Paraffin. Dahingegen wurden die frisch isolierten Herzstücke, die nach Entnahme in 4 % PFA übertragen worden waren, 3 h in PBS und anschließend 2 x 30 min in 70 % Ethanol gewaschen, bevor die Paraffineinbettung stattfand.

**Tabelle 15:** Paraffineinbettung

<b>Reagenz/Lösung</b>	<b>Zeit</b>
70 % Ethanol	2 x 30 min
80 % Ethanol	60 min
96 % Ethanol	60 min
100 % Ethanol	3 x 60 min
Xylol	3 x 60 min
Paraffin	2 x 180 min

Abschließend wurde das Gewebe in flüssiges Paraffin eingebracht, um nach dem Aushärten auf einer Kühlplatte kompakte Blöckchen für nachgeschaltete histologische Untersuchungen zu erhalten.

### **2.2.1.5 Herstellung der Paraffinschnitte**

Mit Hilfe eines Mikrotoms konnten aus dem in Paraffin eingebrachten Gewebe dünne Schnitte angefertigt werden. Dabei variierte die Schnittdicke zwischen 6 µm bei frisch isolierten Organstücken und 10 µm nach Kultivierung. Zur Vermeidung von Furchen wurden diese anschließend für 5 bis 10 min in ein 45 °C heißes Wasserbad gegeben, bevor das Aufziehen auf SuperFrost® plus Objektträger folgte. Um das Ablösen während der später folgenden Demaskierung zu verhindern, wurde überschüssiges Wasser mit Hilfe von Filterpapier entfernt und die Objektträger über Nacht im Trockenschrank bei 37 °C gelagert.

## 2.2.2 Methoden zur Antigendetektion

Zur Detektion spezifischer Antigene dienten sowohl immunhistochemische Untersuchungen als auch die Darstellung mittels Immunfluoreszenz. Die Auswahl geeigneter Schnitte erfolgte vorab mit Hilfe stichprobenartig durchgeführter Hämatoxylin-Eosin-Färbungen.

### 2.2.2.1 Auswahl adäquater Schnitte mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung

In Tabelle 16 sind die in der Histologie essentielle Entparaffinierung durch Xylol und die Rehydratisierung mittels einer absteigenden Ethanol-Reihe dargestellt.

**Tabelle 16:** Entparaffinierung und Rehydratisierung

<b>Schritt</b>	<b>Reagenz/Lösung</b>	<b>Zeit</b>
<b>Entparaffinierung</b>	Xylol	2 x 10 min
<b>Rehydratisierung</b>	100 % Ethanol	2 x 2 min
	96 % Ethanol	2 min
	80 % Ethanol	2 min
	70 % Ethanol	2 min
	50 % Ethanol	2 min
	Aqua dest.	2 min

Zur Anfärbung der basophilen Strukturen fand die Hämalaunlösung nach Mayer Verwendung, wobei nach einer Spülung mit Aqua dest. fließendes Leitungswasser zum Bläuen und Stabilisieren diente. Beide Vorgänge nahmen jeweils 10 min bei RT in Anspruch. Daraufhin folgte, eingelagert zwischen zwei kurzen Waschschritten in Aqua dest., die Darstellung der azidophilen Zellbestandteile mit Hilfe von 0,1 % Eosin (10 min bei RT). Durch das Übertragen in 96 % Ethanol für 2 min und nachfolgend in 100 % Ethanol und Xylol für jeweils 2 x 5 min fand die Dehydrierung des Gewebes statt, welches abschließend mit Hilfe von DePeX eingedeckt werden konnte.

Als Kriterien für die Auswahl der Schnitte wurden in erster Linie Anzahl und Beschaffenheit der im Gewebe vorliegenden Koronararterien herangezogen.

### 2.2.2.2 Immunhistochemie

Zur immunhistochemischen Charakterisierung der kardialen Gewebeschnitte diente im Wesentlichen die Darstellung spezifischer Antigene mittels Diaminobenzidin. Die immunhistochemischen Färbungen wurden an den aus den Paraffinblöcken hergestellten Gewebeschnitten (6-10 µm dick) durchgeführt.

Im Zuge dessen erfolgte nach der Entparaffinierung und Rehydratisierung (Xylol 2 x 10 min, 100 % Ethanol 2 x 5 min, 96 % Ethanol 5 min, 80 % Ethanol 5 min, 70 % Ethanol 5 min, Aqua dest. 5 min) die Blockierung der endogenen Peroxidase durch eine 10-minütige Exposition zu 3 % Wasserstoffperoxid unter Lichtausschluss. Das im Anschluss sieben Mal durchgeführte und jeweils 10 Sekunden andauernde intervallartige Aufkochen in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) diente der Antigendemaskierung. Nach dem Abkühlen und Ersetzen des Puffers durch fließendes Aqua dest. für 5 min, folgten drei Waschschritte in PBS für jeweils 5 min und das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5 %ige-Serum-PBS-Lösung für 2 h bei RT. Der Primärantikörper wurde in geeigneter Verdünnung in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS über Nacht bei 4 °C aufgebracht. Das Abspülen mit PBS mit Hilfe einer Pasteurpipette und dreimal 5-minütiges Waschen in PBS am folgenden Tag halfen bei der Entfernung ungebundener Primärantikörper, woraufhin der Sekundärantikörper in passender Verdünnung in 1 %iger Serum-PBS-Lösung für 1 h bei RT zugegeben werden konnte. Der AB-Komplex, bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase, wurde in einer Verdünnung von 1:250 in PBS hergestellt und nach Ende der Inkubationszeit und drei 5-minütigen Waschschritten in PBS auf die Schnitte aufgetragen. Nach Ablauf von 30 min bei RT wurden die Objektträger jeweils zweimal in PBS und in 0,1 M PB-Puffer für jeweils 5 min unter Lichtausschluss gewaschen, bevor das Einbringen in die DAB-Entwicklungslösung, deren Zusammensetzung in Tabelle 17 beschrieben ist, erfolgte.

**Tabelle 17:** Zusammensetzung der DAB-Entwicklungslösung

<b>Reagenz/Lösung</b>	<b>Volumen</b>
PB-Puffer 0,1 M pH 7,4	67,5 ml
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat (13 mg/ml)	1350 µl
Glucose (10 %)	1350 µl

---

Ammoniumchlorid (180 mg/ml)	150 µl
DAB-Stammlösung (22,5 mg/ml Tris-NaCl Puffer)	1,5 ml
Glucose-Oxidase (1,2 mg/ml)	225 µl

---

Die regelmäßige mikroskopische Begutachtung diente der Kontrolle der Färbereaktion, welche nachfolgend durch die Gabe in PBS abgestoppt wurde. Im Anschluss an dreimaliges Waschen in PBS für jeweils 3 min fand, eingelagert zwischen zwei kurzen Waschschritten in Aqua dest., eine histologische Kernfärbung mittels einer 0,1 % Kernechtrot-Lösung statt. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte zur Dehydrierung, welche in Tabelle 18 dargestellt ist, zugeführt und die Eindeckung der Paraffinschnitte mit DePeX durchgeführt.

**Tabelle 18:** Dehydrierung

---

<b>Reagenz/Lösung</b>	<b>Zeit</b>
70 % Ethanol	1 min
80 % Ethanol	1 min
96 % Ethanol	1 min
100 % Ethanol	2 x 3 min
Xylol	2 x 5 min

---

### 2.2.2.3 Immunfluoreszenz

Als weitere Möglichkeit zur Detektion der Antigene diente neben der Immunhistochemie die Immunfluoreszenz. Dabei stand vor allem die Charakterisierung verschiedener Antigene und möglicher Ko-Lokalisationen durch die Verknüpfung von Immunhistochemie und Immunfluoreszenz oder durch die Verwendung unterschiedlicher Fluorochrome im Vordergrund.

Zur Kopplung von Immunhistochemie und Immunfluoreszenz erfolgte zunächst die bereits beschriebene Antigendarstellung mittels Diaminobenzidin, welche nach Abstoppen der Färbereaktion und drei 3-minütigen Waschschritten in PBS durch die Immunfluoreszenz ergänzt wurde. Dazu war, im Anschluss an das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch 5 % NGS/PBS für 2 h bei RT, eine Inkubationszeit des Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS über Nacht bei

4 °C einzuhalten. Am nächsten Tag folgte dreimal 5-minütiges Waschen in PBS, bevor der mit einem Fluorochrom gekoppelte Sekundärantikörper in passender Verdünnung in 1 %iger-Serum-PBS-Lösung für einen Zeitraum von 1 h bei RT zugegeben werden konnte. Nach drei Waschschritten von jeweils 3 min in PBS diente die 10-minütige Inkubation mit 1 µg/ml DAPI in PBS zur Markierung der Zellkerne. Abschließend wurde das Gewebe fünfmal 3 min in PBS gewaschen und mit Hilfe von Mowiol-DABCO eingedeckt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei 4 °C.

Bei der Verwendung verschiedener Fluorochrome zur Darstellung der Antigene mittels Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde hinsichtlich Entparaffinierung, Rehydratisierung, Blockierung der endogenen Peroxidase und Antigendemaskierung analog zur Immunhistochemie vorgegangen. Im Anschluss diente die Zugabe von 5 % NRS/PBS für 2 h bei RT zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, bevor das Auftragen der beiden Primärantikörper in geeigneter Verdünnung in 1 % NRS/0,2 % BSA/PBS über Nacht bei 4 °C erfolgte. Nach drei 5-minütigen Waschschritten in PBS am nächsten Tag wurden die mit unterschiedlichen Fluorochromen gekoppelten Sekundärantikörper in passender Verdünnung in PBS für 1 h bei RT zugegeben. Sowohl die Kernfärbung mit DAPI als auch die Eindeckung und Lagerung erfolgten wie bereits bei der Einzelfärbung beschrieben.

### **2.2.3 Quantifizierung und statistische Analyse**

Die Programme ImageJ, Excel 2013 und PowerPoint 2013 wurden bei der Quantifizierung, statistischen Analyse und Darstellung der Daten verwendet.

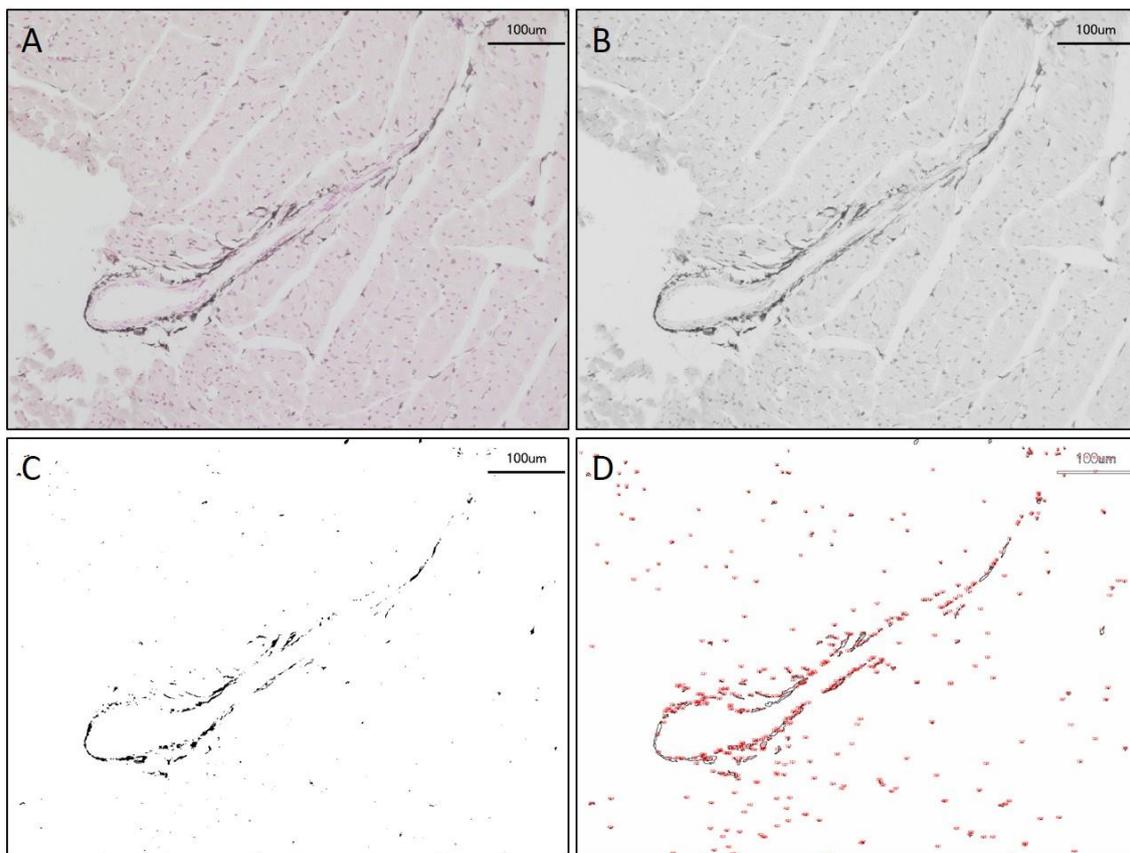
#### **2.2.3.1 Quantifizierung des Sproutings im CAA**

Zur Quantifizierung des Sproutings im CAA wurden mit Hilfe des Grafikprogrammes ImageJ sowohl das Areal des Sproutings als auch des Herzstückes bestimmt. Um eine Normierung hinsichtlich der Größe des kardialen Gewebes zu erreichen, wurde der Quotient  $\frac{\text{Areal Sprouting}}{\text{Areal Herzstück}}$  gebildet. Es folgte die Eintragung der Daten in Excel-Tabellen und die Berechnung von Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und t-Test.

### 2.2.3.2 Histologische Quantifizierung

Die histologische Quantifizierung erfolgte an immunhistochemisch gefärbten und am Keyence-Mikroskop in 2- bzw. 20-facher Vergrößerung dokumentierten Paraffinschnitten.

Zunächst wurde das Areal des gesamten kardialen Gewebes in einer 2-fachen Vergrößerung mittels ImageJ und nachfolgend die für das entsprechende Antigen als positiv markierte Zellenzahl in 20-fach vergrößerten Teilbildern bestimmt (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Histologische Quantifizierung anhand immunhistochemisch gefärbter Paraffinschnitte.**

Das Originalbild (A) wurde mit Hilfe von ImageJ in ein 16-Bit Graustufenbild konvertiert (B) und die für das entsprechende Antigen als positiv markierten Zellen als Partikel dargestellt (C). Anschließend konnten diese analysiert und ausgezählt werden (D).

Zur Normierung wurde aus der Summe der in den Einzelbildern definierten positiven Zellen und dem zuvor ausgemessenen Areal des Herzstückes der Quotient gebildet. Dieser wurde in Excel-Tabellen eingetragen und Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler und t-Test berechnet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Etablierung verschiedener Kultivierungsbedingungen für den CAA und deren Auswirkungen auf das Sprouting**

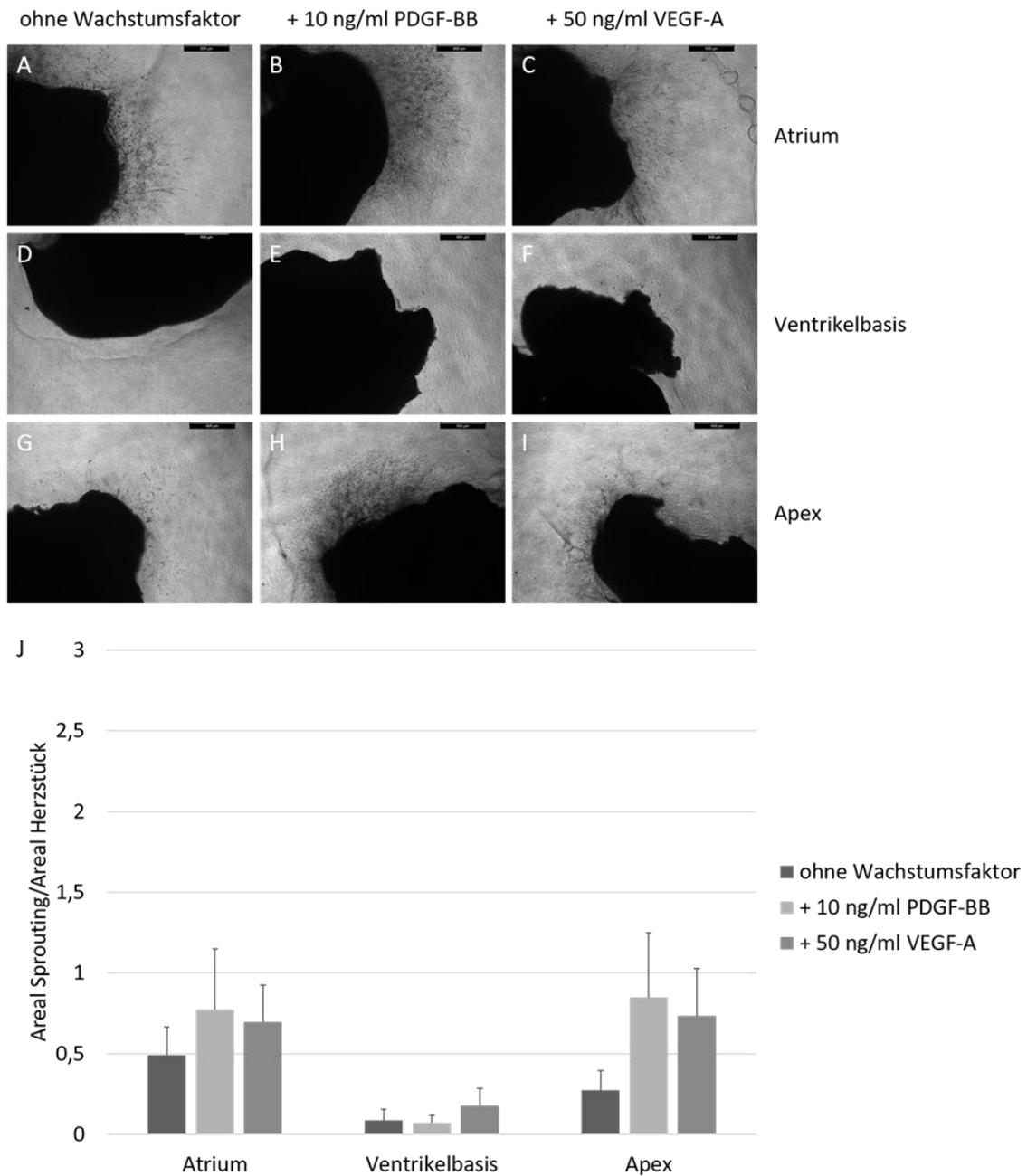
Bereits mehrere Studien konnten die Existenz Gefäßwand-residenter Stammzellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in unterschiedlichste Zelltypen zu differenzieren, nachweisen (Zengin et al., 2006; Ergün et al., 2011; Psaltis and Simari, 2015; Wörsdörfer et al., 2017). Um präzisere Erkenntnisse über die Differenzierung der Gefäßwand-residenten Stammzellen in beispielsweise Endothel- oder glatte Muskelzellen zu erlangen und ihre Rolle bei der kardialen Angiogenese besser zu verstehen, diente der CAA als Ausgangspunkt und als wesentliches *ex vivo* Modell der vorliegenden Untersuchungen. Im Folgenden sollten daher zuerst verschiedene Kultivierungsbedingungen etabliert und deren Auswirkungen auf das Sprouting im CAA analysiert werden.

##### **3.1.1 Maximales Sprouting wird durch die Kultivierung basisnaher Herzsegmente unter Normoxie und Zugabe von PDGF-BB erreicht**

Um einen möglichen Effekt verschiedener Kultivierungsbedingungen, wie beispielsweise des Sauerstoffgehalts der Umgebung, auf die Quantität des Sproutings zu untersuchen, wurden die Herzstücke sowohl unter Hypoxie (2 % O<sub>2</sub>) als auch unter Normoxie (21 % O<sub>2</sub>) kultiviert. Weiterhin erfolgte die Aufteilung des Gewebes in Atrien, basis- und apexnahe Ventrikelanteile, um einen möglichen Effekt des aus unterschiedlichen Herzarealen stammenden Gewebes auf die Sproutingkapazität im CAA zu eruieren. PDGF-BB und VEGF-A fungierten als potenzielle Wachstumsfaktoren. Zur Quantifizierung wurden das Areal des Sproutings und die Größe des Herzgewebes bestimmt und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt.

Bei der Kultivierung unter Hypoxie zeigte sich dabei insgesamt ein wenig ausgeprägtes Wachstum, wobei dieser Effekt vor allem bei Gewebe aus dem Bereich der Ventrikelbasis deutlich wurde (Abbildung 2). Im Vergleich dazu wurden im CAA unter Normoxie deutlich größere Wachstumsraten erzielt. Diese Wirkung konnte besonders bei Gewebe aus den Atrien und der Ventrikelbasis, das heißt den basisnahen Herzsegmenten, beobachtet werden (Abbildung 3). Weiterhin führte hier der Zusatz von 10

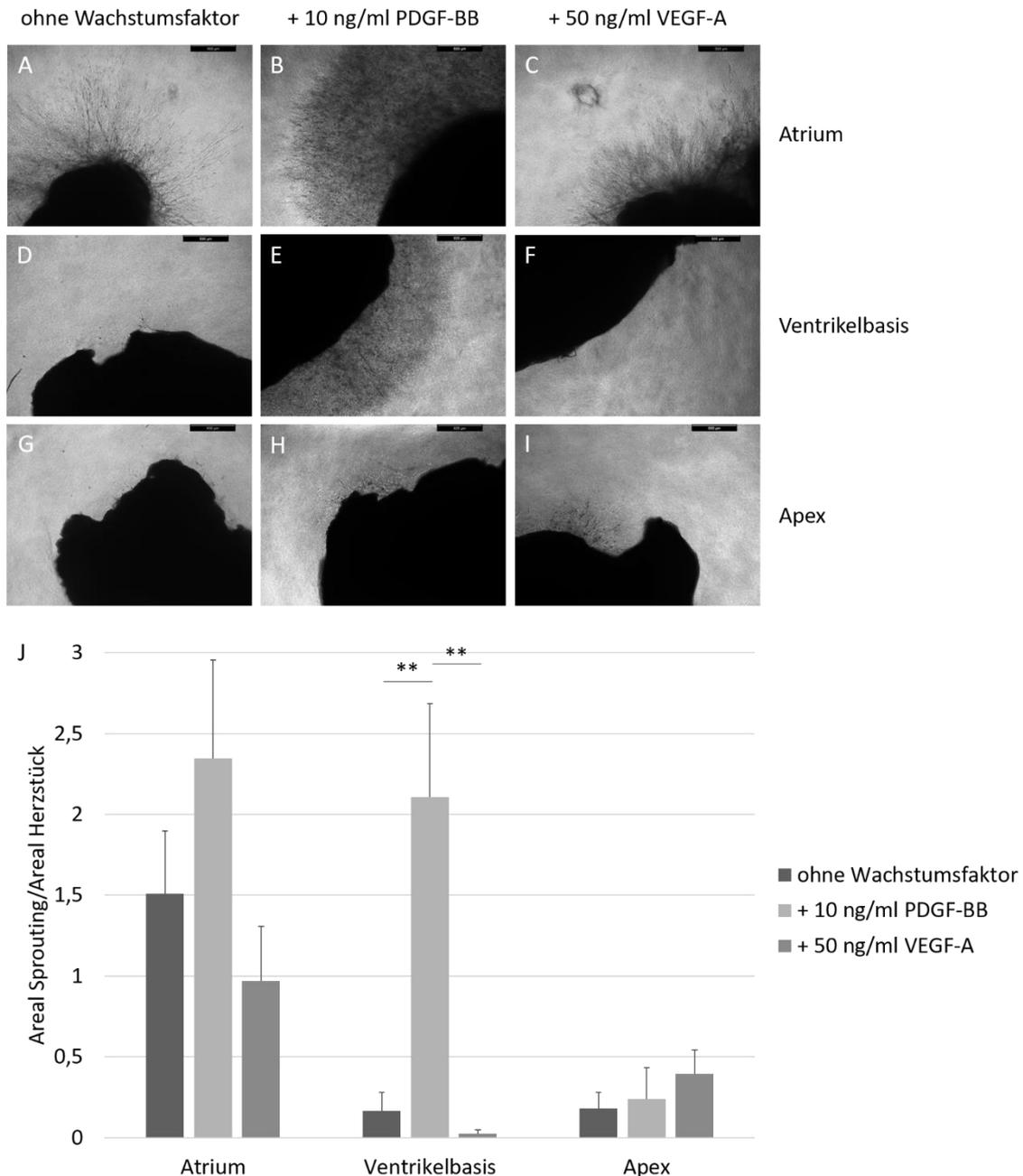
ng/ml PDGF-BB bei den atrialen Herzsegmenten zu einer sichtlichen und bei den basisnahen Ventrikelanteilen zu einer signifikanten Zunahme des Sproutings (Abbildung 3).



**Abbildung 2: Das Sprouting im CAA zeigt unter Hypoxie insgesamt nur eine geringe Ausprägung.**

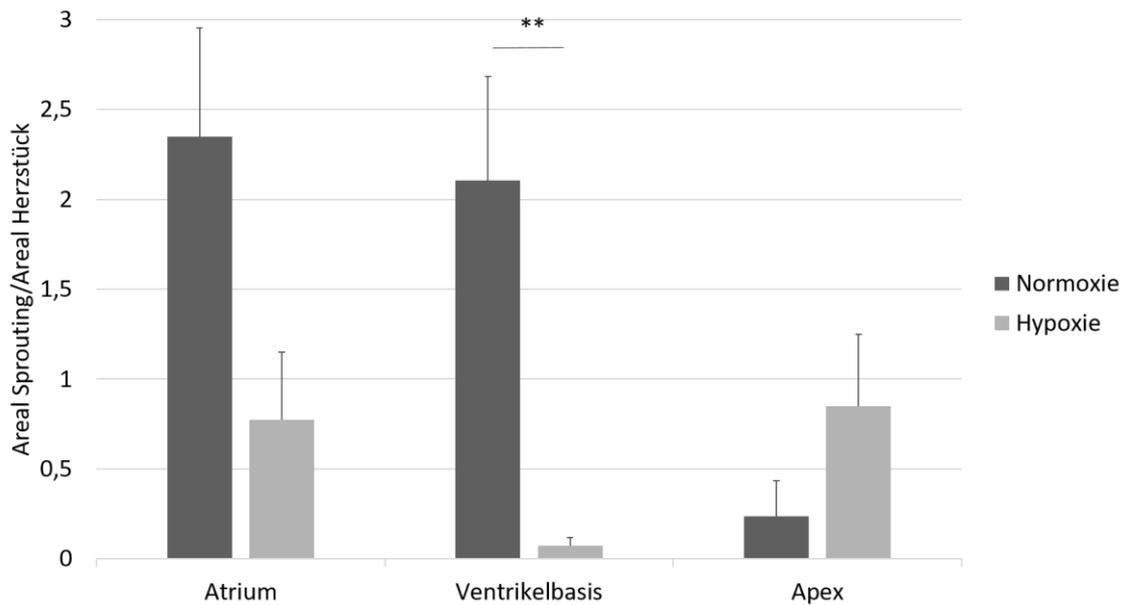
Das den Atrien (A-C), basis- (D-F) und apexnahen Ventrikelanteilen (G-I) zugeordnete Herzgewebe wurde für 11-13 Tage teils unter Zugabe der Wachstumsfaktoren PDGF-BB (mittlere Spalte) und VEGF-A (rechte Spalte) kultiviert. Der Sauerstoffgehalt der Umgebung lag bei 2 %. Anschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes und die Dokumentation des Sproutings. Der Maßstab entspricht 500 µm. (J) Zur Quantifizierung und Normierung des Wachstums wurde das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. n = 6-7. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Das Wachstum des Gewebes aus dem Apex des Herzens war jedoch unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung oder dem Zusatz von Wachstumsfaktoren insgesamt nur gering ausgeprägt (Abbildungen 2 und 3).



**Abbildung 3: Im CAA werden unter Normoxie größere Wachstumsraten erzielt.**

Das den Atrien (A-C), basis- (D-F) und apexnahen Ventrikelanteilen (G-I) zugeordnete Herzgewebe wurde für 11-13 Tage teils unter Zugabe der Wachstumsfaktoren PDGF-BB (mittlere Spalte) und VEGF-A (rechte Spalte) kultiviert. Der Sauerstoffgehalt der Umgebung lag bei 21 %. Anschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes und die Dokumentation des Sproutings. Der Maßstab entspricht 500  $\mu$ m. (J) Zur Quantifizierung und Normierung des Wachstums wurde das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. n = 6-8. \*\* = p < 0,01. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.



**Abbildung 4: Unter Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB führt die Kultivierung unter Normoxie zu einem stärker ausgeprägten Sprouting.**

Kardiale Gewebestücke wurden für 11-13 Tage unter Normoxie (n = 7-8) und unter Hypoxie (n = 6-7) kultiviert. Dabei wurde 10 ng/ml PDGF-BB als Wachstumsfaktor zugesetzt. Anschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes und die Dokumentation des Sproutings. Zur Quantifizierung und Normierung des Wachstums wurde das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. \*\* =  $p < 0,01$ . Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

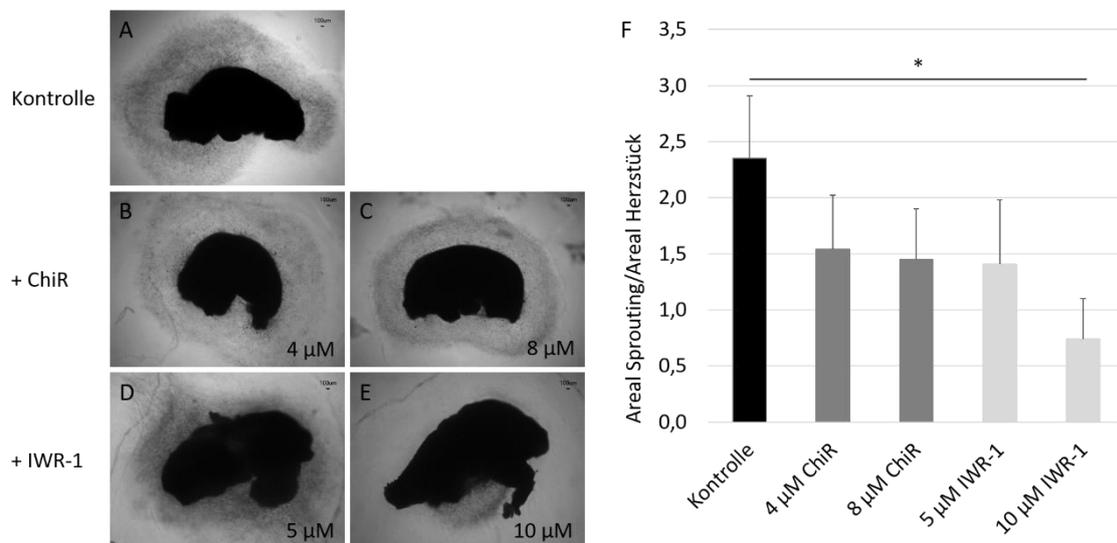
In der direkten Gegenüberstellung des Sproutings unter Normoxie und unter Hypoxie zeigte sich unter Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB bei den atrialen Gewebeteilen eine deutliche Tendenz zum stärkeren Wachstum unter Normoxie, während bei den basisnahen Ventrikelanteilen ein signifikanter Effekt festgestellt werden konnte (Abbildung 4). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass maximales Sprouting durch die Kultivierung basisnaher Herzsegmente bei Normoxie und unter Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB erreicht wird. Daher erfolgte im weiteren Verlauf die Fokussierung auf diese Bedingungen.

### 3.1.2 Inhibierung des Wnt-Signalwegs resultiert in verringertem Sprouting

Der Wnt-Signalweg spielt nicht nur während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, sondern ist zudem an der Gefäßneubildung und -stabilisierung nach Myokardinfarkt beteiligt (Paik et al., 2015; Augustin et al., 2017; Shen et al., 2017).

Im Folgenden sollte daher ein möglicher Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die Angiogenese-Kapazität im CAA untersucht werden. Dazu wurde einerseits der Wnt-

Aktivator CHIR 99021 in den Konzentrationen 4  $\mu\text{M}$  und 8  $\mu\text{M}$  und andererseits der Inhibitor IWR-1 in den Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zum Nährmedium gegeben. Das kardiale Gewebe wurde für 13 Tage unter Normoxie und unter Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB kultiviert. Zur Analyse wurde das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. Dabei stellte sich heraus, dass die Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch 10  $\mu\text{M}$  IWR-1 zu einer signifikanten Reduktion des Sproutings führt (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu hatten weder eine niedrigere IWR-1-Konzentration, noch der Wnt-Aktivator CHIR 99021 einen signifikanten Effekt (Abbildung 5). Dies spricht für eine konzentrationsabhängige Hemmung des Sproutings aus dem kardialen Gewebe im CAA durch IWR-1.



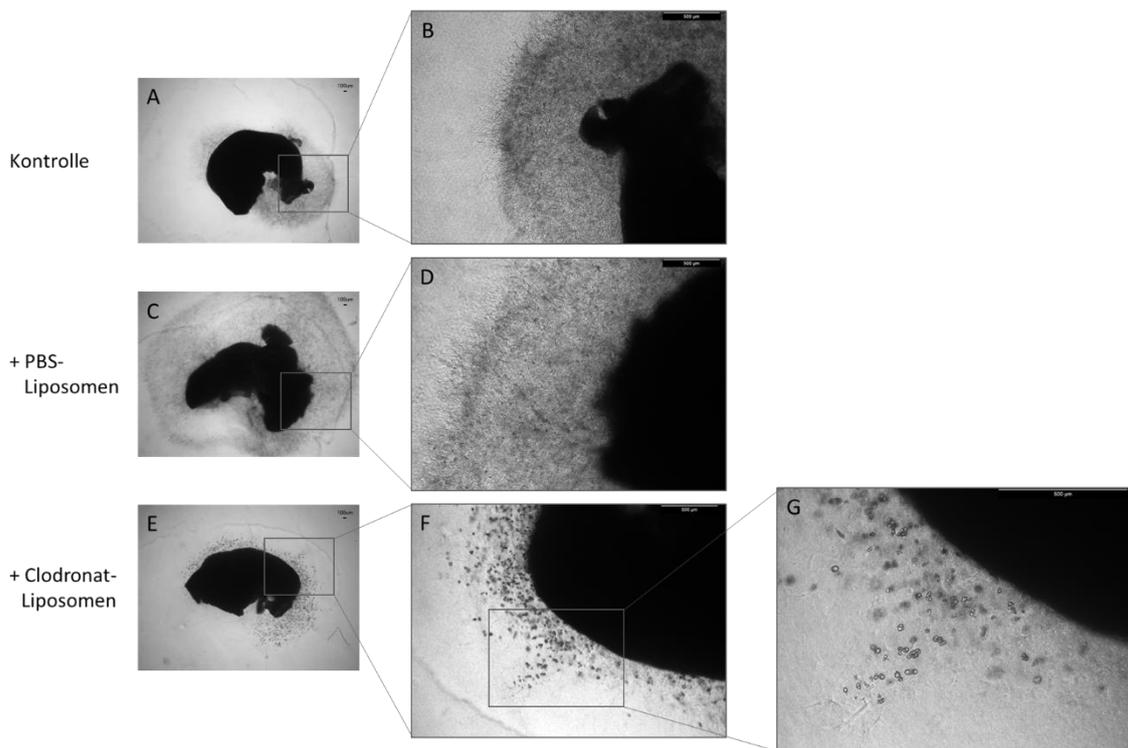
**Abbildung 5: Inhibition des Wnt-Signalwegs durch 10  $\mu\text{M}$  IWR-1 führt zu einem signifikant verringertem Sprouting im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde für 13 Tage unter Normoxie und unter Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. (A) Dabei fungierte Gewebe ohne den Zusatz von CHIR 99021 bzw. IWR-1 als Kontrolle (n = 9). (B-C) Der Wnt-Aktivator CHIR 99021 wurde in Konzentrationen von 4  $\mu\text{M}$  (n = 9) und 8  $\mu\text{M}$  (n = 6) eingesetzt. (D-E) Als Wnt-Inhibitor diente 5  $\mu\text{M}$  (n = 9) und 10  $\mu\text{M}$  (n = 6) IWR-1. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ . (F) Nach Fixierung und Dokumentation erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die Normierung hinsichtlich der Größe des Herzsegments. \* = p < 0,05. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

### 3.1.3 Clodronat-Liposomen induzieren eine Veränderung der Morphologie des Sproutings

Bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie Wundheilung, Tumorstadium oder Myokardinfarkt, stellt die Interaktion zwischen Angiogenese und

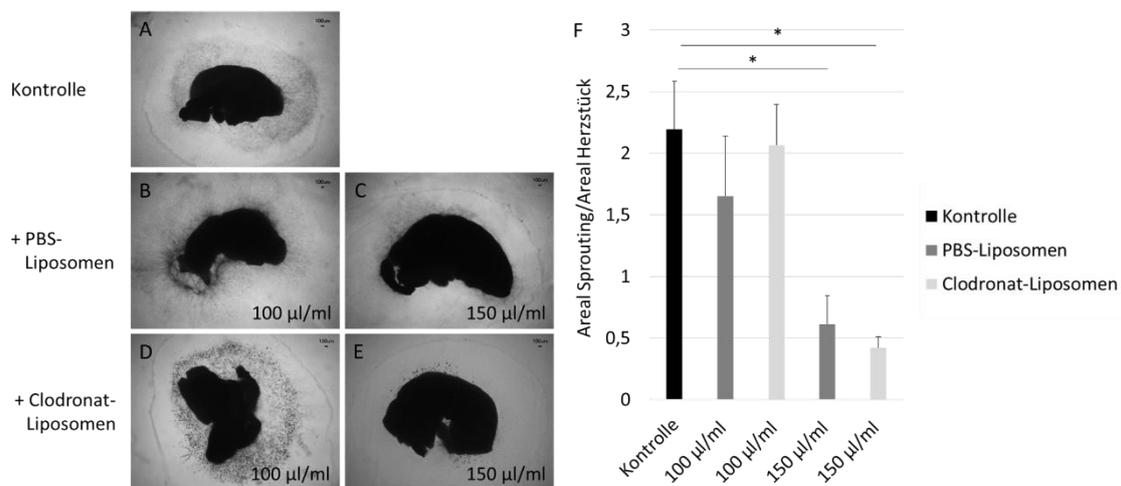
Inflammation einen zentralen Aspekt dar (Szade et al., 2015). So konnte beispielsweise an einem neonatalen Mausmodell der Einfluss von Makrophagen, die eine Schlüsselrolle in der Regulation von inflammatorischen Prozessen einnehmen, auf die Regeneration und Angiogenesekapazität des kardialen Gewebes nach einem Myokardinfarkt gezeigt werden (Aurora et al., 2014). Kürzlich erhobene Daten konnten zudem die Bedeutung der Immunzellen bei der Differenzierung von Gefäßwand-residenten Progenitorzellen hervorheben. Erfolgte zum Beispiel *in vitro* die Depletion der Makrophagen durch Clodronat-Liposomen, wurde die Differenzierung von Flk-1<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>Sca-1<sup>-</sup> Vorläuferzellen der Adventitia muriner Aorta in spontan schlagende Kardiomyozyten unterbunden (Mekala et al., 2018). Die Interaktion zwischen Inflammation und Angiogenese bzw. Differenzierung von Vorläuferzellen wird dabei durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise VEGF-A, reguliert, das von Makrophagen freigesetzt werden kann (Leibovich et al., 2002; Carmeliet and Jain, 2011; Kim et al., 2013; Mekala et al., 2018).



**Abbildung 6: Clodronat-Liposomen induzieren eine Veränderung der Morphologie des Sproutings im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde für 13 Tage unter Normoxie und Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. (A-B) Dabei fungierte Gewebe ohne Zusatz von Liposomen als Kontrolle. (C-D) PBS-Liposomen wurden in der Konzentration 100 µl/ml eingesetzt. (E-G) Zur Makrophagedepletion dienen 100 µl/ml Clodronat-Liposomen. Der Maßstab entspricht 100 µm (A, C, E) bzw. 500 µm (B, D, F, G).

Um die Funktion der Makrophagen im CAA genauer zu untersuchen, wurden Clodronat-Liposomen zur Depletion eingesetzt. Diese werden von den Makrophagen phagozytiert und setzen nach Fusion der Endosomen mit den Lysosomen das Clodronat ins Zytoplasma frei. Aus dem Fehlen der Immunzellen und den daraus folgenden Auswirkungen können Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser bei der Angiogenese gezogen werden (Buiting and Rooijen, 1994). Zu diesem Zweck erfolgte die Zugabe von 100  $\mu\text{l/ml}$  bzw. 150  $\mu\text{l/ml}$  Clodronat-Liposomen zum Nährmedium. Das kardiale Gewebe wurde für 13 Tage unter Normoxie und Zusatz des Wachstumsfaktors PDGF-BB kultiviert. Dabei war ein Effekt des Clodronats auf die Morphologie des Sproutings zu beobachten (Abbildung 6). Im Gegensatz zum flächigen, feinretikulären Wachstumsmuster des Kontrollgewebes und unter Zusatz von PBS-Liposomen, präsentierte sich dieses unter Kultivierung mit Clodronat-Liposomen in einzelnen rundlichen Zellen, die punktuell verteilt waren, keine Vernetzung untereinander und keine gerichtete Bildung von Zellsträngen oder kapillarähnlichen Aussprossung aufwiesen (Abbildung 6).



**Abbildung 7: Die Quantität des Sproutings im CAA wird durch die Zugabe von Clodronat-Liposomen im Vergleich zu PBS-Liposomen nicht beeinflusst.**

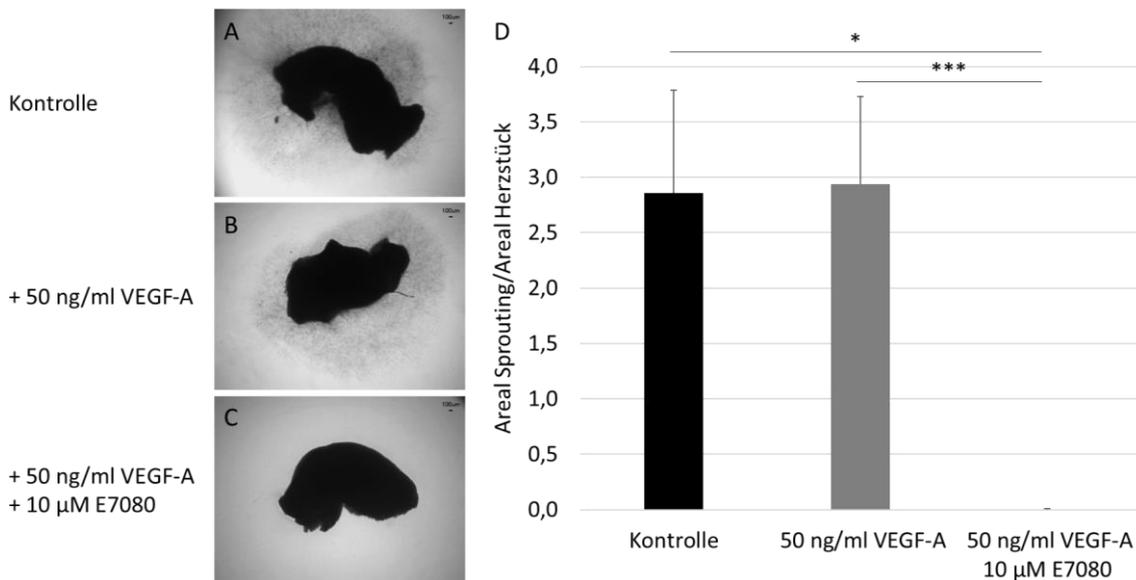
Die Kultivierung der Herzstücke erfolgte für 13 Tage unter Normoxie und Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB. (A) Gewebe ohne Zusatz von Liposomen (n = 22) diente als Kontrolle. (B-C) Die PBS-Liposomen wurden in den Konzentrationen 100  $\mu\text{l/ml}$  (n = 14) und 150  $\mu\text{l/ml}$  (n = 8) verwendet. (D-E) Zur Makrophagendepletion wurden 100  $\mu\text{l/ml}$  (n = 14) bzw. 150  $\mu\text{l/ml}$  (n = 8) Clodronat-Liposomen eingesetzt. Der Maßstab entspricht 100  $\mu\text{m}$ . (F) Zur Quantifizierung und Normierung des Wachstums wurde das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. \* =  $p < 0,05$ . Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Hinsichtlich der Quantität des Sproutings konnte unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen kein Unterschied zwischen PBS- und Clodronat-Liposomen festge-

stellt werden (Abbildung 7). In höherer Dosierung zeigte sich jedoch sowohl unter Zugabe von Clodronat- als auch von PBS-Liposomen im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant vermindertes Wachstum (Abbildung 7). Auch gaben nachgeschaltete immunhistochemische Darstellungen der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen Hinweise auf einen möglichen hemmenden Einfluss der PBS-Liposomen auf histologischer Ebene (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.4 Lenvatinib bewirkt eine Blockade des Sproutings

Der Wachstumsfaktor VEGF-A und sein Rezeptor VEGFR-2 besitzen in der Regulation der Angiogenese einen bedeutenden Stellenwert. Durch die Initiierung eines komplexen Prozesses ist es VEGFR-2 und seinem Hauptliganden VEGF-A möglich, die Neubildung von Gefäßen sowohl im Tumorkontext als auch unter physiologischen Umständen zu fördern (Ferrara, 2002, 2009; Carmeliet and Jain, 2011).

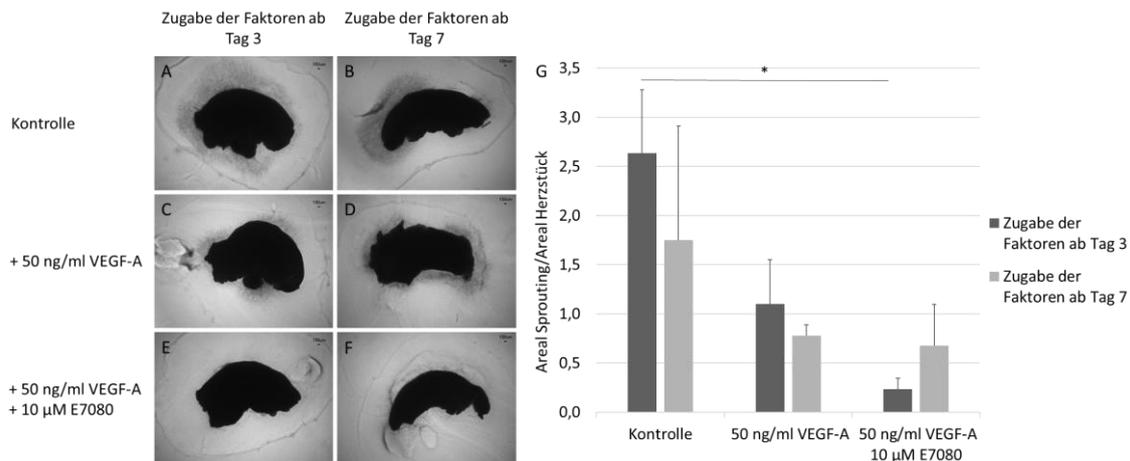


**Abbildung 8: Lenvatinib bewirkt eine hoch signifikante Blockade des Sproutings im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde für 13 Tage unter Normoxie und unter Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. (A) Ansätze ohne weiteren Zusatz fungierten als Kontrolle. (B) Die Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A diente als zusätzliche Vergleichsmöglichkeit. (C) Als Tyrosinkinaseinhibitor wurde 10 µM E7080 mit 50 ng/ml VEGF-A eingesetzt. Der Maßstab entspricht 100 µm. (D) Zur Quantifizierung wurde mittels ImageJ das Areal des Sproutings bestimmt und dieses in Relation zur Größe des im CAA verwendeten Herzgewebes gesetzt. n = 6. \* = p < 0,05; \*\*\* = p < 0,005. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Im Folgenden sollte daher der Einfluss von VEGF auf die Angiogenese-Kapazität im CAA eruiert werden. Dazu wurde der hochpotente Multi-Tyrosinkinaseinhibitor Len-

vatininib (= E7080) eingesetzt. Dieser ist durch seine Wirkung auf unter anderem VEGFR1-3 in der Lage, eine Hemmung der Angiogenese und damit beispielsweise eine Verminderung von Tumorwachstum und -progress hervorzurufen (Matsui et al., 2008a, 2008b; Tohyama et al., 2014; Wiegering et al., 2014). Im Zuge dessen wurde 10  $\mu$ M Lenvatinib zusammen mit 50 ng/ml VEGF-A zum Standardmedium gegeben. Als Kontrollen dienten einerseits ein Ansatz ohne weiteren Zusatz von Wachstumsfaktoren und andererseits die Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A. Die Kultivierungsdauer lag bei 13 Tagen, bevor die Quantifizierung des Wachstums erfolgte. Unter Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib wurde dabei eine hoch signifikante Blockade des Sproutings im CAA erreicht (Abbildung 8). Damit konnte nicht nur die Hemmung der Angiogenese durch die Blockade des Tyrosinkinase-Rezeptor-Signalwegs im CAA bestätigt werden, sondern zudem konnte gezeigt werden, dass eine wesentliche Steuerung des Sproutings durch den Signalweg vorliegt.



**Abbildung 9: Unter Zugabe von Lenvatinib ab Tag 3 zeigt sich eine tendenziell stärker ausgeprägte Hemmung des Sproutings im CAA.**

Murines Herzgewebe wurde für 9 bzw. 13 Tage unter Normoxie und unter Zusatz von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. Die Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors erfolgte ab Tag 3 (linke Spalte) bzw. ab Tag 7 (rechte Spalte). (A-B) Gewebe ohne Zusatz bzw. (C-D) mit 50 ng/ml VEGF-A dienten als Kontrolle. (E-F) Lenvatinib wurde in der Konzentration 10  $\mu$ M zusammen mit 50 ng/ml VEGF-A zum Nährmedium gegeben. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. (G) Nach Fixierung und Dokumentation erfolgte die Quantifizierung mittels ImageJ und die Normierung hinsichtlich der Größe des Herzsegments. n = 4. \* = p < 0,05. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

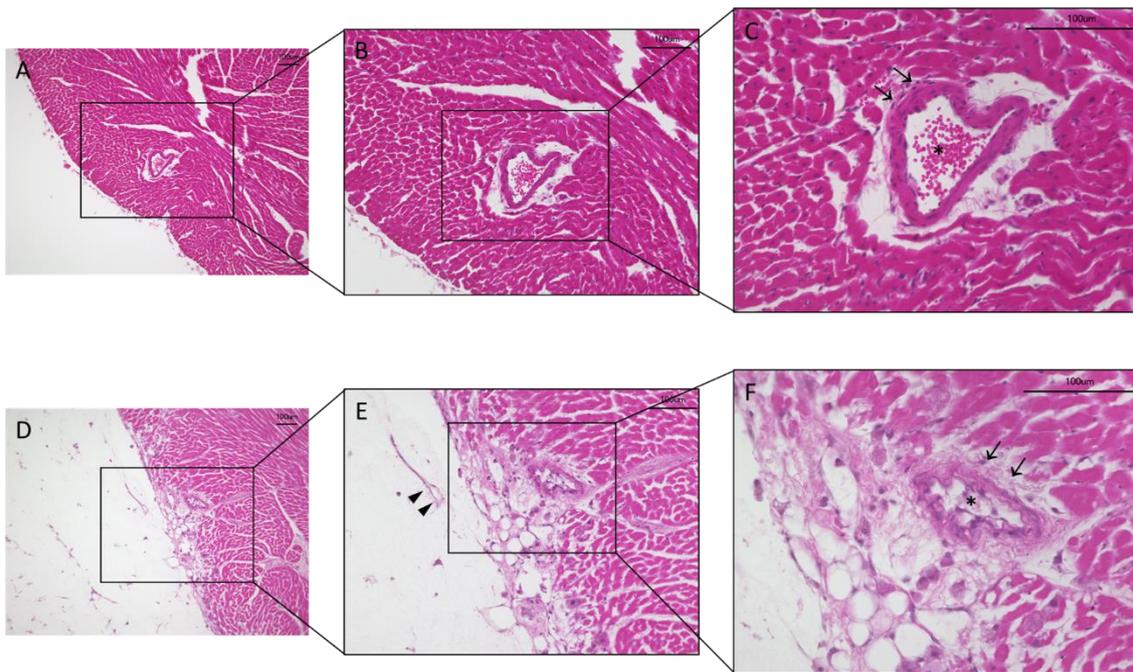
Zur detaillierteren Betrachtung der Wirkung von Lenvatinib auf die Sproutingkapazität im CAA wurde anschließend der Zugabebeginn der Faktoren auf zwei unterschiedliche Zeitpunkte festgelegt. Daraufhin folgte ein einheitlicher Behandlungszeitraum von sechs Tagen. Die Kultivierung erfolgte daher teils 9 und teils 13 Tage unter Normoxie

und Zusatz von 10 ng/ml PDGF-BB. Bei der Quantifizierung des Sproutings zeigte sich unter Zugabe des Tyrosinkinaseinhibitors ab Tag 3 eine tendenziell stärker ausgeprägte Hemmung des Wachstums, die sich im Vergleich mit Versuchsansätzen ohne Zusatz als signifikant herausstellte (Abbildung 9).

### 3.2 Histologische Untersuchungen an kardialen Gewebeproben

Um neben der Quantifizierung des Sproutings unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen weiterhin die Rolle der koronaren Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen bei der Angiogenese *ex vivo* zu untersuchen, wurden dem CAA nachgeschaltete histologische Methoden eingesetzt. Zur Detektion spezifischer Antigene, wie beispielsweise CD34 oder CD44, dienten sowohl die Darstellung mittels Immunhistochemie als auch mittels Immunfluoreszenz.

#### 3.2.1 Kultivierung im CAA resultiert in einer veränderten Gewebemorphologie



**Abbildung 10: H.E.-Färbung - Kultivierung im CAA resultiert in einer veränderten Gewebemorphologie.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A-C) bzw. 13 Tage unter Normoxie und Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB und 50 ng/ml VEGF-A kultiviert (D-F), anschließend fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Nach Kultivierung zeigten sich im Vergleich zu den frisch isolierten Schnitten sowohl die randständigen Kardiomyozyten als auch die Gefäßwand (schwarze Pfeile in (C) und (F)) deutlich aufgelockert. Im Bereich des Sproutings konnte zudem die Formation neu entstandener Gefäße beobachtet werden (schwarze Pfeilspitzen in (E)).

\* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Stichprobenartig durchgeführte Hämatoxylin-Eosin-Färbungen halfen nicht nur bei der Auswahl geeigneter Schnitte für nachfolgende histologische Analysen, sondern gaben auch einen Überblick über die Struktur des Gewebes. Dabei konnte ein Effekt der Kultivierung im CAA auf die Morphologie der Herzstücke beobachtet werden (Abbildung 10). Im Gegensatz zur kompakten Struktur der frisch isolierten Schnitte (Abbildung 10C), präsentierten sich nach Kultivierung einerseits vor allem die randständigen Kardiomyozyten und andererseits die Gefäßwand (Abbildung 10F, schwarze Pfeile) deutlich aufgelockert. Weiterhin konnte im Bereich des Sproutings in das Kollagengel die Formation neuer, durch Aussprossung entstandener Gefäße beobachtet werden (Abbildung 10E, schwarze Pfeilspitzen).

### **3.2.2 Charakterisierung Gefäßwand-residenter CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

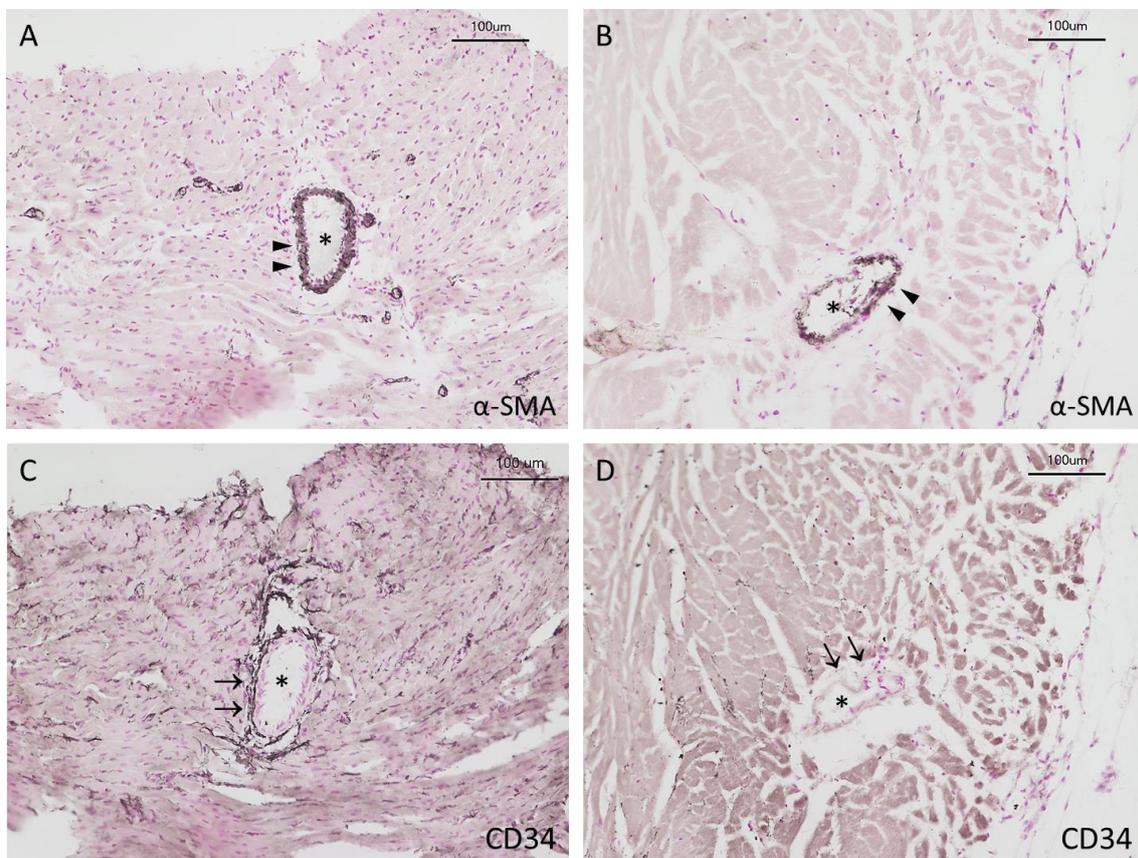
Die vaskulogene Zone in der Adventitia von Blutgefäßen dient als Reservoir verschiedenster Vorläuferzellen, darunter unter anderem CD34<sup>+</sup> Stammzellen, welche in der Lage sind, sich zu ECs, glatten Muskelzellen oder Perizyten zu differenzieren (Ergün et al., 2011; Wörsdörfer et al., 2017). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass sich derartige Vorläuferzellen (CD34<sup>+</sup>Flk-1<sup>+</sup>Sca<sup>-</sup>) aus der Adventitia muriner Aorta ohne genetische Manipulation zu spontanschlagenden Kardiomyozyten entwickeln können (Mekala et al., 2018).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten genauere Erkenntnisse über die Lokalisation, Aktivierung und Differenzierung dieser Stammzellen während der kardialen Angiogenese gewonnen und potenziell einflussnehmende Faktoren identifiziert werden. Dazu wurde die Expression spezifischer Antigene, wie beispielsweise von CD34,  $\alpha$ -SMA oder Ki67, mittels immunhistochemischer und immunfluoreszenztechnischer Methoden dargestellt, um verschiedenste Zelltypen im Rahmen ihrer Aktivierung und Mobilisierung während der Angiogenese im CAA immunphänotypisch nachweisen zu können.

#### **3.2.2.1 Kardiales Sprouting induziert eine Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

Zunächst erfolgte in einer immunhistochemischen Einzelfärbung mittels DAB die Gegenüberstellung von CD34<sup>+</sup> Zellen in frisch isoliertem und unter Normoxie und Zugabe

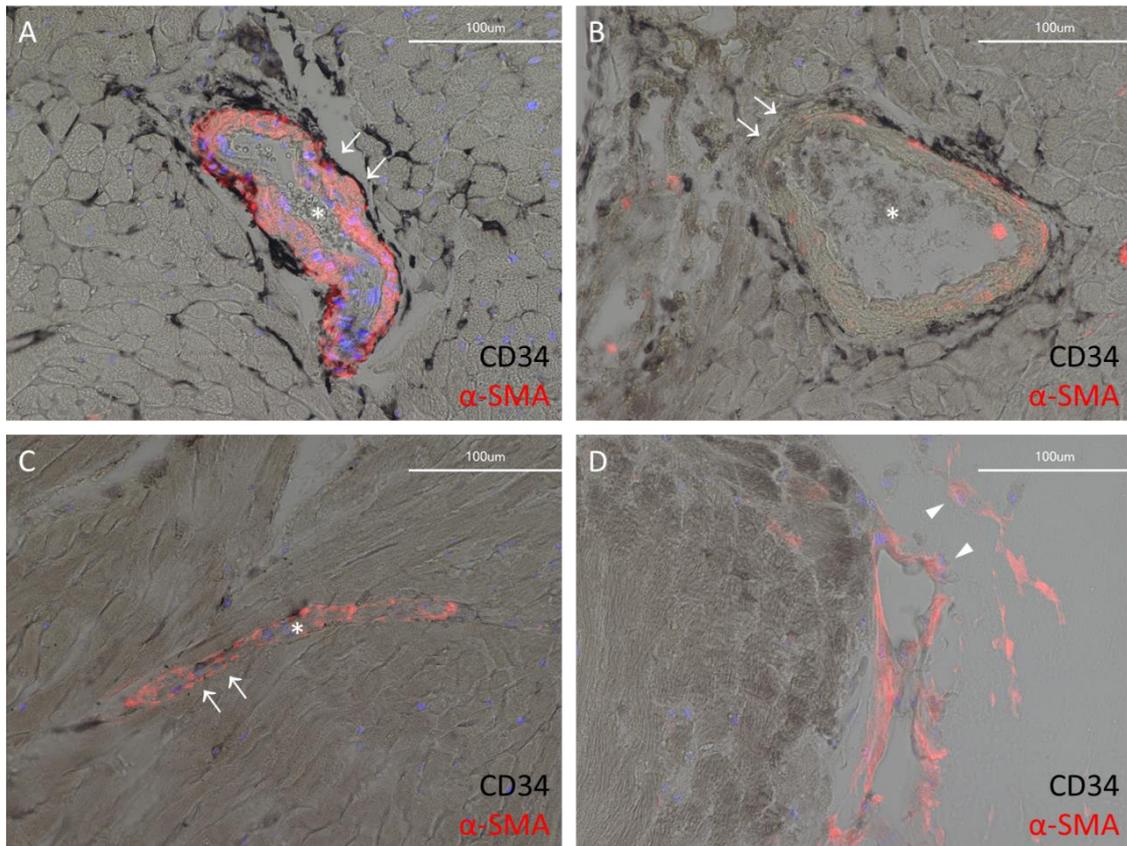
des Wachstumsfaktors PDGF-BB kultiviertem Gewebe. Bei der räumlichen Orientierung half weiterhin die Darstellung der *Tunica media* der Gefäßwand mittels  $\alpha$ -SMA an Folgeschnitten. Dabei präsentierten sich in den frisch isolierten Schnitten die  $CD34^+$  Zellen überwiegend in der Adventitia der Koronargefäße (Abbildung 11C, schwarze Pfeile), die sich von außen der *Tunica media* (Abbildung 11A, schwarze Pfeilspitzen) anlagert. Die Kultivierung im CAA unter Normoxie und PDGF-BB und das damit einhergehende kardiale Sprouting induzierten dagegen eine Aktivierung und Mobilisierung der  $CD34^+$  Stammzellen, die sich durch eine Auswanderung dieser aus der vaskulogenen Zone der Adventitia (Abbildung 11D, schwarze Pfeile) zeigte.



**Abbildung 11: Einzelfärbung  $\alpha$ -SMA bzw. CD34 – Kardiales Sprouting im CAA induziert eine Aktivierung und Mobilisierung koronarer, adventitieller  $CD34^+$  Stammzellen.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A, C) bzw. unter Normoxie und 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert (B, D), fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Detektion von  $\alpha$ -SMA (A-B) bzw. CD34 (C-D) erfolgte durch spezifische Antikörper. In den frisch isolierten Schnitten präsentierten sich die  $CD34^+$  Zellen in der Adventitia (schwarze Pfeile in (C)), die auf die *Tunica media* (schwarze Pfeilspitzen in (A) und (B)) der Koronargefäße folgt. Nach Kultivierung lagen kaum noch  $CD34^+$  Zellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia (schwarze Pfeile in (D)) vor. \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

Durch die Verknüpfung der DAB-Immunhistochemie und der Immunfluoreszenzmethode gelang weiterhin die zeitgleiche Darstellung der CD34<sup>+</sup> Stammzellen und der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> glatten Gefäßmuskulatur.

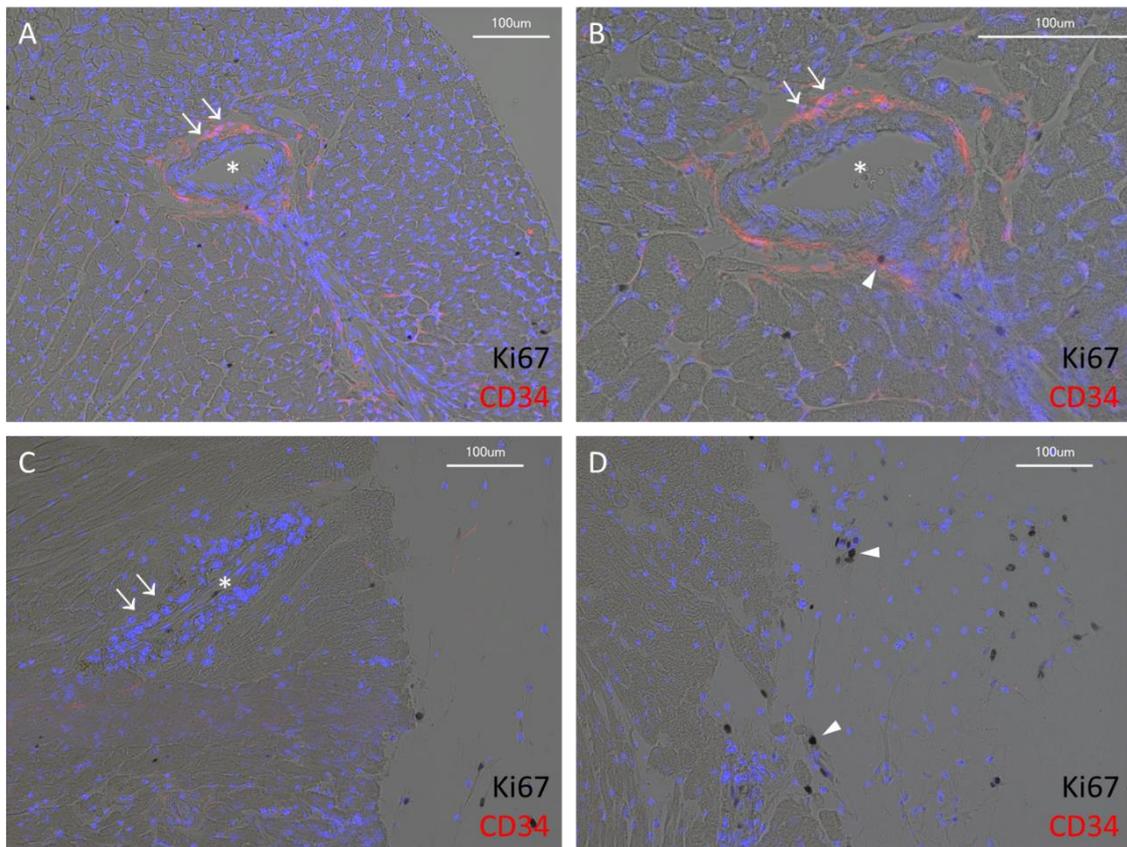


**Abbildung 12: Doppelfärbung CD34/ $\alpha$ -SMA – Kardiales Sprouting im CAA induziert eine Aktivierung und Mobilisierung koronarer, adventitieller CD34<sup>+</sup> Stammzellen.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A) bzw. unter Normoxie mit Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A (B) oder ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors kultiviert (C-D). Die immunhistochemische und immunfluoreszenztechnische Darstellung von CD34 bzw.  $\alpha$ -SMA erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Im frisch isolierten Gewebe konnte die Lokalisation der CD34<sup>+</sup> Stammzellen in der Adventitia (weiße Pfeile in (A)) bestätigt werden, während nach Kultivierung eine deutlich verringerte Anzahl an CD34<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone (weiße Pfeile in (B) und (C)) vorlag. Dieses Ergebnis konnte sowohl für größere Koronarabschnitte (B) als auch für Gefäße von kleinerem Durchmesser (C) reproduziert werden. Weiterhin zeigten sich  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Zellen im Bereich des Sproutings (weiße Pfeilspitzen in (D)). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m.

Im frisch isolierten Gewebe konnte die Lokalisation der CD34<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia (Abbildung 12A, weiße Pfeile) bestätigt werden, während nach Kultivierung unter Normoxie mit Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A sowie ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors wiederum eine Auswanderung der Stammzellen aus ihrer

Nische (Abbildung 12B bzw. 12C, weiße Pfeile) festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis konnte sowohl für größere Koronarabschnitte (Abbildung 12B), als auch für Gefäße von kleinerem Durchmesser (Abbildung 12C) reproduziert werden. Zudem zeigten sich nicht nur in der immunhistochemischen Einzelfärbung (Daten nicht gezeigt), sondern auch in der Darstellung mittels Immunfluoreszenz  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Zellen im Bereich des Sproutings (Abbildung 12D, weiße Pfeilspitzen), was für eine Differenzierung von Stammzellen in glatte Muskelzellen spricht.



**Abbildung 13: Doppelfärbung Ki67/CD34 – Kardiales Sprouting im CAA führt zur Aktivierung und Mobilisierung, jedoch nicht unmittelbar zur Mitose von CD34<sup>+</sup> Stammzellen.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A-B) bzw. unter Normoxie und Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert (C-D). Die immunhistochemische und immunfluoreszenztechnische Darstellung von Ki67 bzw. CD34 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Im Gegensatz zum kultivierten Gewebe (weiße Pfeile in (C)) waren in den frisch isolierten Schnitten die CD34<sup>+</sup> Stammzellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia (weiße Pfeile in (A) und (B)) zu erkennen. Diese stellten sich vereinzelt auch für den Marker Ki67 positiv dar (weiße Pfeilspitze in (B)). Weiterhin zeigte sich nach Kultivierung im CAA vor allem im randständigen Gewebe und im Bereich des Sproutings eine größere Anzahl von Ki67<sup>+</sup> Zellen (weiße Pfeilspitzen in (D)), wobei jedoch keine Zunahme von doppelt positiven Zellen zu verzeichnen war. \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100 µm.

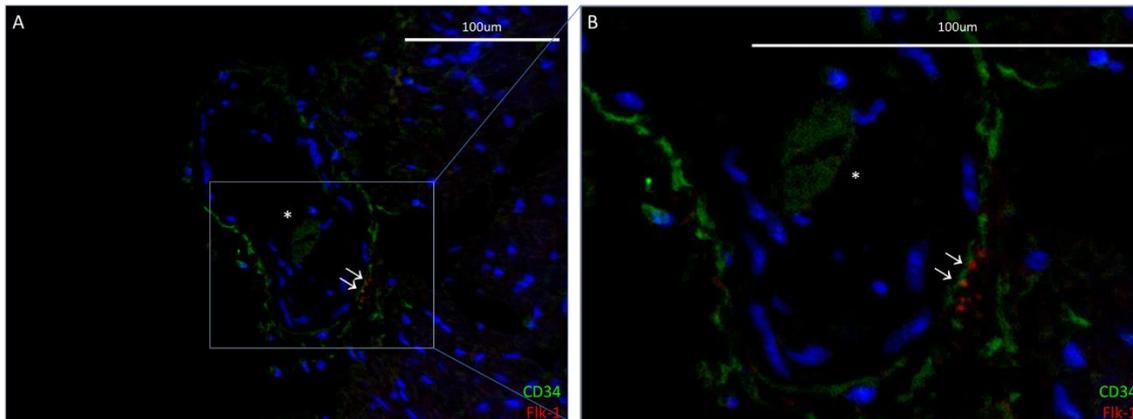
Um die zeitgleiche Detektion von sowohl CD34<sup>+</sup> Stammzellen als auch Ki67<sup>+</sup> und sich damit in der Mitose befindlichen Zellen zu ermöglichen, und um damit die Frage nach doppelt positiven Zellen zu klären, erfolgte wiederum eine immunhistochemische Färbung unter Verwendung von Diaminobenzidin und der Immunfluoreszenzmethode. Wie bereits zuvor beschrieben, war im frisch isolierten Gewebe erneut eine Ansammlung von CD34<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia (Abbildung 13A und 13B, weiße Pfeile) zu erkennen, von denen sich vereinzelte Zellen doppelt positiv darstellten (Abbildung 13B, weiße Pfeilspitze). Nach Kultivierung unter Normoxie und Zusatz von PDGF-BB ließen sich keine CD34<sup>+</sup> Zellen mehr in der vaskulogenen Zone eruieren (Abbildung 13C, weiße Pfeile). Weiterhin zeigte sich nach Kultivierung vor allem im randständigen Gewebe und im Bereich des Sproutings eine größere Anzahl von Ki67<sup>+</sup> Zellen (Abbildung 13D, weiße Pfeilspitzen), wobei jedoch keine Zunahme von doppelt positiven und sich damit in der Zellteilung befindlichen CD34<sup>+</sup> Stammzellen zu verzeichnen war.

Zusammenfassend betrachtet konnte durch die Kultivierung des Gewebes unter Normoxie, unabhängig von der Zugabe der Wachstumsfaktoren PDGF-BB oder VEGF-A, eine Aktivierung und Mobilisierung koronarer Gefäßwand-residenter CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus der vaskulogenen Zone der Adventitia erreicht werden. Die Tatsache, dass nach Kultivierung im CAA kaum CD34<sup>+</sup> Zellen, weder innerhalb des kardialen Gewebes noch im Kollagengel, vorlagen, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Expression des Oberflächenmarkers CD34 nach Mobilisierung der Stamm- und Progenitorzellen aus ihrer Nische unter die Nachweisgrenze reguliert wird. Die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen führte im Gegensatz zur Kultivierung unter Normoxie zu einer deutlich verminderten Auswanderung der Zellen (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.2.2 In frisch isoliertem Gewebe besteht eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1**

VEGF-A und sein Rezeptor VEGFR-2 (= Flk-1 bei der Maus und KDR beim Menschen) nehmen, wie bereits beschrieben, nicht nur eine zentrale Rolle in der Regulation der Angiogenese ein, sondern weiterhin führt der Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib, der unter anderem auf VEGFR-1, -2 und -3 wirkt, zu einer vollständigen Blockade des Sproutings.

Um daher die Lokalisation von Flk-1 darzustellen und eine mögliche Ko-Lokalisation mit CD34 aufzuzeigen, erfolgte an frisch isoliertem, kardialem Gewebe der Maus eine immunfluoreszenztechnische Doppelfärbung der beiden Antigene. Dabei wies ein Teil der CD34<sup>+</sup> Stammzellen der Adventitia auch das Flk-1-Antigen auf der Zelloberfläche auf (Abbildung 14A und 14B, weiße Pfeile), was für eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1 spricht.



**Abbildung 14: Doppelfärbung CD34/Flk-1 – In frisch isoliertem Gewebe besteht eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1.**

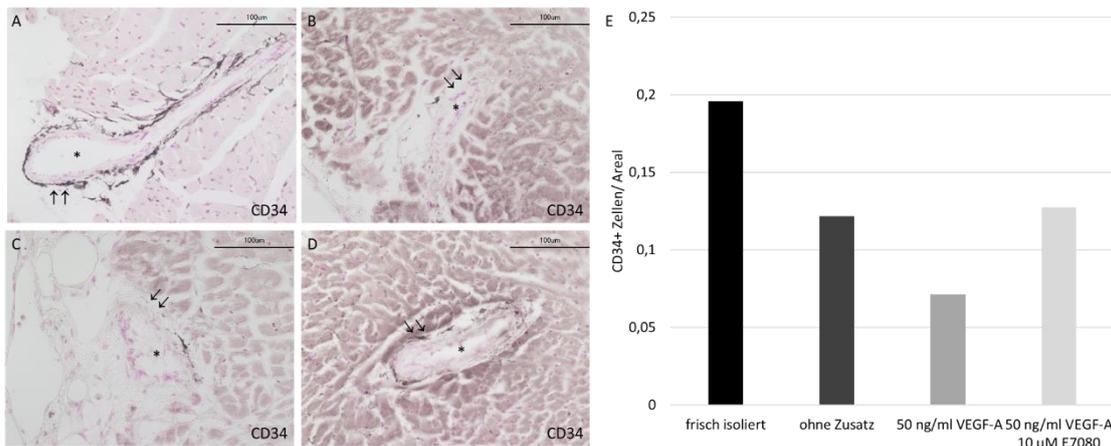
Anhand frisch isolierter Gewebe erfolgte die immunfluoreszenztechnische Darstellung von CD34 und Flk-1 mittels spezifischer Antikörper (A-B). Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Dabei zeigte sich bei einigen Zellen der Adventitia der Koronargefäße eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1 (weiße Pfeile in (A) und (B)). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100 µm.

### **3.2.2.3 Lenvatinib reduziert die Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen**

Aufgrund der hemmenden Wirkung von Lenvatinib auf das kardiale Sprouting und der bestehenden Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1 (= VEGFR-2), sollte im Folgenden ein möglicher Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib auf die CD34<sup>+</sup> Stammzellen untersucht werden. Dies gelang mittels immunhistochemischer Einzelfärbungen an frisch isoliertem sowie im CAA kultivierten Herzgewebe der Maus.

Im frisch isolierten kardialen Gewebe der Maus waren erneut CD34<sup>+</sup> Zellen in der vasculogenen Zone der Adventitia von Koronargefäßen zu beobachten (Abbildung 15A, schwarze Pfeile), während es nach Kultivierung im CAA ohne Zusatz von VEGF-A bzw. mit Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A zu einer deutlichen Abnahme der CD34<sup>+</sup> Zellen in dieser Zone kam (Abbildungen 15B und 15C, schwarze Pfeile). Die zeitgleiche

Zugabe von 50 ng/ml VEGF-A und 10  $\mu$ M Lenvatinib resultierte, im Vergleich zum reinen Zusatz von VEGF-A, in einer reduzierten Aktivierung und Mobilisierung der CD34<sup>+</sup> Stammzellen, was sich durch den Nachweis einer größeren Anzahl von CD34<sup>+</sup> Zellen in der koronaren Adventitia erkennen ließ (Abbildung 15D, schwarze Pfeile).



**Abbildung 15: Einzelfärbung CD34 – Lenvatinib reduziert die Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A), ohne Zusatz eines weiteren Wachstumsfaktors (B), mit 50 ng/ml VEGF-A (C) bzw. mit 50 ng/ml VEGF-A und 10  $\mu$ M Lenvatinib (D) unter Normoxie und mit genereller Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. Die immunhistochemische Darstellung von CD34 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Im frisch isolierten Gewebe war eine Ansammlung von CD34<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia (schwarze Pfeile in (A)) zu erkennen, die nach Kultivierung unter Normoxie deutlich abnahm (schwarze Pfeile in (B) und (C)). Der Zusatz des Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib resultierte im Vergleich zu Versuchsansätzen, die nur VEGF-A enthielten, in einer reduzierten Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen (schwarze Pfeile in (D)). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100  $\mu$ m. (E) Nach immunhistochemischer Färbung erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl mittels ImageJ und die Normierung hinsichtlich der Größe des Herzsegments. n=1.

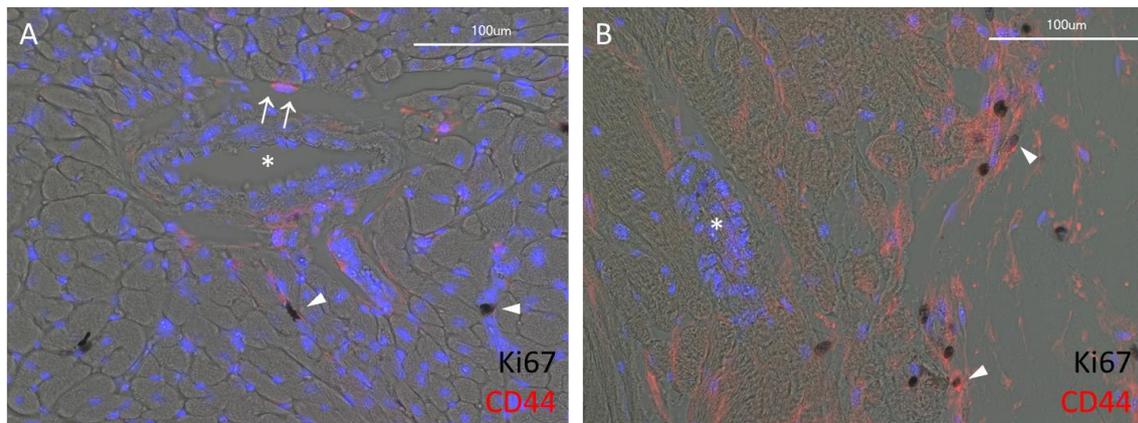
### 3.2.3 Gefäßwand-residente CD44<sup>+</sup> Stammzellen im CAA

Eine weitere Gefäßwand-residente multipotente Stammzellpopulation wird von den CD44<sup>+</sup> Zellen dargestellt, die neben einer möglichen Differenzierung zu Adipo-, Chondro- oder Osteozyten, auch in der Lage sind, sich zu Perizyten oder glatten Muskelzellen zu entwickeln (Ergün et al., 2011; Klein et al., 2011; Wörsdörfer et al., 2017). Analog zu den CD34<sup>+</sup> Stammzellen sollten im Folgenden sowohl Lokalisation und Charakteristika der CD44<sup>+</sup> Stammzellen unter ruhenden Bedingungen als auch deren Bedeutung bei der Angiogenese im CAA untersucht werden. Dazu kamen erneut

immunhistochemische und immunfluoreszenztechnische Darstellungsmethoden spezifischer Antigene zum Einsatz.

### 3.2.3.1 Kardiales Sprouting erhöht den Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Zellen im CAA

Mittels Kombination der DAB-Immunhistochemie und der Immunfluoreszenzmethode gelang die zeitgleiche Darstellung von sowohl sich in der Mitose befindlichen und damit Ki67<sup>+</sup> Zellen als auch von CD44<sup>+</sup> Stammzellen.



**Abbildung 16: Doppelfärbung Ki67/CD44 – Kardiales Sprouting im CAA erhöht den Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Zellen.**

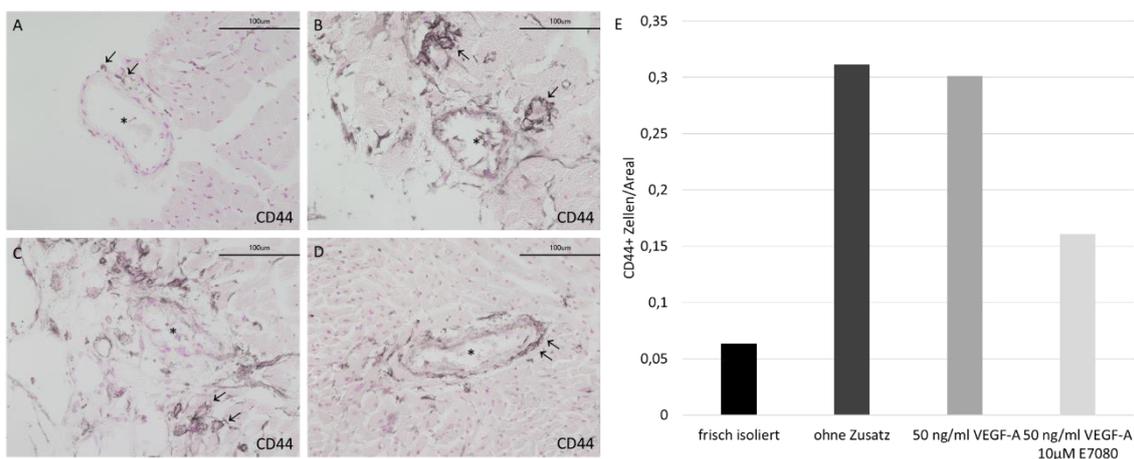
Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A) bzw. unter Normoxie und Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert (B). Die immunhistochemische und immunfluoreszenztechnische Darstellung von Ki67 bzw. CD34 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Im frisch isolierten Gewebe lagen vereinzelt mitotisch aktive Zellen vor (weiße Pfeilspitzen in (A)), wohingegen sich die CD44<sup>+</sup> Stammzellen vor allem in der vaskulogenen Zone der Adventitia (weiße Pfeile in (A)) konzentrierten. Nach Kultivierung präsentierte sich ein deutlich erhöhter Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Zellen (weiße Pfeilspitzen in (B)). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100 µm.

Dabei waren im frisch isolierten Gewebe vereinzelt mitotisch aktive Zellen sichtbar (Abbildung 16A, weiße Pfeilspitzen). Von den CD44<sup>+</sup> Zellen, die hauptsächlich in der Adventitia der Koronargefäße nachzuweisen waren (Abbildung 16A, weiße Pfeile), zeigte sich im frisch isolierten Gewebe jedoch nur ein geringer Anteil zugleich für den Proliferationsmarker Ki67 positiv. Nach Kultivierung von Herzgewebe unter Normoxie im Rahmen des CAAs fand sich vor allem im Randbereich des kardialen Gewebes eine deutlich erhöhte Anzahl von Ki67<sup>+</sup> Zellen, die sich fast ohne Ausnahme zugleich positiv für den Marker CD44<sup>+</sup> präsentierten (Abbildung 16B, weiße Pfeilspitzen). Diese Befunde deuten auf eine stark erhöhte Proliferationsaktivität der CD44<sup>+</sup> Zellen im Rahmen der Kultivierung im CAA hin und bieten zugleich eine Erklärung dafür, dass nach Kul-

tivierung eine deutlich stärkere Immunfärbung des Markers CD44 sowohl im Herzgewebe selbst als auch unter den Zellen, die ins Kollagengel ausgesprossen waren, festgestellt werden konnte. Dies spricht für eine begünstigende Wirkung des kardialen Sproutings auf den Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Zellen. Dahingegen waren mitotisch aktive Kardiomyozyten weder vor noch nach Kultivierung zu erkennen (Abbildung 16).

### 3.2.3.2 Lenvatinib verringert die Anzahl und die Migration von CD44<sup>+</sup> Zellen im CAA

Um neben der Wirkung von Lenvatinib auf das kardiale Sprouting im CAA und auf die CD34<sup>+</sup> Stammzellen im Folgenden einen möglichen Einfluss des Tyrosinkinaseinhibitors auf die Population der CD44<sup>+</sup> Zellen zu identifizieren, kamen erneut immunhistochemische Färbemethoden zum Einsatz.



**Abbildung 17: Einzelfärbung CD44 – Lenvatinib verringert die Anzahl und die Migration von CD44<sup>+</sup> Zellen im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A), ohne Zusatz eines weiteren Wachstumsfaktors (B), mit 50 ng/ml VEGF-A (C) bzw. mit 50 ng/ml VEGF-A und 10 µM Lenvatinib (D) unter Normoxie und mit genereller Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. Die immunhistochemische Darstellung von CD44 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Im frisch isolierten Gewebe lagen vereinzelt CD44<sup>+</sup> Stammzellen vor (schwarze Pfeile in (A)), während die Kultivierung unter Normoxie in einer deutlich erhöhten Anzahl der CD44<sup>+</sup> Zellen resultierte (schwarze Pfeile in (B) und (C)). Der Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib verringerte dahingegen die Anzahl und die Migration von CD44<sup>+</sup> Zellen, was sich in einer Akkumulation dieser in der vaskulogenen Zone verdeutlichte (schwarze Pfeile in (D)). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterie. Der Maßstab entspricht 100 µm. (E) Nach immunhistochemischer Färbung erfolgte die Quantifizierung der Zellzahl mittels ImageJ und die Normierung hinsichtlich der Größe des Herzsegments. n=1.

Wie bereits beschrieben, zeigten sich im frisch isolierten Gewebe vereinzelt CD44<sup>+</sup> Stammzellen in der vaskulogenen Zone der Adventita (Abbildung 17A, schwarze Pfei-

le). Kultivierung unter Normoxie führte, unabhängig von der Zugabe des Wachstumsfaktors VEGF-A, zu einer erheblichen Zunahme der Zellzahl sowohl im Randbereich des kardialen Gewebes als auch im Bereich des Sproutings in das Kollagengel (Abbildung 17B und 17C, schwarze Pfeile). Dahingegen kam es durch die Zugabe von Lenvatinib zu einer deutlich verminderten Anzahl und Migration der CD44<sup>+</sup> Stammzellen, was sich in einer Akkumulation der CD44<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone der Adventitia verdeutlichte (Abbildung 17D, schwarze Pfeile).

### **3.2.4 Charakterisierung von F4/80<sup>+</sup> Zellen**

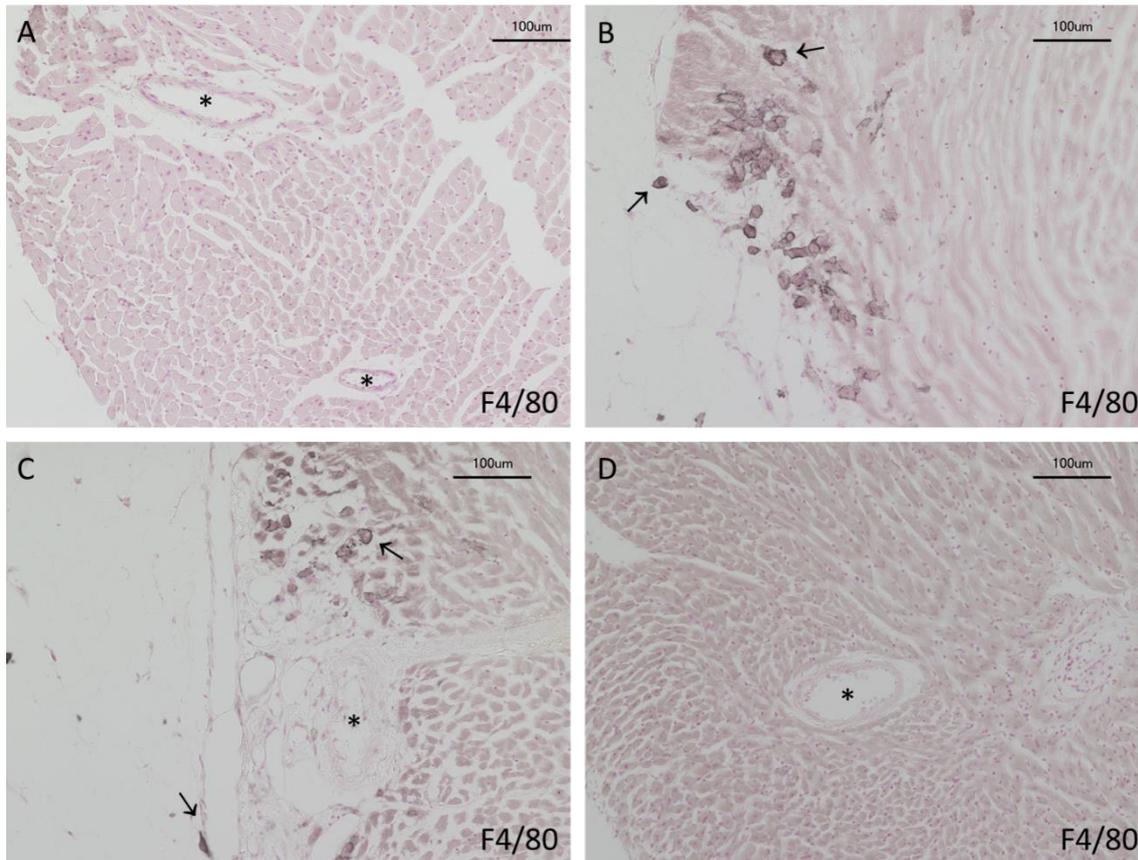
Einen zugrundeliegenden Aspekt der Gefäßneubildung im postnatalen Organismus stellt die Interaktion zwischen Angiogenese und Inflammation dar. Die kaskadenartige Freisetzung verschiedener proangiogener Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie VEGF-A oder Il-1, durch F4/80<sup>+</sup> Makrophagen, resultiert unter anderem in einer Endothelproliferation und -migration (Kim et al., 2013; Szade et al., 2015). Dadurch nehmen die Immunzellen eine zentrale Rolle bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie Wundheilung oder Tumorwachstum, ein. Zur Untersuchung und dahingehenden Identifizierung der Makrophagen erfolgte die Darstellung des F4/80-Antigens mittels immunhistochemischen Färbungen sowohl an frisch isoliertem als auch an kultiviertem Herzgewebe der Maus.

#### **3.2.4.1 Lenvatinib bewirkt eine Blockade von F4/80<sup>+</sup> Zellen im CAA**

Um das Verhalten der Makrophagen im CAA nicht nur bei Zugabe von PDGF-BB zu beobachten, sondern um weiterhin Hinweise auf die Beeinflussung der Zellen durch Lenvatinib zu erhalten, wurde unter anderem mit dem Tyrosinkinaseinhibitor behandeltes murines Herzgewebe vor und nach Kultivierung im CAA zur immunhistochemischen Darstellung verwendet.

Dabei lagen im frisch isolierten Gewebe nur vereinzelt F4/80<sup>+</sup> Zellen vor, während sich nach Kultivierung unter Normoxie, insbesondere im Randbereich und im Bereich des Sproutings innerhalb des Kollagengels, eine deutlich erhöhte Anzahl der F4/80<sup>+</sup> Zellen zeigte (Abbildung 18B, schwarze Pfeile). Dieses Bild präsentierte sich unabhängig von der externen Zugabe des Wachstumsfaktors VEGF-A (Abbildung 18C, schwarze Pfei-

le). Der Einsatz des Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib resultierte dahingegen in einer fast vollständigen Blockade von F4/80<sup>+</sup> Zellen im CAA (Abbildung 18D).



**Abbildung 18: Einzelfärbung F4/80 – Lenvatinib bewirkt eine Blockade von F4/80<sup>+</sup> Zellen im CAA.**

Kardiales Gewebe wurde frisch isoliert (A), ohne Zusatz eines weiteren Wachstumsfaktors (B), mit 50 ng/ml VEGF-A (C) bzw. mit 50 ng/ml VEGF-A und 10 µM Lenvatinib (D) unter Normoxie und mit genereller Zugabe von 10 ng/ml PDGF-BB kultiviert. Die immunhistochemische Darstellung von F4/80 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Im frisch isolierten Gewebe zeigten sich kaum F4/80<sup>+</sup> Zellen (A), während es nach Kultivierung im CAA zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl von F4/80<sup>+</sup> Zellen kam (schwarze Pfeile in (B) und (C)). Der Einsatz von Lenvatinib resultierte dahingegen in einer fast vollständigen Blockade der F4/80<sup>+</sup>Zellen (D). \* zeigt das Lumen der angeschnittenen Koronararterien. Der Maßstab entspricht 100 µm.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Angiogenese-Kapazität im CAA

Die Angiogenese wird von zahlreichen Kriterien, wie beispielsweise dem Sauerstoffgehalt der Umgebung oder dem Vorhandensein von Wachstumsfaktoren wie VEGF-A, beeinflusst (Carmeliet und Jain, 2011; Szade et al., 2015). Dabei führte im CAA die Kultivierung unter Normoxie verglichen mit hypoxischen Zuständen im Mittel zu größeren Wachstumsraten (Abbildungen 2 und 3). Zusätzlich variierte die Angiogenese-Kapazität in dem *ex vivo* Ansatz abhängig von dem Herzareal, aus dem das untersuchte Gewebe stammte. So wurde unter Normoxie maximales Sprouting durch die Kultivierung basisnaher Herzsegmente, insbesondere bei zeitgleicher Zugabe von PDGF-BB, erreicht (Abbildung 3). Dahingegen zeigte Gewebe aus dem Apex des Herzens konstant ein eher gering ausgeprägtes Wachstum (Abbildungen 2 und 3).

Während im *ex vivo* Sprouting Assay die Kultivierung unter Normoxie ein besseres Ergebnis erzielte, ist in der Literatur die Hypoxie als ein die Angiogenese fördernder Zustand angesehen. Die Stabilisierung des HIFs bewirkt dabei die vermehrte Bildung proangiogener Faktoren, wie VEGF-A oder PDGF-BB (Kaidi et al., 2006; Szade et al., 2015). Auch *in vivo* Versuche an transgenen Mäusen, in denen die Expression des HIF unabhängig vom Sauerstoffgehalt der Umgebung hochreguliert wurde, resultierten in einer gesteigerten Angiogenese (Walton et al., 2013). Eine Erklärung für die scheinbare Diskrepanz zwischen diesen Ergebnissen könnte im Vergleich von *ex vivo* mit *in vitro* bzw. *in vivo* Daten liegen. So könnte die Wirkung des HIFs durch die Kultivierung im CAA herabgesetzt werden. Darüber hinaus ist ein Einfluss des methodischen Aufbaus prinzipiell nicht auszuschließen. Beispielsweise könnte ein zu groß gewählter Durchmesser des kultivierten Gewebes bereits unter Normoxie zu einer schlechteren Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff geführt haben. Dies könnte über die Hochregulierung des HIFs das gesteigerte Sprouting teilweise erklären. Zusätzlich könnten dreidimensionale Aufnahmen des Gewebes und des Sproutings helfen, die Abweichungen, die durch die Übertragung einer Struktur auf ein zweidimensionales Bild entstehen, zu umgehen. Auf diese Weise könnte die Angiogenese-Kapazität im CAA noch genauer erfasst werden.

Neben der Sauerstoffkonzentration der Umgebung wirkte sich jedoch auch der Ursprung des kardialen Gewebes aus Atrien, basis- oder apexnahen Ventrikelanteilen auf die Quantität des Sproutings aus. Die Tatsache, dass beim Wachstum unter Normoxie die kardialen Gewebestücke aus den Atrien und basisnahen Ventrikelabschnitten eine größere Angiogenese- bzw. Sprouting-Kapazität aufwiesen, könnte auf die Rolle der koronaren Gefäßwand-residenten Stammzellen beim Sprouting im CAA hinweisen. Durch die an der Herzbasis vorliegenden stammnahen und damit mit einem größeren Einzeldurchmesser versehenen Koronargefäßabschnitte ist eine größere Koronargefäß-adventitia und damit auch eine größere adventitielle Nische für eine lokal höhere Anzahl an Stamm- und Progenitorzellen anzunehmen. Diese sind in der Lage, sich zu ECs, SMCs und einer Vielzahl weiterer Zellen zu differenzieren und sich damit an der Neubildung von Gefäßen zu beteiligen (Passman et al., 2008; Ergün et al., 2011; Klein et al., 2011; Fang et al., 2012; Wörsdörfer et al., 2017). Diese Hypothese deckt sich zudem mit der Beobachtung, dass die Angiogenese-Kapazität des Gewebes aus dem Apex des Herzens unabhängig von der Sauerstoffkonzentration oder der Zugabe von Wachstumsfaktoren nur gering ausgeprägt war (Abbildungen 2 und 3). Die im Einzeldurchmesser kleineren Koronargefäße könnten dabei bezogen auf das verwendete kardiale Gewebestück eine geringere Menge an Gefäßwand-residenten Vorläuferzellen bedingen, was sich wiederum auf das Wachstum im CAA auswirken würde. Da der Einfluss unterschiedlicher Herzareale auf die Angiogenese-Kapazität bisher jedoch nicht untersucht wurde, sind die vorliegenden Daten die ersten, die einen Effekt auf das Sprouting des Herzgewebes im *ex vivo* Ansatz nahelegen. Somit sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Ergebnisse zu verifizieren und ihre Bedeutung bei kardialen Regenerations- und Heilungsprozessen, einschließlich der Fibrose und Narbenbildung nach einem Myokardinfarkt, umfassend klären und interpretieren zu können.

#### **4.2 Auswirkungen der Kultivierung im CAA auf histologischer Ebene**

Durch die sich an die Kultivierung anschließenden histologischen Untersuchungen konnten sowohl Veränderungen in der Gewebemorphologie als auch Modifikationen in dem Vorkommen und der Verteilung der einzelnen Zellarten festgestellt werden. Während das kardiale Gewebe im frisch isolierten Zustand eine kompakte Struktur aufwies, resultierte die Kultivierung im CAA in einer deutlichen Auflockerung des randständigen

Gewebes sowie der Gefäßwand (Abbildung 10). Eine Erklärung für diese morphologischen Veränderungen könnte im Prozess der Angiogenese zu finden sein. Unter dem Einfluss einiger proangiogener Faktoren kommt es dabei zum Abbau der Basallamina sowie zur Loslösung der Perizyten von der Kapillarwand und infolgedessen zur Auflockerung des endothelialen Zellverbandes, zum Beispiel durch Verlust der interendothelialen Zell-Zell-Kontakte (Patel-Hett and DAmore, 2011; Neve et al., 2014). Um die für die Neubildung von Gefäßen wichtige Migration der ECs zu ermöglichen, werden zudem Matrix-Metalloproteinasen und weitere proteolytische Enzyme freigesetzt, die den Abbau der extrazellulären Matrix zur Folge haben (Risau, 1997; Sanberg et al., 2009). Diese dient jedoch nicht nur der mechanischen Verankerung der Endothelzellen in ihrer Umgebung, sondern ist auch an der Regulation der Proliferation, der Migration, der Differenzierung und des Überlebens dieser Zellen beteiligt (Hynes, 2009). Es ist also durchaus vorstellbar, dass insbesondere der Verlust der Extrazellulärmatrix und die im Rahmen der Angiogenese ablaufenden Prozesse *ex vivo* zum Zelluntergang und zur mikroskopisch sichtbaren Auflockerung des Gewebes führen.

Auf histologischer Ebene konnte darüber hinaus durch die Darstellung des Oberflächenantigens CD34 eine Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen während der Kultivierung im CAA beobachtet werden. Im frisch isolierten Gewebe fanden sich diese Zellen überwiegend in der Adventitia der Koronargefäße, die sich von außen der  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> *Tunica media* anlagert (Abbildungen 11C und 12A). Dieses Ergebnis deckt sich mit der in der Literatur beschriebenen Lokalisation der Stamm- und Progenitorzellen in der an der Grenze zur Media vorliegenden vaskulogenen Zone (Zengin et al., 2006; Ergün et al., 2011). Untersuchungen an humaner Aorta zeigten zudem einen reduzierten Anteil von CD34<sup>+</sup> Zellen nach Kultivierung (Pasquinelli et al., 2007). Damit in Einklang steht die in dieser Arbeit beschriebene Beobachtung, dass die Kultivierung im CAA unter Normoxie in einer verminderten Anzahl von CD34<sup>+</sup> Zellen in der Adventitia resultiert (Abbildungen 11D, 12B und 12C). Die Ursache dafür könnte in der Aktivierung und Mobilisierung der Vorläuferzellen aus ihrer Nische sowie in der Differenzierung der Stammzellen zu finden sein. Im Laufe der Entwicklung zu anderen Zellen könnte die Expression des Stammzellmarkers herunterreguliert werden, was den geringeren Anteil an CD34<sup>+</sup> Zellen erklären würde. Im Gegensatz dazu fand sich unter hypoxischen Bedingungen eine deutlich verminderte Auswanderung der CD34<sup>+</sup> Vorläufer-

zellen aus der vaskulogenen Zone der Adventitia (Daten nicht gezeigt). Diese Erkenntnis korreliert mit der im Vergleich zum Wachstum unter Normoxie geringeren Angiogenese-Kapazität, was wiederum die zuvor diskutierte Beeinflussung der Ergebnisse durch zweidimensionale Bildaufnahmen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Weiterhin war durch die Verknüpfung von Immunhistochemie mittels DAB und Immunfluoreszenz die zeitgleiche Darstellung der Oberflächenantigene CD34 und Ki67 möglich, wobei jedoch keine Zunahme der doppelt positiven und sich damit in der Zellteilung befindlichen CD34<sup>+</sup> Zellen nach Kultivierung im CAA zu beobachten war (Abbildungen 13C und 13D). Auch dieser Befund könnte dadurch bedingt sein, dass aktivierte CD34<sup>+</sup> Zellen, die sich ursprünglich in der vaskulogenen Zone der Adventitia aufhielten, proliferieren, zugleich die Expression des Antigens CD34 jedoch herunterregulieren und somit unter den Ki67<sup>+</sup> Zellen nicht mehr nachweisbar sind. Zusammengefasst betrachtet legt dies die Schlussfolgerung nahe, dass die Kultivierung des Herzgewebes im CAA mit einer deutlichen Verringerung der CD34<sup>+</sup> Zellen in der koronaren Adventitia einhergeht, die durch die Aktivierung und Mobilisierung dieser Zellen aus der vaskulären Stammzellnische bedingt ist. Durch die verminderte Expression des Oberflächenmarkers CD34 im Laufe der Entwicklung konnten die Proliferation und die Differenzierungswege dieser Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht genau nachvollzogen werden. Das Schicksal der CD34<sup>+</sup> adventitiellen Stammzellen in myokardialen Prozessen nachzuvollziehen ist erschwert und vermutlich nur unter Einsatz entsprechender Reporter-Mausmodelle möglich.

Im Gegensatz zu den CD34<sup>+</sup> Zellen erhöhte sich nach Kultivierung im CAA der Anteil der Ki67<sup>+</sup> Zellen. Insbesondere im randständigen Gewebe und im Bereich des Sproutings in das Kollagengel waren vermehrt mitotisch aktive Zellen sichtbar (Abbildung 13D). Das Eintreten der aus den Stammzellen durch Differenzierung neu entstandenen Zellen in die Mitose stellt eine denkbare Erklärung für die Zunahme dar. So könnte es sich bei den Ki67<sup>+</sup> Zellen, die im Bereich des Sproutings auftraten, unter anderem um ECs handeln, insbesondere um die sich an der Basis der Aussprossungen befindlichen stalk cells. Diese Hypothese deckt sich mit Untersuchungen am Aortic Ring Assay, bei dem es ausgehend von der Aorta zum Auswachsen von Gefäßen kommt. Dabei beschränkte sich die endotheliale Proliferation auf die stalk cells, während mitotisch aktive tip cells an der Spitze der Aussprossungen fehlten (Gerhardt et al., 2003). Neben Ki67<sup>+</sup>

Zellen waren im Bereich des Sproutings zudem  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> Zellen abzugrenzen (Abbildung 12D). Betrachtet man die Tatsache, dass sich eine Reihe von Gefäßwand-residenten Stamm- und Progenitorzellen zu SMCs entwickeln können, spricht dies für eine Differenzierung von Vorläuferzellen in SMCs im Rahmen der Kultivierung im CAA (Ergün et al., 2011; Wörsdörfer et al., 2017).

Neben den CD34<sup>+</sup> Zellen existiert in der vaskulogenen Zone der Adventitia noch eine Vielzahl weiterer Stamm- und Progenitorzellen (Ergün et al., 2011; Psaltis und Simari, 2015; Wörsdörfer et al., 2017). Im Mittelpunkt der vorliegenden histologischen Untersuchungen standen dabei die CD44<sup>+</sup> Stammzellen, die sich, analog zu der in der Literatur beschriebenen Lokalisation, in der vaskulogenen Zone des frisch isolierten Gewebes präsentierten (Abbildung 16A). Versuche am Ringassay zeigten zudem eine Migration von CD44<sup>+</sup> Zellen aus der Adventitia humaner *Arteriae thoracicae internae* (Klein et al., 2011). Dieses Ergebnis korreliert mit der in dieser Arbeit dargestellten Beobachtung, dass sich nach Kultivierung im CAA der Anteil von CD44<sup>+</sup> Zellen vor allem im Randbereich des kardialen Gewebes deutlich erhöhte (Abbildung 16B). Weiterhin nahm auch die Zahl der Ki67<sup>+</sup> Zellen, die im frisch isolierten Gewebe nur vereinzelt vorlagen, nach Kultivierung im CAA zu (Abbildung 16). In der gemeinsamen Darstellung der Oberflächenmarker CD44 und Ki67 konnten zudem doppelt positive und damit mitotisch aktive CD44<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 16B). In dieser Arbeit gelang es somit, die Migration und Proliferation koronarer Gefäßwand-residenter CD44<sup>+</sup> Stammzellen im Rahmen der Kultivierung im CAA zu verdeutlichen. Im Gegensatz dazu wurden weder im frisch isolierten Gewebe noch nach der Kultivierung Ki67<sup>+</sup> Kardiomyozyten nachgewiesen (Abbildung 16). Dies entspricht der in der Literatur beschriebenen sehr begrenzten bzw. kaum vorhandenen Regenerationsfähigkeit der reifen Kardiomyozyten (Efe et al., 2011).

#### **4.3 Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Angiogenese im CAA**

Der Wnt-Signalweg stellt einen bedeutenden Faktor in der Regulation der Stammzellbiologie und der Angiogenese dar. Beispielsweise wiesen *in vitro* Untersuchungen an embryonalen Stammzellen auf einen Einfluss des klassischen Wnt-Signalwegs bei der Differenzierung von Endothelzellen hin (Wang et al., 2006). Darüber hinaus wird angenommen, dass die durch den Wnt-Signalweg vermittelte erhöhte Expression des Pro-

teins Cyclin D1, welches als Regulator im Zellzyklus dient, die Proliferation von Endothelzellen begünstigt (Shtutman et al., 1999; Phng and Gerhardt, 2009; Reis and Liebner, 2013). Analog dazu resultierte die Aktivierung der Wnt-Signalkaskade bei aus der Umbilikalvene isolierten, humanen Endothelzellen nicht nur in einer gesteigerten Proliferationsrate, sondern förderte bei der Kultivierung auf Matrigel zudem die Formierung eines den Kapillarstrukturen ähnlichen Netzwerks (Masckauchán et al., 2005). Dies deckt sich mit der in dieser Arbeit dargestellten Beeinflussung des Sproutings im CAA durch Inhibierung des Wnt-Signalwegs. Dabei hatte die Zugabe des Inhibitors IWR-1 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M eine signifikante Hemmung des Sproutings im CAA zur Folge (Abbildung 5), was den Schluss nahelegt, dass der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Regulation der Angiogenese einnimmt. Der Zusatz des Wnt-Aktivators ChiR 99021 führte jedoch tendenziell ebenso zu einer geringeren Angiogenese-Kapazität im CAA (Abbildung 5). Während ein Einfluss des mit DMSO versehenen Lösungsmittels nicht sicher ausgeschlossen werden kann, ist darüber hinaus vorstellbar, dass eine zu ausgeprägte Wnt-Signalkaskade einen hemmenden Effekt auf die Angiogenese ausübt. Diese Hypothese korreliert mit der in der Literatur beschriebenen Aktivierung des Notch-Signalwegs durch eine anhaltende Einflussnahme der Wnt-Signalkaskade (Corada et al., 2010; Reis et al., 2012). *In vitro* Versuche zeigten im Zuge dessen eine verminderte Expression des für die Migration und Proliferation von ECs bedeutenden Rezeptors VEGFR-2 sowie eine Hochregulation von VEGFR-1, der freies VEGF-A bindet und so die Aktivierung von VEGFR-2 zusätzlich herabsetzt (Carmeliet and Jain, 2011; Reis et al., 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich mutmaßen, dass eine in engen Grenzen gehaltene Regulation des Wnt-Signalwegs einen wichtigen Faktor für das angiogenetische Sprouting des kardialen Gewebes im Rahmen der Kultivierung im CAA darstellt.

#### **4.4 Einfluss der Clodronat-vermittelten Depletion der Makrophagen auf die Angiogenese *ex vivo***

Die im postnatalen Organismus vorkommende Gefäßneubildung geht in der Regel mit einer inflammatorischen Reaktion einher, die wiederum durch die Einwanderung von Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen, gekennzeichnet ist (Szade et al., 2015). Die proangiogene Wirkung der Zellen wird dabei in unterschiedlichen Phasen der An-

giogenese deutlich. Während zunächst die Auflösung der Extrazellulärmatrix, die die Migration von ECs erleichtert, im Vordergrund steht, werden anschließend proangiogene Faktoren wie VEGF-A freigesetzt (Sanberg et al., 2009). Im CAA resultierte die Depletion der Makrophagen, die mittels der Applikation von Clodronat erreicht wurde, in einer veränderten Morphologie des kardialen Sproutings. Dabei präsentierte sich das Wachstumsmuster im Vergleich zu den Kontrollen, die Versuchsansätze ohne Zusatz bzw. mit Zugabe von PBS-Liposomen beinhalteten, weniger flächig und eher punktuell verteilt (Abbildung 6). Dies deckt sich mit in der Literatur beschriebenen Versuchen anhand eines *in vitro* Angiogenese Assays unter Verwendung von Aortenringen, bei dem es zur Formierung eines den Kapillarstrukturen ähnlichen Netzwerks kommt. Dabei bewirkte der Zusatz von Clodronat nicht nur die Blockierung des endothelialen Netzwerks, sondern die Veränderung der Morphologie zugunsten von nur kurzketzig zusammenhängenden ECs (Friis et al., 2013). Hinsichtlich der Quantität des Sproutings ergab sich im CAA im Vergleich zur Behandlung mit PBS-Liposomen kein Unterschied, wobei sich in höheren Dosierungen ein signifikant vermindertes Wachstum zeigte (Abbildung 7). Aufgrund der Rolle der Makrophagen in der Regulation der Angiogenese hätte die mittels Clodronat durchgeführte Depletion dieser Zellen die Angiogenese-Kapazität im CAA beeinflussen können. Hieraus resultierend hätte man eine Verminderung des Sproutings erwarten können. Da dieser Effekt in höheren Dosierungen jedoch sowohl unter Zugabe von Clodronat-Liposomen als auch PBS-Liposomen zu erkennen war und nachgeschaltete histologische Untersuchungen Hinweise auf einen möglichen hemmenden Einfluss der PBS-Liposomen auf die Makropagen gab (Daten nicht gezeigt), ist eine toxische Wirkung nicht sicher auszuschließen. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen und um die Ergebnisse umfassend interpretieren zu können.

#### **4.5 Auswirkungen von Lenvatinib auf die Angiogenese-Kapazität im CAA und auf histologischer Ebene**

Der Wachstumsfaktor VEGF-A nimmt über seine Wirkungen an den Rezeptortyrosinkinasen VEGFR-1 und VEGFR-2 in der Regulation der Angiogenese einen bedeutenden Stellenwert ein (Koch and Claesson-Welsh, 2012). Die Behandlung mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren, die die Wirkung von VEGF an den Zielzellen aufheben, er-

möglichst dabei, dass Rückschlüsse auf die Bedeutung des Wachstumsfaktors gezogen werden können. Analog dazu konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Einsatz des Multi-Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib, der unter anderem die Kinaseaktivität von VEGFR1-3 mindert, zu einer hoch signifikanten Blockade des Sproutings bei der Angiogenese im CAA führt (Abbildung 8). In einem weiteren Versuch wurde der Zugabebeginn von Lenvatinib auf zwei unterschiedliche Zeitpunkte festgelegt, woraufhin ein einheitlicher Behandlungszeitraum folgte. Während sich bei Zugabe ab Tag 3 im Vergleich zu Ansätzen ohne Zusatz ein signifikant vermindertes Sprouting präsentierte, konnte dieses Ergebnis bei Zugabe der Faktoren ab Tag 7 nicht erreicht werden, was für eine vom Zugabezeitpunkt abhängige Beeinflussung der Angiogenese-Kapazität spricht (Abbildung 9). Obwohl eine Vermittlung der Effekte unabhängig von VEGF durch die Hemmung von anderen Rezeptortyrosinkinasen wie beispielsweise FGFR denkbar ist, erscheint diese Hypothese unwahrscheinlich. Dies liegt vor allem in der höheren Affinität von Lenvatinib zu VEGFR-2 und VEGFR-3 begründet (Matsui et al., 2008b). Zudem nimmt VEGF-A und seine Wirkung über den Rezeptor VEGFR-2 eine Schlüsselrolle in der Regulation der Angiogenese ein (Carmeliet and Jain, 2011). Dies legt den Schluss nahe, dass die durch Lenvatinib hervorgerufene Blockade des Sproutings während der Angiogenese *ex vivo* vor allem durch VEGFR-2 und seinen Hauptliganden VEGF-A vermittelt werden.

Auf histologischer Ebene resultierte die Zugabe von Lenvatinib im Vergleich zu Versuchsansätzen, die nur VEGF-A enthielten, in einem höheren Anteil von CD34<sup>+</sup> Zellen, die nach Kultivierung im Gewebe, insbesondere in der vaskulogenen Zone, vorlagen (Abbildung 15). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Einsatz von Lenvatinib die durch die Kultivierung im CAA induzierte Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen aus der vaskulogenen Zone der Adventitia reduziert. Somit könnte die durch VEGF vermittelte Wirkung einen essentiellen Faktor für die Aktivierung und Differenzierung der Vorläuferzellen darstellen. Zudem konnte am frisch isolierten Herzgewebe der Maus mittels immunfluoreszenztechnischer Darstellung der beiden Antigene eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1 aufgezeigt werden (Abbildung 14). Somit könnte der Effekt von VEGF-A über den teils auf CD34<sup>+</sup> Stammzellen exprimierten VEGFR-2 direkt vermittelt und so die Aktivierung, Mobilisierung und Differenzierung der Zellen gefördert werden. Darüber hinaus wirkte sich die Zugabe des Multi-

Tyrosinkinaseinhibitors auch auf die Population der CD44<sup>+</sup> Stammzellen aus. Während die Kultivierung im CAA zu einer Zunahme der CD44<sup>+</sup> Zellen führte und diese sich vor allem im Randbereich des kardialen Gewebes und im Bereich des Sproutings präsentierten, fiel bei Zusatz von Lenvatinib der Anstieg der Zellzahl deutlich geringer aus (Abbildung 17). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität der kardialen bzw. koronaren Gefäßwand-residenten CD44<sup>+</sup> Zellen während der Kultivierung im CAA durch Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie beispielsweise VEGFR-2, beeinflusst wird. Dabei stellen sowohl die direkte Beeinflussung der CD44<sup>+</sup> Zellen als auch die Vermittlung des Effekts über andere Zellgruppen denkbare Ansätze dar. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig. So könnte beispielsweise in einem nächsten Schritt die Darstellung von sowohl CD44<sup>+</sup> als auch Ki67<sup>+</sup> und sich damit in der Zellteilung befindlichen Zellen Aufschluss darüber geben, ob E7080 den Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Stammzellen verringert. Nach Applikation von Lenvatinib war weiterhin eine Akkumulation der CD44<sup>+</sup> Zellen in der vaskulogenen Zone der Koronargefäße zu erkennen (Abbildung 17), was dafür spricht, dass der Tyrosinkinaseinhibitor die Migration der Zellen aus ihrer Nische in der Adventitia hemmt. Aufgrund der geringen Fallzahl sollten jedoch weitere Analysen durchgeführt werden, um eine genaue Aussage über die Wirkung von Lenvatinib auf die koronaren Gefäßwand-residenten CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Stammzellpopulationen treffen zu können.

Die Inhibierung der Rezeptortyrosinkinasen durch E7080 wirkte sich auf histologischer Ebene jedoch nicht nur auf die Gefäßwand-residenten Stammzellen aus, sondern auch auf die im Gewebe vorliegenden Makrophagen. Analog zu den CD44<sup>+</sup> Zellen zeigte sich nach Kultivierung insbesondere in den randständigen Bereichen des Gewebes und im Areal des Sproutings eine deutlich erhöhte Anzahl der F4/80<sup>+</sup> Zellen. Die Zugabe von Lenvatinib zum Medium resultierte dahingegen in einer fast vollständigen Blockade dieser Zellen (Abbildung 18). Basierend auf der hohen Affinität von Lenvatinib zu den Rezeptoren VEGFR-2 und VEGFR-3 lässt sich mutmaßen, dass die Präsenz der F4/80<sup>+</sup> Makrophagen vom Wachstumsfaktor VEGF abhängig ist (Matsui et al., 2008b). Aufgrund der begünstigenden Wirkung von VEGFR-1 auf die Migration der Makrophagen im Rahmen der Angiogenese wäre zudem denkbar, dass die Blockade der Immunzellen durch Inhibierung dieser Rezeptortyrosinkinase ausgelöst wird (Murakami et al., 2008). Diese Hypothese erscheint jedoch aufgrund der geringeren Affinität von Lenvatinib zu

VEGFR-1 unwahrscheinlich (Matsui et al., 2008b). Um weiterhin der Frage nachzugehen, ob Lenvatinib die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Makrophagen hemmt oder auf die Immunzellen direkt einwirkt, könnten weitere immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden. Durch die Darstellung von reifen Makrophagen und deren Vorläuferzellen in Geweben, die ab unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung und damit bei bereits eingesetzter Differenzierung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor behandelt wurden, könnten Rückschlüsse auf die Wirkung von Lenvatinib und damit VEGF gezogen werden.

## 5. Zusammenfassung

Als Angiogenese bezeichnet man die Formierung neuer Gefäße ausgehend von einem bereits bestehenden vaskulären System (Carmeliet, 2004). Diese stellt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen, wie beispielsweise der Wundheilung, einen zentralen Faktor dar (Carmeliet and Jain, 2011). Um die Angiogenese-Kapazität kardialen Gewebes zu untersuchen, wurde der Cardiac Angiogenesis Assay (= CAA) eingesetzt, bei dem die Kultivierung kardialen Gewebes der Maus zur Bildung neuer Gefäße führt. Dabei standen vor allem die Gefäßwand-residenten Stammzellen, die sich in der vaskulogenen Zone der koronaren Adventitia befinden und sich in verschiedenste Zellen differenzieren können sowie ihre Rolle bei der kardialen Angiogenese im wissenschaftlichen Fokus der Arbeit.

Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte die Aktivierung und Mobilisierung der koronaren Gefäßwand-residenten CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Stammzellen im Rahmen der Angiogenese im CAA gezeigt werden. Zudem war es möglich, einen Einfluss des Wnt-Signalwegs auf die kardiale Angiogenese nachzuweisen, indem der Aktivator des Signalwegs CHIR 99021 bzw. der Inhibitor IWR-1 eingesetzt wurden. Dabei führte die Hemmung des Wnt-Signalwegs mittels IWR-1 zu einer signifikant verminderten Sprouting-Kapazität des Gewebes. Weiterhin wurde die Rolle der Makrophagen bei der Angiogenese im CAA durch den Einsatz von Clodronat untersucht. Die dadurch hervorgerufene Depletion der Immunzellen führte zu einer veränderten Morphologie des Sproutings. Um Rückschlüsse auf die Bedeutung von Wachstumsfaktoren wie VEGF-A bei der Neubildung von Gefäßen im CAA zu ziehen, wurde Gewebe unter Zugabe des Multi-Tyrosinkinaseinhibitors Lenvatinib kultiviert. Dies resultierte nicht nur in der Blockade des Sproutings, sondern wirkte sich auch auf histologischer Ebene aus. So konnte in immunhistochemischen Färbungen eine verminderte Aktivierung und Mobilisierung der koronaren Gefäßwand-residenten CD34<sup>+</sup> und CD44<sup>+</sup> Stammzellen sowie eine Blockade der F4/80<sup>+</sup> Zellen durch den Einsatz von Lenvatinib festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es in der vorliegenden Arbeit gelang, die Bedeutung sowie die Aktivierung und Mobilisierung der koronaren Gefäßwand-residenten Stammzellen bei der Angiogenese des Herzwesens mittels CAA präzise zu charakterisieren und beeinflussende Faktoren zu identifizieren.

## 6. Literaturverzeichnis

Alessandri, G., Girelli, M., Taccagni, G., Colombo, A., Nicosia, R., Caruso, A., Baronio, M., Pagano, S., Cova, L., and Parati, E. (2001). Human vasculogenesis ex vivo: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *81*, 875–885.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* *275*, 964–967.

Atlas Writing Group, Timmis, A., Townsend, N., Gale, C., Grobbee, R., Maniadakis, N., Flather, M., Wilkins, E., Wright, L., Vos, R., et al. (2018). European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur. Heart J.* *39*, 508–579.

Augustin, I., Dewi, D.L., Hundshammer, J., Erdmann, G., Kerr, G., and Boutros, M. (2017). Autocrine Wnt regulates the survival and genomic stability of embryonic stem cells. *Sci. Signal.* *10*, eaah6829.

Aurora, A.B., Porrello, E.R., Tan, W., Mahmoud, A.I., Hill, J.A., Bassel-Duby, R., Sadek, H.A., and Olson, E.N. (2014). Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J. Clin. Invest.* *124*, 1382–1392.

Benninghoff, A., Drenckhahn, D., Waschke, J., Asan, E., and Benninghoff-Drenckhahn (2011). *Taschenbuch Anatomie* (München: Elsevier, Urban & Fischer), 329; 353–356.

Blaufarb, I.S., and Sonnenblick, E.H. (1996). The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am. J. Cardiol.* *77*, 8C–16C.

Boudoulas, K.D., and Hatzopoulos, A.K. (2009). Cardiac repair and regeneration: the Rubik’s cube of cell therapy for heart disease. *Dis. Model. Mech.* *2*, 344–358.

Brignier, A.C., and Gewirtz, A.M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S336–S344.

Bryder, D., Rossi, D.J., and Weissman, I.L. (2006). Hematopoietic Stem Cells. *Am. J. Pathol.* *169*, 338–346.

Buiting, A.M.J., and Rooijen, N.V. (1994). Liposome Mediated Depletion of Macrophages: An Approach for Fundamental Studies. *J. Drug Target.* *2*, 357–362.

Campagnolo, P., Cesselli, D., Al Haj Zen, A., Beltrami, A.P., Kränkel, N., Katare, R., Angelini, G., Emanuelli, C., and Madeddu, P. (2010). Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential. *Circulation* *121*, 1735–1745.

Campbell, K.A., Lipinski, M.J., Doran, A.C., Skafien, M.D., Fuster, V., and McNamara, C.A. (2012). Lymphocytes and the adventitial immune response in atherosclerosis. *Circ. Res.* *110*, 889–900.

- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* *6*, 389–395.
- Carmeliet, P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.* *255*, 538–561.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.
- Cattelino, A., Liebner, S., Gallini, R., Zanetti, A., Balconi, G., Corsi, A., Bianco, P., Wolburg, H., Moore, R., Oreda, B., et al. (2003). The conditional inactivation of the  $\beta$ -catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J. Cell Biol.* *162*, 1111–1122.
- Chung, A.S., and Ferrara, N. (2011). Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *27*, 563–584.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *133*, 157–165.
- Corada, M., Nyqvist, D., Orsenigo, F., Caprini, A., Giampietro, C., Taketo, M.M., Iruela-Arispe, M.L., Adams, R.H., and Dejana, E. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev. Cell* *18*, 938–949.
- Corselli, M., Chen, C.-W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J.P., and Péault, B. (2012). The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *21*, 1299–1308.
- Davies, M.J. (2000). The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart Br. Card. Soc.* *83*, 361–366.
- Dejana, E. (2010). The Role of Wnt Signaling in Physiological and Pathological Angiogenesis. *Circ. Res.* *107*, 943–952.
- Dirkx, A.E.M., oude Egbrink, M.G.A., Wagstaff, J., and Griffioen, A.W. (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* *80*, 1183–1196.
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., and Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim. Pol.* *62*, 329–337.
- Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell Biol.* *13*, 215–222.
- Eltzschig, H.K., and Carmeliet, P. (2011). Hypoxia and Inflammation. *N. Engl. J. Med.* *364*, 656–665.

Ergün, S., Tilki, D., and Klein, D. (2011). Vascular Wall as a Reservoir for Different Types of Stem and Progenitor Cells. *Antioxid. Redox Signal.* *15*, 981–995.

Fang, S., Wei, J., Pentimikko, N., Leinonen, H., and Salven, P. (2012). Generation of functional blood vessels from a single c-kit<sup>+</sup> adult vascular endothelial stem cell. *PLoS Biol.* *10*, e1001407.

Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 795–803.

Ferrara, N. (2009). VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur. Cytokine Netw.* 158–163.

Flanigan, M., and Gaskell, S.M. (2004). A review of cardiac anatomy and physiology. *Home Healthc. Nurse* *22*, 45–51.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* *376*, 66–70.

Frangogiannis, N.G. (2012). Regulation of the Inflammatory Response in Cardiac Repair. *Circ. Res.* *110*, 159–173.

Frantz, S., Bauersachs, J., and Ertl, G. (2008). Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc. Res.* *81*, 474–481.

Friis, T., Engel, A.-M., Bendiksen, C.D., Larsen, L.S., and Houen, G. (2013). Influence of levamisole and other angiogenesis inhibitors on angiogenesis and endothelial cell morphology in vitro. *Cancers* *5*, 762–785.

Fu, W.-B., Wang, W.E., and Zeng, C.-Y. (2019). Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors. *Acta Pharmacol. Sin.* *40*, 9–12.

Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A., and Betsholtz, C. (2009). Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 630–638.

Gallatin, W.M., Weissman, I.L., and Butcher, E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* *304*, 30–34.

Gavaghan, M. (1998). Cardiac Anatomy and Physiology: A Review. *AORN J.* *67*, 800–822.

Gekle, M., Wischmeyer, E., Gründer, S., Petersen, M., Schwab, A., Markwardt, F., Klöcker, N., Pape, H.-C., Baumann, R., and Marti, H. (2015). *Taschenlehrbuch Physiologie* (Stuttgart: Georg Thieme Verlag), 181-183; 209-216.

Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2005). How do endothelial cells orientate? In *Mechanisms of Angiogenesis*, M. Clauss, and G. Breier, eds. (Basel: Birkhäuser-Verlag), pp. 3–15.

- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* *161*, 1163–1177.
- Gessert, S., and Kühl, M. (2010). The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ. Res.* *107*, 186–199.
- Hare, J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., et al. (2009). A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *54*, 2277–2286.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3047–3055.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9349–9354.
- Holmes, C., and Stanford, W.L. (2007). Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 1339–1347.
- Hosapatna, M., D'Souza, A.S., Prasanna, L.C., Bhojaraja, V.S., and Sumalatha, S. (2013). Anatomical variations in the left coronary artery and its branches. *Singapore Med. J.* *54*, 49–52.
- Hu, Y., Zhang, Z., Torsney, E., Afzal, A.R., Davison, F., Metzler, B., and Xu, Q. (2004). Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* *113*, 1258–1265.
- Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* *326*, 1216–1219.
- Idzerda, R.L., Carter, W.G., Nottenburg, C., Wayner, E.A., Gallatin, W.M., and St John, T. (1989). Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 4659–4663.
- Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., and Yoder, M.C. (2005). Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* *105*, 2783–2786.
- Kaidi, A., Qualtrough, D., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2006). Direct Transcriptional Up-regulation of Cyclooxygenase-2 by Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Promotes Colorectal Tumor Cell Survival and Enhances HIF-1 Transcriptional Activity during Hypoxia. *Cancer Res.* *66*, 6683–6691.

- Kang, J.-H., Sim, J.-S., Zheng, T., and Yim, M. (2017). F4/80 inhibits osteoclast differentiation via downregulation of nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic 1. *Arch. Pharm. Res.* *40*, 492–499.
- Kim, S.H., Cho, J.H., Lee, Y.H., Lee, J.H., Kim, S.S., Kim, M.Y., Lee, M.G., Kang, W.Y., Lee, K.S., Ahn, Y.K., et al. (2018). Improvement in Left Ventricular Function with Intracoronary Mesenchymal Stem Cell Therapy in a Patient with Anterior Wall ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Drugs Ther.* *32*, 329–338.
- Kim, Y.-W., West, X.Z., and Byzova, T.V. (2013). Inflammation and oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *J. Mol. Med.* *91*, 323–328.
- Kini, S., Bis, K.G., and Weaver, L. (2007). Normal and Variant Coronary Arterial and Venous Anatomy on High-Resolution CT Angiography. *Am. J. Roentgenol.* *188*, 1665–1674.
- Klein, D., Hohn, H.-P., Kleff, V., Tilki, D., and Ergün, S. (2010). Vascular wall-resident stem cells. *Histol. Histopathol.* *25*, 681–689.
- Klein, D., Weisshardt, P., Kleff, V., Jastrow, H., Jakob, H.G., and Ergün, S. (2011). Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. *PloS One* *6*, e20540.
- Knoblich, J.A. (2008). Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell* *132*, 583–597.
- Koch, S., and Claesson-Welsh, L. (2012). Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006502–a006502.
- Lee, R.T., and Walsh, K. (2016). The Future of Cardiovascular Regenerative Medicine. *Circulation* *133*, 2618–2625.
- Leibovich, S.J., Chen, J.-F., Pinhal-Enfield, G., Belem, P.C., Elson, G., Rosania, A., Ramanathan, M., Montesinos, C., Jacobson, M., Schwarzschild, M.A., et al. (2002). Synergistic Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Murine Macrophages by Adenosine A2A Receptor Agonists and Endotoxin. *Am. J. Pathol.* *160*, 2231–2244.
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Levéen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* *277*, 242–245.
- Maruotti, N., Corrado, A., Neve, A., and Cantatore, F.P. (2013). Systemic effects of Wnt signaling. *J. Cell. Physiol.* *228*, 1428–1432.
- Masckauchán, T.N.H., Shawber, C.J., Funahashi, Y., Li, C.-M., and Kitajewski, J. (2005). Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* *8*, 43–51.
- Matsui, J., Yamamoto, Y., Funahashi, Y., Tsuruoka, A., Watanabe, T., Wakabayashi, T., Uenaka, T., and Asada, M. (2008a). E7080, a novel inhibitor that targets multiple

kinases, has potent antitumor activities against stem cell factor producing human small cell lung cancer H146, based on angiogenesis inhibition. *Int. J. Cancer* *122*, 664–671.

Matsui, J., Funahashi, Y., Uenaka, T., Watanabe, T., Tsuruoka, A., and Asada, M. (2008b). Multi-Kinase Inhibitor E7080 Suppresses Lymph Node and Lung Metastases of Human Mammary Breast Tumor MDA-MB-231 via Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Receptor (VEGF-R) 2 and VEGF-R3 Kinase. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5459–5465.

Mekala, S.R., Wörsdörfer, P., Bauer, J., Stoll, O., Wagner, N., Reeh, L., Loew, K., Eckner, G., Kwok, C.K., Wischmeyer, E., et al. (2018). Generation of Cardiomyocytes From Vascular Adventitia-Resident Stem Cells. *Circ. Res.* *123*, 686–699.

Millauer, B. (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* *72*, 835–846.

Moulton, K.S., Heller, E., Konerding, M.A., Flynn, E., Palinski, W., and Folkman, J. (1999). Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* *99*, 1726–1732.

Murakami, M., Zheng, Y., Hirashima, M., Suda, T., Morita, Y., Ooehara, J., Ema, H., Fong, G.-H., and Shibuya, M. (2008). VEGFR1 Tyrosine Kinase Signaling Promotes Lymphangiogenesis as Well as Angiogenesis Indirectly via Macrophage Recruitment. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 658–664.

Naito, H., Kidoya, H., Sakimoto, S., Wakabayashi, T., and Takakura, N. (2012). Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J.* *31*, 842–855.

Narwal, M., Venkannagari, H., and Lehtiö, L. (2012). Structural Basis of Selective Inhibition of Human Tankyrases. *J. Med. Chem.* *55*, 1360–1367.

Naujok, O., Lentjes, J., Diekmann, U., Davenport, C., and Lenzen, S. (2014). Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors. *BMC Res. Notes* *7*, 273.

Neve, A., Cantatore, F.P., Maruotti, N., Corrado, A., and Ribatti, D. (2014). Extracellular matrix modulates angiogenesis in physiological and pathological conditions. *Bio-Med Res. Int.* *2014*, 756078.

Nielsen, J.S., and McNagny, K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *J. Cell Sci.* *121*, 3683–3692.

Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M.A., Virag, J.A.I., Ware, C.B., Masino, A., Muskheli, V., Pabon, L., Reinecke, H., and Murry, C.E. (2007). Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J.* *21*, 1345–1357.

Paik, D.T., Rai, M., Ryzhov, S., Sanders, L.N., Aisagbonhi, O., Funke, M.J., Feoktistov, I., and Hatzopoulos, A.K. (2015). Wnt10b Gain-of-Function Improves Cardiac Repair

by Arteriole Formation and Attenuation of Fibrosis Novelty and Significance. *Circ. Res.* *117*, 804–816.

Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Klinke, R., Brenner, B., Gay, R., and Rothenburger, A. (2014). *Physiologie* (Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag) 171-187; 214-249.

Pasquinelli, G., Tazzari, P.L., Vaselli, C., Foroni, L., Buzzi, M., Storci, G., Alviano, F., Ricci, F., Bonafè, M., Orrico, C., et al. (2007). Thoracic aortas from multiorgan donors are suitable for obtaining resident angiogenic mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* Dayt. Ohio *25*, 1627–1634.

Passman, J.N., Dong, X.R., Wu, S.-P., Maguire, C.T., Hogan, K.A., Bautch, V.L., and Majesky, M.W. (2008). A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sc1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 9349–9354.

Patel-Hett, S., and DAmore, P.A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 353–363.

Phng, L.-K., and Gerhardt, H. (2009). Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev. Cell* *16*, 196–208.

Phng, L.-K., Potente, M., Leslie, J.D., Babbage, J., Nyqvist, D., Lobov, I., Ondr, J.K., Rao, S., Lang, R.A., Thurston, G., et al. (2009). Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev. Cell* *16*, 70–82.

Psaltis, P.J., and Simari, R.D. (2015). Vascular Wall Progenitor Cells in Health and Disease. *Circ. Res.* *116*, 1392–1412.

Psaltis, P.J., Harbuzariu, A., Delacroix, S., Witt, T.A., Holroyd, E.W., Spoon, D.B., Hoffman, S.J., Pan, S., Kleppe, L.S., Mueske, C.S., et al. (2012). Identification of a Monocyte-Prdisposed Hierarchy of Hematopoietic Progenitor Cells in the Adventitia of Postnatal Murine Aorta. *Circulation* *125*, 592–603.

Psaltis, P.J., Puranik, A.S., Spoon, D.B., Chue, C.D., Hoffman, S.J., Witt, T.A., Delacroix, S., Kleppe, L.S., Mueske, C.S., Pan, S., et al. (2014). Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature. *Circ. Res.* *115*, 364–375.

Pugsley, M.K., and Tabrizchi, R. (2000). The vascular system. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* *44*, 333–340.

Reis, M., and Liebner, S. (2013). Wnt signaling in the vasculature. *Exp. Cell Res.* *319*, 1317–1323.

Reis, M., Czupalla, C.J., Ziegler, N., Devraj, K., Zinke, J., Seidel, S., Heck, R., Thom, S., Macas, J., Bockamp, E., et al. (2012). Endothelial Wnt/ $\beta$ -catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J. Exp. Med.* *209*, 1611–1627.

- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91.
- Rojas-Sutterlin, S., Lecuyer, E., and Hoang, T. (2014). Kit and Scl regulation of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Hematol.* 21, 256–264.
- Ruiz, P., Schwärzler, C., and Günthert, U. (1995). CD44 isoforms during differentiation and development. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 17, 17–24.
- Sainz, J., Al Haj Zen, A., Caligiuri, G., Demerens, C., Urbain, D., Lemitre, M., and Lafont, A. (2006). Isolation of “side population” progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 281–286.
- Sanberg, P.R., Park, D.-H., Kuzmin-Nichols, N., Cruz, E., Hossne, N.A., Buffolo, E., and Willing, A.E. (2009). Monocyte transplantation for neural and cardiovascular ischemia repair. *J. Cell. Mol. Med.* 553–563.
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L.J., Robinson, B., Brose, M.S., Elisei, R., Habra, M.A., Newbold, K., Shah, M.H., Hoff, A.O., et al. (2015). Lenvatinib versus Placebo in Radioiodine-Refractory Thyroid Cancer. *N. Engl. J. Med.* 372, 621–630.
- Schünke, M., Schulte, E., and Schumacher, U. (2014). *Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem* (Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag), 62-67.
- Schwartz, C.J., and Mitchell, J.R. (1962). Cellular infiltration of the human arterial adventitia associated with atheromatous plaques. *Circulation* 26, 73–78.
- Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J.I. (1992). Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 12160–12164.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66.
- Shen, X., Pan, B., Zhou, H., Liu, L., Lv, T., Zhu, J., Huang, X., and Tian, J. (2017). Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* 24.
- Shibuya, M. (2013). VEGFR and Type-V RTK Activation and Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a009092–a009092.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D’Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze’ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5522–5527.

- Sidney, L.E., Branch, M.J., Dunphy, S.E., Dua, H.S., and Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1380–1389.
- Skyschally, A., Schulz, R., and Heusch, G. (2008). Pathophysiology of Myocardial Infarction: Protection by Ischemic Pre- and Postconditioning. *Herz Kardiovaskuläre Erkrank.* 33, 88–100.
- Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., and Frid, M.G. (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 23–47.
- Swijnenburg, R.-J., Tanaka, M., Vogel, H., Baker, J., Kofidis, T., Gunawan, F., Lebl, D.R., Caffarelli, A.D., de Bruin, J.L., Fedoseyeva, E.V., et al. (2005). Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112, 1166–1172.
- Szade, A., Grochot-Przeczek, A., Florczyk, U., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2015). Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis: Significance of Inflammation-Induced Angiogenesis. *IUBMB Life* 67, 145–159.
- Thapa, R., and Wilson, G.D. (2016). The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int.* 2016, 2087204.
- Thygesen, K., Alpert, J.S., Jaffe, A.S., Simoons, M.L., Chaitman, B.R., White, H.D., and the Writing Group on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction (2012). Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation* 126, 2020–2035.
- Tohyama, O., Matsui, J., Kodama, K., Hata-Sugi, N., Kimura, T., Okamoto, K., Minoshima, Y., Iwata, M., and Funahashi, Y. (2014). Antitumor Activity of Lenvatinib (E7080): An Angiogenesis Inhibitor That Targets Multiple Receptor Tyrosine Kinases in Preclinical Human Thyroid Cancer Models. *J. Thyroid Res.* 2014, 1–13.
- Torsney, E., Hu, Y., and Xu, Q. (2005). Adventitial Progenitor Cells Contribute to Arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 64–68.
- Traverse, J.H., Henry, T.D., Pepine, C.J., Willerson, J.T., Zhao, D.X.M., Ellis, S.G., Forder, J.R., Anderson, R.D., Hatzopoulos, A.K., Penn, M.S., et al. (2012). Effect of the Use and Timing of Bone Marrow Mononuclear Cell Delivery on Left Ventricular Function After Acute Myocardial Infarction: The TIME Randomized Trial. *JAMA* 308.
- Trost, J.C., and Lange, R.A. (2011). Treatment of acute coronary syndrome: Part 1: Non-ST-segment acute coronary syndrome: *Crit. Care Med.* 39, 2346–2353.
- Trost, J.C., and Lange, R.A. (2012). Treatment of acute coronary syndrome: Part 2. *Crit. Care Med.* 40, 1939–1945.
- Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* 35.

- Walton, C.B., Ecker, J., Anderson, C.D., Outten, J.T., Allison, R.Z., and Shoheit, R.V. (2013). Cardiac angiogenesis directed by stable Hypoxia Inducible Factor-1. *Vasc. Cell* 5, 15.
- Wang, H., Charles, P.C., Wu, Y., Ren, R., Pi, X., Moser, M., Barshishat-Kupper, M., Rubin, J.S., Perou, C., Bautch, V., et al. (2006). Gene expression profile signatures indicate a role for Wnt signaling in endothelial commitment from embryonic stem cells. *Circ. Res.* 98, 1331–1339.
- Wiegering, A., Korb, D., Thalheimer, A., Kämmerer, U., Allmanritter, J., Matthes, N., Linnebacher, M., Schlegel, N., Klein, I., Ergün, S., et al. (2014). E7080 (Lenvatinib), a Multi-Targeted Tyrosine Kinase Inhibitor, Demonstrates Antitumor Activities Against Colorectal Cancer Xenografts. *Neoplasia* 16, 972–981.
- Willert, K., and Nusse, R. (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 95–102.
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., et al. (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *The Lancet* 364, 141–148.
- Wollert, K.C., Meyer, G.P., Müller-Ehmsen, J., Tschöpe, C., Bonarjee, V., Larsen, A.I., May, A.E., Empen, K., Chorianopoulos, E., Tebbe, U., et al. (2017). Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST-2 randomised placebo-controlled clinical trial. *Eur. Heart J.* 38, 2936–2943.
- Wörsdörfer, P., Mekala, S.R., Bauer, J., Edenhofer, F., Kuerten, S., and Ergün, S. (2017). The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. *Pericytes Spec. Issue* 171, 13–29.
- Yamamoto, Y., Matsui, J., Matsushima, T., Obaishi, H., Miyazaki, K., Nakamura, K., Tohyama, O., Semba, T., Yamaguchi, A., Hoshi, S., et al. (2014). Lenvatinib, an angiogenesis inhibitor targeting VEGFR/FGFR, shows broad antitumor activity in human tumor xenograft models associated with microvessel density and pericyte coverage. *Vasc. Cell* 6, 18.
- Yan, Y., Zuo, X., and Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 1033–1043.
- Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N., and Ergün, S. (2006). Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1543–1551.
- Zöller, M. (2011). CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267.

Zorzi, P., Aplin, A.C., Smith, K.D., and Nicosia, R.F. (2010). Technical Advance: The rat aorta contains resident mononuclear phagocytes with proliferative capacity and pro-angiogenic properties. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1051–1059.

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Histologische Quantifizierung anhand immunhistochemisch gefärbter Paraffinschnitte.
- Abbildung 2:** Das Sprouting im CAA zeigt unter Hypoxie insgesamt nur eine geringe Ausprägung.
- Abbildung 3:** Im CAA werden unter Normoxie größere Wachstumsraten erzielt.
- Abbildung 4:** Unter Zugabe des Wachstumsfaktors PDGF-BB führt die Kultivierung unter Normoxie zu einem stärker ausgeprägten Sprouting.
- Abbildung 5:** Inhibierung des Wnt-Signalwegs durch 10  $\mu$ M IWR-1 führt zu einem signifikant verringertem Sprouting im CAA.
- Abbildung 6:** Clodronat-Liposomen induzieren eine Veränderung der Morphologie des Sproutings im CAA.
- Abbildung 7:** Die Quantität des Sproutings im CAA wird durch die Zugabe von Clodronat-Liposomen im Vergleich zu PBS-Liposomen nicht beeinflusst.
- Abbildung 8:** Lenvatinib bewirkt eine hoch signifikante Blockade des Sproutings im CAA.
- Abbildung 9:** Unter Zugabe von Lenvatinib ab Tag 3 zeigt sich eine tendenziell stärker ausgeprägte Hemmung des Sproutings im CAA.
- Abbildung 10:** H.E.-Färbung – Kultivierung im CAA resultiert in einer veränderten Gewebemorphologie.
- Abbildung 11:** Einzelfärbung  $\alpha$ -SMA bzw. CD34 – Kardiales Sprouting im CAA induziert eine Aktivierung und Mobilisierung koronarer, adventitieller CD34<sup>+</sup> Stammzellen.
- Abbildung 12:** Doppelfärbung CD34/ $\alpha$ -SMA – Kardiales Sprouting im CAA induziert eine Aktivierung und Mobilisierung koronarer, adventitieller CD34<sup>+</sup> Stammzellen.
- Abbildung 13:** Doppelfärbung Ki67/CD34 – Kardiales Sprouting im CAA führt zur Aktivierung und Mobilisierung, jedoch nicht unmittelbar zur Mitose von CD34<sup>+</sup> Stammzellen.
- Abbildung 14:** Doppelfärbung CD34/Flk-1 – In frisch isoliertem Gewebe besteht eine Ko-Lokalisation von CD34 und Flk-1.

- Abbildung 15:** Einzelfärbung CD34 – Lenvatinib reduziert die Aktivierung und Mobilisierung von CD34<sup>+</sup> Stammzellen im CAA.
- Abbildung 16:** Doppelfärbung Ki67/CD44 – Kardiales Sprouting im CAA erhöht den Anteil proliferativer CD44<sup>+</sup> Zellen.
- Abbildung 17:** Einzelfärbung CD44 – Lenvatinib verringert die Anzahl und die Migration von CD44<sup>+</sup> Zellen im CAA.
- Abbildung 18:** Einzelfärbung F4/80 – Lenvatinib bewirkt eine Blockade von F4/80<sup>+</sup> Zellen im CAA.

## 8. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Übersicht über verwendete Chemikalien
- Tabelle 2:** Übersicht über verwendete Zellkulturchemikalien
- Tabelle 3:** Übersicht über verwendete Zellkulturmedien
- Tabelle 4:** Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen
- Tabelle 5:** Übersicht über verwendete Antikörper
- Tabelle 6:** Übersicht über verwendete Zytokine und Inhibitoren
- Tabelle 7:** Übersicht über verwendete Kits
- Tabelle 8:** Übersicht über verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 9:** Übersicht über verwendete Software
- Tabelle 10:** Zusammensetzung der Kollagenmatrix (10 ml)
- Tabelle 11:** Übersicht über verwendetes Gewebe und Wachstumsfaktoren
- Tabelle 12:** Beeinflussung des Wnt-Signalwegs mittels CHIR 99021 bzw. IWR-1
- Tabelle 13:** Depletion kardialer Makrophagen mit Hilfe von Clodronat-Liposomen
- Tabelle 14:** Beginn der Faktorenzugabe zu unterschiedlichen Zeitpunkten
- Tabelle 15:** Paraffineinbettung
- Tabelle 16:** Entparaffinierung und Rehydratisierung
- Tabelle 17:** Zusammensetzung der DAB-Entwicklungslösung
- Tabelle 18:** Dehydrierung

## 9. Abkürzungsverzeichnis

ACS	Akutes Koronarsyndrom
APC-Protein	Adenomatöses Polyposis Coli Protein
$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle Actin
CAA	Cardiac Angiogenesis Assay
CK1 $\alpha$	Kaseinkinase 1 $\alpha$
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECs	Endothelial Cells
EPCs	Endothelial Progenitor Cells
FCS	Fetal Calf Serum
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
Flk-1	Fetal liver kinase-1
GSK3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
Il-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
LCA	Arteria coronaria sinistra
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
PCI	Perkutane koronare Intervention
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PFA	Paraformaldehyd
RCA	Arteria coronaria dextra
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RT	Raumtemperatur
SMCs	Smooth Muscle Cells
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

## 10. Danksagung

Da die Fertigstellung dieser Dissertationsarbeit nicht ohne die Unterstützung zahlreicher Mitmenschen möglich gewesen wäre, möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Mein Dank gilt als Erstes meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit unter seiner Leitung am Institut für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg anzufertigen und für die gute Betreuung während der Versuchsphase im Labor, aber auch bei der anschließenden schriftlichen Ausarbeitung der Arbeit.

Dr. rer. nat. Jochen Bauer möchte ich für seine sehr gute Betreuung während der Planung und Durchführung der Versuche sowie in der initialen Schreibphase danken. Danke für die fachlichen Hilfestellungen, für die unendliche Geduld, die du aufgebracht hast, und für dein ständiges Interesse an der Fertigstellung der Arbeit.

Auch bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Anatomie in Würzburg, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit anzufertigen. Dabei möchte ich mich nicht nur für den fachlichen Austausch und die anregenden Diskussionen, sondern vor allem für die stetige Unterstützung bedanken, die mir entgegengebracht wurde. Für ihren unermüdlichen Einsatz in der Histologie und die große Hilfe beim Anfertigen meiner Färbungen gilt mein Dank Erna Kleinschroth, Elke Varin und Doris Dettelbacher-Weber. Auch möchte ich allen, die mich bei der technischen Durchführung der Versuche unterstützt haben, danken. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Angela Meyer-Rachner und Nadja Höhn erwähnen. Bei meinen Mitdoktoranden, vor allem bei Laurens Reeh, möchte ich mich für die gute gemeinsame Zeit im Labor bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner Familie und meinen Freunden, die mir in dieser Zeit stets zur Seite standen.