



Immunmodulatorische Effekte CD44-positiver Gefäßwand-residenter Stamm- und Vorläuferzellen im myokardialen Gewebe

Immunomodulatory effects of CD44-positive vascular wall-resident stem and progenitor cells in myocardial tissue

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

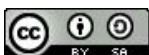
Vorgelegt von

Laurens Reeh

aus

Pöcking

Würzburg | 2021



Eingereicht am:

.....
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender:

Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

1. Betreuer:

Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

2. Betreuerin:

Prof. Dr. rer. nat. Kristina Lorenz

3. Betreuer:

Prof. Dr. med. Christoph Maack

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

.....

Für meine Eltern und meinen Bruder

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Das kardiovaskuläre System	1
1.1.1 Histologischer Aufbau des kardiovaskulären Systems	1
1.1.2 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems	4
1.2 Gefäßwand-residente Stamm- und Vorläuferzellen	6
1.2.1 Vaskulogene Zonen innerhalb der Gefäßwand	7
1.2.2 Multipotente Stammzellpopulationen innerhalb der Gefäßwand	9
1.3 Inflammation	11
1.3.1 Zelluläre Immunabwehr durch Makrophagen	11
1.4 Murine <i>ex vivo</i> -Modelle zur Untersuchung Gefäßwand-residenter Stamm- und Vorläuferzellen	13
1.4.1 Aortenringassay	13
1.4.2 Kardialer Angiogeneseassay	14
1.5 Zielsetzung	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Material	17
2.1.1 Laborgeräte	17
2.1.2 Kommerzielle Laborprodukte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3 Puffer und Lösungen	20
2.1.4 Versuchstiere	21
2.1.5 Primärantikörper	21
2.1.6 Sekundärantikörper	21
2.1.7 Computerprogramme	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Murine <i>ex vivo</i> -Modelle	22
2.2.2 Immunhistochemische Färbemethoden	25

2.2.3 Quantifizierung	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Hypoxie induziert das aortale und kardiale Sprouting <i>ex vivo</i>	35
3.2 CD44 ⁺ Zellen sind proliferationsfähig	37
3.2.1 Proliferation von CD44 ⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard	37
3.2.2 Proliferation von CD44 ⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay	39
3.3 Differenzierung von CD44 ⁺ Zellen zu immunmodulatorischen Zellen	42
3.3.1 Differenzierung von CD44 ⁺ Zellen zu aktiven Makrophagen im Aortenringassay	43
3.3.2 Differenzierung von CD44 ⁺ Zellen zu pro-inflammatorischen M1-Makrophagen im kardialen Angiogeneseassay	44
3.3.3 Differenzierung von CD44 ⁺ Zellen zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen im kardialen Angiogeneseassay	45
3.4 Ausgewählte Faktoren beeinflussen das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44 ⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay	47
3.4.1 Einfluss von VEGF-A und Lenvatinib auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44 ⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay	47
3.4.2 Einfluss einer Makrophagendepletion auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44 ⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay	50
3.4.3 Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44 ⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay	52
4. Diskussion	54
4.1 Hypoxie induziert das Aussprießen von Zellen in unterschiedlichen Angiogeneseassays	54
4.2 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44 ⁺ Zellen	55
4.2.1 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44 ⁺ Zellen <i>in vivo</i> im infarzierten Mäusemyokard	55
4.2.2 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44 ⁺ Zellen <i>in vitro</i> im kardialen Angiogeneseassay	55

4.3 CD44 ⁺ Zellen haben das Potenzial sich zu immunmodulatorischen Zellen zu differenzieren	56
4.4 Einfluss ausgewählter Faktoren auf das kardiale Sprouting und auf CD44 ⁺ Zellen	60
4.4.1 VEGF-A ist entscheidend für die Proliferation und Migration von CD44 ⁺ Zellen	60
4.4.2 Nicht alle CD44 ⁺ Zellen differenzieren sich zu phagozytierenden Makrophagen	60
4.4.3 Unabhängigkeit der CD44 ⁺ Zellen vom Wnt-Signalweg	61
5. Zusammenfassung	63
6. Summary	65
7. Literaturverzeichnis	67
8. Abbildungsverzeichnis	77
9. Abkürzungsverzeichnis	78
10. Danksagung	81

1. Einleitung

1.1 Das kardiovaskuläre System

Das Herzkreislaufsystem ermöglicht unter anderem den Transport von Nährstoffen, Gasen (insb. Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid), Hormonen und Blutzellen (insb. Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten). Das System umfasst dabei in erster Linie das Blut selbst, das Herz und die Blutgefäße. Im weiteren Sinne gehört jedoch auch das Lymphsystem dazu, welches abfiltriertes Blutplasma aus dem Interstitium in Form von Lymphflüssigkeit ins Herzkreislaufsystem zurückführt (Aspelund et al. 2016).

1.1.1 Histologischer Aufbau des kardiovaskulären Systems

Zum besseren Verständnis der vorliegenden Arbeit soll im Folgenden der histologische Aufbau des kardiovaskulären Systems grob skizziert werden.

1.1.1.1 Histologischer Aufbau der Gefäßwand

Blutgefäße, die vom Herzen wegführen, werden als Arterien bezeichnet, diejenigen, die zum Herzen zurückführen, als Venen. Je weiter die Blutgefäße vom Herzen entfernt sind, desto kleiner und verzweigter werden sie. Prinzipiell unterscheidet man zwischen großen, mittleren und kleinen Gefäßen (Worsdorfer et al. 2017). Die Wand großer und mittlerer Blutgefäße setzt sich aus drei Schichten zusammen: der inneren Tunica intima (Intima), der mittleren Tunica media (Media) und der äußeren Tunica adventitia (Adventitia) (Worsdorfer et al. 2017). Im Gegensatz zur Dicke der Intima variiert die Dicke der Media und der Adventitia je nach Typ, Größe und Lage des Blutgefäßes (Worsdorfer et al. 2017).

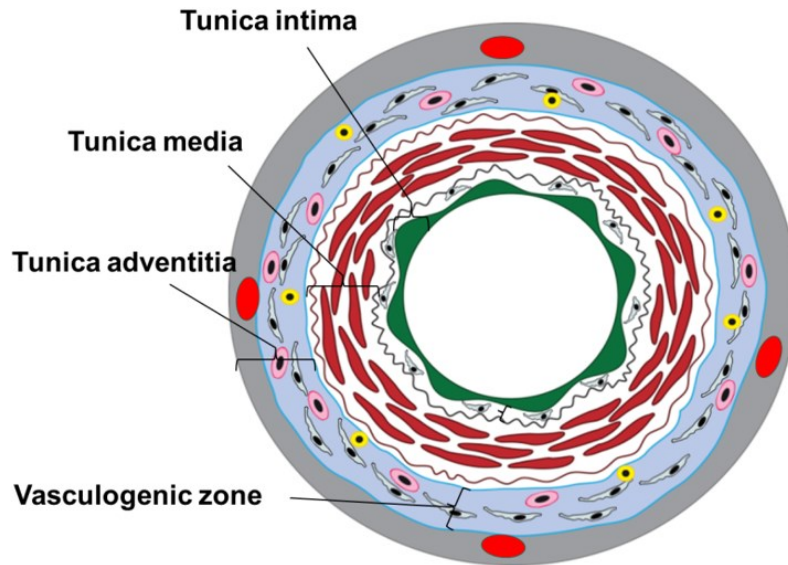


Abbildung 1: Histologischer Aufbau der Gefäßwand

Die sog. vaskulogene Zone in der Tunica adventitia stellt eine Nische für Gefäßwand-residente Stamm- und Vorläuferzellen (VW-SCs) dar.

Quelle: Tilki et al. *Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease. Trends Mol Med.* 2009. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

1.1.1.1.1 Intima

Das Gefäßlumen wird von einer Endothelschicht ausgekleidet. Darunter befindet sich eine dünne, subendotheliale Schicht aus Bindegewebszellen, welche frei von Mikrogefäßen ist. Diese innerste Schicht der Gefäßwand wird als Intima bezeichnet. Studien deuten auf das subendotheliale Vorkommen von Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb der Intima hin (Fang et al. 2012; Naito et al. 2012; Fang et al. 2015; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018).

1.1.1.1.2 Media

Die Media besteht hauptsächlich aus glatten Muskelzellen und elastischen Fasern, welche gemeinsam eine Muskelschicht bilden, die für die Regulierung des Gefäßtonus und des lokalen Blutdrucks unerlässlich ist (Worsdorfer et al. 2017). Darüber hinaus deuten einzelne Studien auf das Vorkommen von Vorläuferzelltypen innerhalb der Media hin (Tintut et al. 2003; Tang et al. 2012). Diese Vorläuferzellen scheinen bspw. bei der Reparatur der Gefäßwand eine wichtige Rolle zu spielen (Tintut et al. 2003). Außerdem haben einige dieser Vorläuferzellen das Potenzial, sich zu mesenchymalen und neuronalen Zelltypen zu differenzieren (Tang et al. 2012).

1.1.1.1.3 Adventitia

Die Adventitia dient als Schnittstelle zwischen dem Blutgefäß und dem umliegenden Gewebe. Sie besteht aus kollagenreichem Bindegewebe, welches von perivaskulären Nerven und Lymphgefäßen durchzogen wird. Außerdem beinhaltet die Adventitia Mikrogefäße (sog. Vasa vasorum) zur Versorgung der äußeren Gefäßwandschichten, welche durch Diffusion aus dem Gefäßlumen nicht ausreichend versorgt werden können. Insbesondere in größeren Blutgefäßen dringen diese Vasa vasorum bis in die Media ein (Mekala et al. 2018). Neben Bindegewebszellen und vaskulären Zellen der Vasa vasorum (bspw. Endothelzellen und Perizyten) beinhaltet die Adventitia auch eine Vielzahl multipotenter Stamm- und Vorläuferzellen (Hu et al. 2004; Passman et al. 2008; Psaltis et al. 2014; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018).

1.1.1.2 Histologischer Aufbau der Herzwand

Ein reifes Säugetierherz besteht aus vier Herzkammern (rechter Vorhof, linker Vorhof, rechter Ventrikel und linker Ventrikel) und vier Herzklappen (Pulmonalklappe, Aortenklappe, Trikuspidalklappe und Mitralklappe). Die Herzkammern und -klappen sind so angeordnet, dass sie den Lungenkreislauf vom systemischen Kreislauf trennen und einen gerichteten Blutfluss sicherstellen. Dies erfordert komplexe morphogenetische Prozesse und das Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen (Lin et al. 2012). Die Herzwand aller vier Kammern besteht aus drei Schichten: dem inneren Endokard (Endocardium), dem mittleren Myokard (Myocardium) und dem äußeren Epikard (Epicardium). Umgeben wird das Herz von einem doppelmembranigen Beutel: dem Perikard (Pericardium) (Arackal and Alsayouri 2019). Zum genaueren Verständnis dieser Arbeit sollen im Folgenden die einzelnen Schichten der Herzwand genauer beschrieben werden.

1.1.1.2.1 Endokard

Das Endokard ist die innerste Schicht der Herzwand, welche die Herzkammern auskleidet und die Herzklappen bedeckt. Dabei ist es kontinuierlich mit dem Endothel der kardialen Arterien und Venen verbunden. Es besteht aus einer einzelnen Schicht von Endothelzellen. Darunter befindet sich eine dünne subendotheliale Schicht, welche

lockeres Bindegewebe, Kollagenbündel, Nerven und vereinzelte Blutgefäße enthält (Aguilar-Sanchez, Michael, and Pennings 2018; Arackal and Alsayouri 2019).

1.1.1.2.2 Myokard

Die mittlere und breiteste Schicht der Herzwand wird als Myokard bezeichnet und besteht vorrangig aus Kardiomyozyten, welche sich zu Herzmuskelfasern zusammenlagern. Es werden zwei Arten von Herzmuskeln unterschieden: Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards, welche für die Kontraktilität des Herzens verantwortlich sind und Kardiomyozyten des Erregungsleitungssystems, welche der Erregungsbildung und -weiterleitung im Herzen dienen (Shimada et al. 2004). Herzmuskelzellen sind ca. 100 µm lang und haben einen Durchmesser von ca. 10-25 µm (Olivetti et al. 1996; Goktepe et al. 2010). Ähnlich wie Muskelzellen der Skelettmuskulatur sind Kardiomyozyten quergestreift, sie sind jedoch verzweigt und enthalten meist nur einen Zellkern (Arackal and Alsayouri 2019). Darüber hinaus besitzen Kardiomyozyten nach einer Schädigung, wie bspw. einem Myokardinfarkt, nur ein äußerst limitiertes Regenerationspotenzial (Bergmann et al. 2009; Efe et al. 2011; Mekala et al. 2018). Diese unzureichende Regeneration untergegangener Kardiomyozyten stellt ein grundlegendes Problem dar und ist Gegenstand der gegenwärtigen Forschung (Mekala et al. 2018).

1.1.1.2.3 Epikard

Die seröse Hülle des Herzens wird als Epikard bezeichnet. Das Epikard ist gleichzeitig auch das viszerale Blatt (Lamina visceralis) des Perikards (Rodriguez and Tan 2017). Unterhalb der Lamina visceralis des Herzbeutels besteht das Epikard vorrangig aus fibroelastischem Binde- und Fettgewebe. Die Koronararterien und -venen, Lymphgefäße und Nerven verlaufen unterhalb des Epikards (Arackal and Alsayouri 2019).

1.1.2 Erkrankungen des kardiovaskulären Systems

Herz-Kreislauf-Erkrankungen, wie bspw. die koronare Herzkrankheit (KHK) und der Myokardinfarkt, sind weiterhin die häufigste Todesursache weltweit (Mortality and Causes of Death 2016; Ibanez et al. 2018).

1.1.2.1 Therapie des akuten Myokardinfarkts

Von einem akuten Myokardinfarkt spricht man bei einer Schädigung des Myokards (definiert als eine Erhöhung der kardialen Troponinwerte über die 99. Perzentile des oberen Referenzwertes) durch eine akute myokardiale Ischämie (Thygesen et al. 2012). Anhand des EKG-Befundes wird zwischen einem Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung (STEMI) und einem ohne ST-Streckenhebung (NSTEMI) unterschieden. Für beide Formen des Herzinfarktes existieren unterschiedliche Behandlungsleitlinien (Ibanez et al. 2018).

1.1.2.1.1 Etablierte Therapieansätze

Während der letzten Dekaden kam es zu signifikanten Fortschritten bei der Behandlung von Patienten mit akutem Myokardinfarkt (Reddy, Khaliq, and Henning 2015). Dabei spielen insbesondere rekanalisierende Maßnahmen wie perkutane koronare Interventionen mit oder ohne Stentimplantation, Bypassoperation und die medikamentöse Fibrinolyse eine entscheidende Rolle (Ibanez et al. 2018). Außerdem konnte der routinemäßige Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern die Morbidität und Mortalität der Patienten mit akutem Herzinfarkt reduzieren (Reddy, Khaliq, and Henning 2015). Entscheidend für den Therapieerfolg ist insbesondere der frühe Beginn der rekanalisierenden Maßnahmen, da es ansonsten rasch zu einer irreversiblen Schädigung der ischämischen Kardiomyozyten kommt (Buja 2013; Ibanez et al. 2018). In Zukunft könnten kardioregenerative Therapieansätze mittels Stamm- und Vorläuferzellen zunehmend an Bedeutung gewinnen (Mekala et al. 2018). Gerade Patienten, für die eine rekanalisierende Therapie zu spät kommt, könnten von solchen Therapieansätzen profitieren.

1.1.2.1.2 Kardioregenerative Therapieansätze mittels Stamm- und Vorläuferzellen

Der Untergang myokardialen Gewebes, bspw. im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts, ist eine häufige Ursache der Herzinsuffizienz. Die unzureichende Regeneration untergegangener Kardiomyozyten stellt dabei ein grundlegendes Problem dar. Trotz mehrerer Strategien, die während der letzten Jahrzehnte entwickelt wurden, ist die endogene Regeneration des Herzgewebes nach wie vor nur begrenzt möglich (Mekala et al. 2018).

Obwohl jüngste Forschungsergebnisse auf ein gewisses myokardiales Regenerationspotenzial hindeuten (Bergmann et al. 2009), scheint dieses Potenzial äußerst limitiert zu sein (Efe et al. 2011). Bisher wurden verschiedene somatische Zelltypen mit einem gewissen kardiogenen Potenzial identifiziert. Dabei handelt es sich bspw. um Stammzellen aus dem Knochenmark (Lunde et al. 2006) sowie periphere Blutstammzellen (Zimmet et al. 2012) und endotheliale Vorläuferzellen (Badorff et al. 2003). In präklinischen Modellen konnte zwar eine geringfügige Verbesserung der Herzfunktion durch Transplantation solcher Zellen gezeigt werden, die klinische Anwendung dieses Ansatzes blieb bisher jedoch ohne Erfolg (Mekala et al. 2018). Stamm- und Vorläuferzellen im myokardialen Gewebe könnten in Zukunft eine wichtige Rolle im Rahmen regenerativer Therapieansätze herzinsuffizienter Patienten spielen. Eine vielversprechende Stammzellnische könnte die vaskuläre Adventitia sein, die nachweislich verschiedene Stamm- und Vorläuferzelltypen beherbergt (Yu et al. 2016; Worsdorfer et al. 2017; Ellison-Hughes and Madeddu 2017).

1.2 Gefäßwand-residente Stamm- und Vorläuferzellen

Die Annahme, dass die reife Gefäßwand eine Nische für Stamm- und Vorläuferzellen darstellt, ist relativ neu und beruht in erster Linie auf Studien der letzten beiden Jahrzehnte (Alessandri et al. 2001; Hu et al. 2004; Tavian et al. 2005; Zengin et al. 2006; Invernici et al. 2008; Passman et al. 2008; Tilki et al. 2009; Campagnolo et al. 2010; Klein et al. 2011; Psaltis et al. 2014; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018). Das Vorkommen von Stamm- und Vorläuferzellen konnte dabei hauptsächlich in zwei Bereichen der Gefäßwand nachgewiesen werden: subendothelial innerhalb der Intima und adventitiell (Worsdorfer et al. 2017). Einzelne Studien haben auch auf das Vorkommen von Vorläuferzellen innerhalb der Media verwiesen (Tang et al. 2012).

Diese Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen (VW-SCs) sind dabei nicht nur in großen und mittleren, sondern scheinbar auch in kleinen Blutgefäßen nachweisbar (Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018). Wenn man bedenkt, dass die Gesamtlänge der Blutgefäße eines Menschen auf ca. 80.000 bis 100.000 km geschätzt wird (Worsdorfer et al. 2017), lässt sich die enorme Bedeutung dieser Stammzellnische

erahnen. Das Vorhandensein von Blutgefäßen in nahezu allen Geweben und Organen, unterstreicht das Potenzial dieser Zellen im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse. Unabhängig von ihrer Lokalisation innerhalb der Gefäßwand, differenzieren sich diese Stamm- und Vorläuferzellen nicht nur zu vaskulären, sondern auch zu nicht-vaskulären Zellen, wie bspw. Makrophagen oder folliculären dendritischen Zellen (Zengin et al. 2006; Campagnolo et al. 2010; Ergun, Tilki, and Klein 2011; Krautler et al. 2012; Vono et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018). Erste In-vitro-Studien konnten bereits zeigen, dass sich das Differenzierungspotenzial adventitieller Stammzellen medikamentös verändern lässt (Wong et al. 2013).

1.2.1 Vaskulogene Zonen innerhalb der Gefäßwand

Wie bereits erwähnt, wurden innerhalb der Wand reifer Blutgefäße verschiedene Nischen beschrieben, die als Reservoir multipotenter Stamm- und Vorläuferzellen fungieren. Dabei wurde das Vorkommen dieser Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb aller Schichten der Gefäßwand beschrieben: subendothelial innerhalb der Intima (Fang et al. 2012; Naito et al. 2012; Fang et al. 2015) sowie innerhalb der Media (Tintut et al. 2003; Tang et al. 2012) und innerhalb der Adventitia (Hu et al. 2004; Passman et al. 2008; Psaltis et al. 2014; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018). Die Adventitia scheint dabei die vielseitigste Nische zu sein, die unterschiedliche Subpopulationen von Stamm- und Vorläuferzellen beherbergt, welche sich zu vaskulären und nicht-vaskulären Zelltypen differenzieren können (Zengin et al. 2006; Campagnolo et al. 2010; Ergun, Tilki, and Klein 2011; Krautler et al. 2012; Vono et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018).

1.2.1.1 Subendotheliale vaskulogene Zone

Im Jahr 2005 lieferten Ingram et al. den ersten Beweis für das Vorhandensein einer vollständigen Hierarchie endothelialer Vorläuferzellen im Endothel von Blutgefäßen (Ingram et al. 2005). Neuere Studien zeigten das Vorkommen ruhender endothelialer Stammzellen, welche in der Zellkultur nach Aktivierung ein hohes proliferatives Potenzial aufwiesen (Fang et al. 2012; Naito et al. 2012; Fang et al. 2015). Einzelne dieser

Zellen bildeten nach Transplantation in Mäuse perfundierte und funktionelle Blutgefäße (Fang et al. 2012).

1.2.1.2 Adventitielle vaskulogene Zone

Wie bereits erwähnt, ist die Adventitia die vielseitigste Nische für Stamm- und Vorläuferzellen innerhalb der Gefäßwand, da sie eine Vielzahl multipotenter Stamm- und Vorläuferzellen enthält, die sich sowohl zu vaskulären als auch nicht-vaskulären Zellen differenzieren können (Zengin et al. 2006; Campagnolo et al. 2010; Ergun, Tilki, and Klein 2011; Krautler et al. 2012; Vono et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018).

Erste Hinweise auf adventitielle Stamm- und Vorläuferzellen lieferten Experimente an humanen embryonalen Aorten. Dabei konnte das Vorhandensein von CD34⁺CD31⁻ Zellen innerhalb der Adventitia gezeigt werden, welche *in vitro* zur Neubildung von Blutgefäßen beitragen (Alessandri et al. 2001). Einige Jahre später zeigten Zengin et al., dass sich CD34⁺KDR⁺CD31⁻ Vorläuferzellen aus der Adventitia der menschlichen Arteria thoracica interna nicht nur zu Endothelzellen, sondern zu allen Zelltypen der Gefäßwand differenzieren (Zengin et al. 2006). Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass sich diese Stammzellen in einer definierten Zone innerhalb der Adventitia befinden. Diese Zone wurde als *vaskulogene Zone* bezeichnet (Zengin et al. 2006). Außerdem zeigten Zengin et al., dass sich die Stammzellen dieser vaskulogenen Zone auch zu nicht-vaskulären Zellen, wie bspw. Makrophagen, differenzieren. Damit fungieren sie als eine vom Knochenmark unabhängige Quelle gewebständiger Makrophagen (Zengin et al. 2006; Worsdorfer et al. 2017).

In murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass Stammzellen der vaskulogenen Zone innerhalb der Adventitia scheinbar durch den Sonic-Hedgehog-Signalweg (Shh) kontrolliert werden (Passman et al. 2008). Dieser Signalweg ist essenziell für das Wachstum und die Morphogenese zahlreicher Gewebe (McMahon, Ingham, and Tabin 2003). Folglich zeigte sich bei Shh^{-/-} Mäusen eine reduzierte Anzahl von Sca-1⁺ Vorläuferzellen (Passman et al. 2008). Diese Sca-1⁺ Zellen differenzieren sich *in vitro* zu glatten Muskelzellen sowie zu Adipozyten und Chondrozyten und erfüllten somit die

Kriterien multipotenter mesenchymaler Stammzellen (Passman et al. 2008; Worsdorfer et al. 2017).

2011 identifizierten Klein et al. eine Population von CD44⁺CD90⁺CD73⁺CD34⁻CD45⁻ Zellen in der Adventitia der humanen Arteria thoracica interna (in der Klinik: Arteria mammaria interna), welche sich zu Perizyten und glatten Muskelzellen differenzieren (Klein et al. 2011).

Zusätzlich zu den von Passman et al. beschriebenen Sca-1⁺CD45⁻ Zellen (Passman et al. 2008), konnte das Vorkommen von Sca-1⁺CD45⁺ Makrophagen-Vorläuferzellen innerhalb der Adventitia muriner Blutgefäße gezeigt werden (Psaltis et al. 2014). Es konnte also mehrfach demonstriert werden, dass die VW-SCs der Adventitia eine wichtige und vom Knochenmark unabhängige Quelle gewebständiger Makrophagen darstellen (Zengin et al. 2006; Psaltis et al. 2014; Worsdorfer et al. 2017).

Außerdem ließen sich aus PDGFRβ⁺ adventitiellen Vorläuferzellen folliculäre dendritische Zellen generieren (Krautler et al. 2012). Diese Immunzellen sind für die mikroanatomische Plastizität lymphoider Follikel von entscheidender Bedeutung (Krautler et al. 2012). Hierdurch ließ sich erneut die Bedeutung der VW-SCs für das Immunsystem unterstreichen.

Zusätzlich stellt die adulte vaskuläre Adventitia ein beträchtliches Reservoir für verschiedene Arten von Stamm- und Vorläuferzellen dar, die an Herz-Kreislauf-Erkrankungen beteiligt sind (Tilki et al. 2009; Ergun, Tilki, and Klein 2011; Hu and Xu 2011; Torsney and Xu 2011; Majesky et al. 2012; Stenmark et al. 2013; Zhang and Xu 2014; Orlandi 2015; Mekala et al. 2018).

1.2.2 Multipotente Stammzellpopulationen innerhalb der Gefäßwand

Studien der letzten Dekade konnten das Vorkommen unterschiedlicher multipotenter Stammzellpopulationen innerhalb der reifen Gefäßwand nachweisen (Campagnolo et al. 2010; Klein et al. 2011; Corselli et al. 2012; Klein et al. 2013; Klein et al. 2014; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018). Die identifizierten multipotenten VW-SCs zeigten ein klonales Wachstum in der Zellkultur und typische Merkmale mesenchymaler

Stammzellen (Campagnolo et al. 2010; Klein et al. 2011; Corselli et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017). Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark sind ebenfalls multipotente Stammzellen, welche sich bspw. zu Knorpel-, Knochen-, Sehnen-, Muskel- und Fettzellen sowie hämatopoetischen Zellen differenzieren (Worsdorfer et al. 2017). Basierend auf der immunphänotypischen Charakterisierung der adventitiellen Stammzellen können mindestens zwei grundlegende Zellpopulationen unterschieden werden: CD34⁺FLK1⁺CD31⁻CD45⁻ und CD44⁺CD31⁻CD34⁻ Zellen (Worsdorfer et al. 2017). Die zellulären und molekularen Mechanismen, welche die Ruhigstellung dieser Stammzellen unter physiologischen Bedingungen bzw. deren Differenzierung im Rahmen pathologischer Prozesse bedingen, sind Gegenstand aktueller Studien.

1.2.2.1 CD44⁺ Gefäßwand-residente Stamm- und Vorläuferzellen

Die CD44-Proteine bilden eine große Gruppe multifunktionaler, transmembranöser Glykoproteine und gehören zu den Zelladhäsionsproteinen (Morath, Hartmann, and Orian-Rousseau 2016). Alle CD44-Proteine werden durch das CD44-Gen kodiert, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11p13 befindet (Sneath and Mangham 1998). Die Heterogenität der Proteinfamilie beruht hauptsächlich auf alternativem Splicing und posttranslationalen Modifikationen (Orian-Rousseau 2010; Morath, Hartmann, and Orian-Rousseau 2016). CD44 wird von zahlreichen Säugetierzelltypen exprimiert und bindet als Hauptliganden Hyaluronsäure und vermittelt so Zellkontakte und Kontakte zur extrazellulären Matrix (Sneath and Mangham 1998; Mishra et al. 2019). Dabei erfüllt das Glykoprotein eine Vielzahl von Funktionen, wie zelluläre Adhäsion, Hyaluronsäureabbau, Lymphozytenaktivierung und -homing, Myelo- und Lymphopoese, Angiogenese und Freisetzung von Zytokinen (Huet et al. 1989; Trochon et al. 1996; Sneath and Mangham 1998; Mishra et al. 2019). Darüber hinaus spielen CD44-Proteine bei der Progression und Metastasierung von Tumoren eine wichtige Rolle (Sneath and Mangham 1998; Orian-Rousseau 2010; Morath, Hartmann, and Orian-Rousseau 2016).

Während der letzten Jahre hat CD44 auch als Marker multipotenter VW-SCs zunehmend an Bedeutung gewonnen (Klein et al. 2011; Mekala et al. 2018). Klein et al. gelang die

Isolation von CD44⁺ Zellen aus der Adventitia der humanen Arteria thoracica interna (bzw. Arteria mammaria interna). Diese Zellen wiesen ein für mesenchymale Stammzellen charakteristisches Profil von Zelloberflächenproteinen auf (Klein et al. 2011). Durch die fehlende Expression von CD146 und PDGFR β konnten diese Zellen von vaskulären, glatten Muskelzellen abgegrenzt werden. Außerdem zeigten CD44⁺ Zellen die Fähigkeit, auf Kunststoff zu haften und sich entlang mesodermaler Linien zu differenzieren (Klein et al. 2011). Zusammengefasst lassen sich diese adventitiellen CD44⁺ Zellen also als Gefäßwand-residente multipotente Stammzellen bezeichnen, da sie alle von der *International Society for Cellular Therapy* definierten Kriterien mesenchymaler Stammzellen erfüllen (Dominici et al. 2006; Klein et al. 2011).

1.3 Inflammation

1.3.1 Zelluläre Immunabwehr durch Makrophagen

Makrophagen kommen in allen Geweben vor und verfügen dabei über zahlreiche Funktionen. Sie spielen unter anderem bei der embryonalen Entwicklung, der Homöostase sowie der Gewebsreparatur und der zellulären Immunabwehr eine bedeutende Rolle (Wynn, Chawla, and Pollard 2013). Im Rahmen pathologischer Prozesse können diese homöostatischen und immunologischen Funktionen soweit gestört sein, dass Makrophagen kausal zur Entstehung von Erkrankungen beitragen (Wynn, Chawla, and Pollard 2013). Aufgrund ihrer funktionellen Vielfalt lassen sich Makrophagen durch ein breites Spektrum an Stimuli aktivieren, welches unter anderem mikrobielle Antigene, Immunkomplexe sowie apoptotische oder nekrotische Zellen und verschiedene Mediatoren umfasst (Akira et al. 2013; Colin, Chinetti-Gbaguidi, and Staels 2014; Forbes and Rosenthal 2014; Martinez and Gordon 2014; Roszer 2015).

Phänotypisch können Makrophagen in zwei Gruppen unterteilt werden: pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Makrophagen (Mills et al. 2000). M1-Makrophagen spielen bei der Abwehr von Pathogenen, bspw. durch Phagozytose und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, eine wichtige Rolle. M2-Makrophagen wirken entzündungshemmend und sind essenziell für die Reparatur geschädigten

Gewebes (Krzyszczuk et al. 2018). Im Rahmen der Wundheilung überwiegt häufig zunächst der Anteil pro-inflammatorischer M1-Makrophagen, während es im weiteren Verlauf zu einem Überwiegen anti-inflammatorischer M2-Makrophagen kommt (Krzyszczuk et al. 2018). Die beiden Populationen können sich hinsichtlich ihrer genexpressiven und funktionellen Eigenschaften überlappen. Zahlreiche Hybridformen, welche von der Mikroumgebung abhängen, können dabei ein ganzes Kontinuum von Aktivierungszuständen bilden (Kreider et al. 2007; Mosser and Edwards 2008; Martinez and Gordon 2014; Xue et al. 2014; Roszer 2015). M1- und M2-Makrophagen bilden dabei die Endpunkte dieses Spektrums (Mosser and Edwards 2008).

1.3.1.1 M1-Makrophagen (M1-Phase)

M1-Makrophagen werden auch als klassisch aktivierte Makrophagen bezeichnet. Dieser Begriff wurde ursprünglich in den 1960er Jahren von Mackaness eingeführt, um die antigenabhängige Aktivierung mikrobizider Makrophagen zu beschreiben (Mackaness 1962). Später konnte jedoch gezeigt werden, dass M1-Makrophagen nicht nur antimikrobielle, sondern auch zytotoxische und antitumorale Fähigkeiten besitzen (Pace et al. 1983; Celada et al. 1984).

M1-Makrophagen lassen sich unter anderem durch Liganden der Toll-Like-Rezeptoren (TLR) aktivieren, was zur antimikrobiellen Wirksamkeit dieser Zellen beiträgt. Zu diesen Liganden zählen unter anderem die für grampositive Bakterien typische Lipoteichonsäure und das für gramnegative Bakterien typische bakterielle Lipopolysaccharid (Nau et al. 2002; Martinez and Gordon 2014). Darüber hinaus konnten Interferon-gamma und der Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) als Stimuli der M1-Aktivierung identifiziert werden (Hu and Ivashkiv 2009; Martinez and Gordon 2014).

Klassisch aktivierte M1-Makrophagen sezernieren entzündliche Zytokine und bilden über die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) das toxische Stickstoffmonoxid. Deshalb konnte sich iNOS als gängiger Marker muriner M1-Makrophagen etablieren (Martinez and Gordon 2014).

1.3.1.2 M2-Makrophagen (M2-Phase)

M2-Makrophagen werden auch als alternativ aktivierte Makrophagen bezeichnet (Martinez and Gordon 2014). Sie gelten als Gegenspieler der M1-Makrophagen, wirken entzündungshemmend und fördern die Wundheilung (Ferrante and Leibovich 2012; Sica and Mantovani 2012; Roszer 2015). Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Heterogenität lassen sie sich in mehrere Subtypen unterteilen (Wang et al. 2019). M2a-Makrophagen werden durch Zytokine (IL-4 und IL-13) stimuliert und wirken vor allem anti-inflammatorisch und wundheilungsfördernd (Mantovani et al. 2004; Colin, Chinetti-Gbaguidi, and Staels 2014; De Paoli, Staels, and Chinetti-Gbaguidi 2014; Wynn and Vannella 2016). M2b-Makrophagen werden auch als immunregulatorischer Subtyp bezeichnet und lassen sich vor allem durch Immunkomplexe in Kombination mit TLR-Liganden stimulieren. Sie sezernieren beträchtliche Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Anderson and Mosser 2002; Mantovani et al. 2004; Mosser and Edwards 2008; Ambarus et al. 2012; Graff et al. 2012; Yue et al. 2017). M2c-Makrophagen wirken immunsuppressiv und fördern gewebliche Umbauprozesse. Sie lassen sich vorrangig durch IL-10 und Glukokortikoide aktivieren (Ambarus et al. 2012; Roszer 2015; Wynn and Vannella 2016). Darüber hinaus existieren M2d-Makrophagen, welche insbesondere im Rahmen der Angiogenese und Progression von Tumoren eine Rolle zu spielen scheinen (Duluc et al. 2007; Wang et al. 2010; Ferrante and Leibovich 2012; Wu et al. 2012; Sunakawa et al. 2015; Atri, Guerfali, and Laouini 2018). Trotz der Heterogenität der M2-Makrophagen eignet sich das entzündungshemmende Zytokin IL-10 als Marker aller vier Subtypen (Wang et al. 2019).

1.4 Murine *ex vivo*-Modelle zur Untersuchung Gefäßwand-residenten Stamm- und Vorläuferzellen

1.4.1 Aortenringassay

Die Angiogenese ist unabdingbar im Rahmen zahlreicher physiologischer Prozesse (bspw. während Embryogenese), spielt jedoch auch beim Fortschreiten vieler Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Carmeliet 2005; Folkman 2007). Daher ist der

Einsatz antiangiogener Substanzen bei der Behandlung dieser Erkrankungen teilweise von großer Bedeutung (Wiegering et al. 2014). Ausschlaggebend für diese Erkenntnisse waren die zahlreichen experimentellen Modelle, welche zur genaueren Untersuchung der Angiogenese und der Wirksamkeit antiangiogener Medikamente entwickelt wurden (Goodwin 2007).

Einer der am häufigsten verwendeten Angiogeneseassays ist der Aortenringassay (ARA) (Nicosia 2009). Bei diesem Assay handelt es sich um ein dreidimensionales *ex vivo*-Modell, bei dem murine Aortenringe in eine Kollagenmatrix eingebettet werden. Unter definierten Kultivierungsbedingungen kommt es zum Aussprossen von Zellen (aortales Sprouting), welche sich zu neuen Blutgefäßen formieren. Der ARA zeichnet sich vor allem durch seine Reproduzierbarkeit, Kosteneffizienz und Korrelation mit *in vivo*-Studien aus (Nicosia 2009; Aplin and Nicosia 2015). Darüber hinaus eignet er sich zur genaueren Untersuchung von VW-SCs (Mekala et al. 2018).

1.4.2 Kardialer Angiogeneseassay

Die kardiale Angiogenese ist aufgrund ihrer Beteiligung an zahlreichen Herzerkrankungen von großem Interesse. Studien haben gezeigt, dass die Stimulation der Angiogenese für ischämisches und infarziertes Myokardgewebe von Vorteil sein kann (Zhao et al. 2010), während eine Beeinträchtigung der Angiogenese kardiale Reparaturmechanismen verzögern und eine insuffiziente Narbenbildung verursachen kann (Barandon et al. 2004).

Der kardiale Angiogeneseassay (CAA) ist, ähnlich wie der ARA, ein dreidimensionales *ex vivo*-Modell, bei welchem linksventrikuläres Mäusemyokard in eine Kollagenmatrix eingebettet wird. Auch hier kommt es unter bestimmten Kultivierungsbedingungen zum Aussprossen von Zellen (kardiales Sprouting), welche sich zu neuen Blutgefäßen formieren. Auch anhand dieses Assays lassen sich VW-SCs genauer analysieren, die nicht nur an der Angiogenese beteiligt sind, sondern sich teilweise auch zu nicht-vaskulären Zellen differenzieren (Zengin et al. 2006; Campagnolo et al. 2010; Ergun, Tilki, and Klein 2011; Krautler et al. 2012; Vono et al. 2012; Worsdorfer et al. 2017; Mekala et al. 2018).

1.5 Zielsetzung

Der Myokardinfarkt zählt in den Industrieländern zu einer der häufigsten Todesursachen. Das adulte menschliche Herz stellt aufgrund seiner äußerst eingeschränkten endogenen Regenerationskapazität nach Infarkten bzw. Schädigungen ein ideales Ziel für regenerative Interventionen dar. Trotz einiger Fortschritte in der kardioregenerativen Medizin kam es bislang noch zu keinem Durchbruch bei der regenerativen Therapie myokardialer Defekte. Die Identifizierung neuer endogener Stammzellen mit kardiogenem Potenzial und die Möglichkeit, deren Differenzierung gezielt zu steuern, würde einen Meilenstein in der kardioregenerativen Stammzelltherapie darstellen. Eine mögliche Quelle solcher Stammzellen stellt die vaskuläre Adventitia dar. In den letzten zwei Jahrzehnten konnten in der Gefäßwand, insb. in der vaskulären Adventitia, unterschiedliche Typen von Stamm- und Vorläuferzellen identifiziert werden, die sog. Gefäßwand-residenten Stammzellen (VW-SCs). Unter Anbetracht der Tatsache, dass Blutgefäße aufgrund ihrer hohen Dichte im Herzen eine essenzielle Komponente des Myokards darstellen, kann die klinische Relevanz von VW-SCs als mögliches angiogenes und kardiogenes Stammzellreservoir im Moment nur erahnt werden. Und tatsächlich gelang es der Arbeitsgruppe von Prof. Ergün aus VW-SCs der Aorta adulter Mäuse innerhalb weniger Tage und ohne jegliche genetische Manipulation reife, spontan schlagende und funktionelle Kardiomyozyten zu generieren. Zusätzlich fungiert die Gefäßwand als Quelle inflammatorischer Zellen, die essenziell für die kardiogene Differenzierung der VW-SCs zu sein scheinen.

Ziel dieses Forschungsvorhabens war es, das Proliferations- und Differenzierungsverhalten von CD44⁺CD31⁻CD34⁻ VW-SCs zu untersuchen, um herauszufinden, inwieweit dieser Stammzelltyp eine endogene Generierung funktioneller Kardiomyozyten unterstützen könnte. Insbesondere standen dabei folgende Fragestellungen im Mittelpunkt der Arbeit:

1. Kommt es *in vivo* zu einem Anstieg von CD44⁺ Zellen in ischämischen Arealen infarzierter Mäuseherzen?

2. Welchen Einfluss hat die Sauerstoffkonzentration *in vitro* im ARA und im CAA auf das aortale bzw. kardiale Sprouting und inwieweit wird dadurch das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der CD44⁺ VW-SCs beeinflusst?
3. Sind CD44⁺ Zellen teilungsfähig?
4. Haben CD44⁺ Zellen das Potenzial sich zu immunmodulatorischen Zellen zu differenzieren?
5. Wie wirkt sich eine Behandlung mit dem proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF-A bzw. mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lenvatinib im CAA auf das kardiale Sprouting und die Proliferation der CD44⁺ Zellen aus?
6. Welchen Einfluss hat eine Makrophagendepletion mittels Clodronatliposomen auf das kardiale Sprouting und die Proliferation der CD44⁺ Zellen im CAA?
7. Hat die Aktivierung bzw. Inhibierung des Wnt-Signalwegs einen Einfluss auf das kardiale Sprouting und die Proliferation der CD44⁺ Zellen im CAA?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

- CO₂-Inkubatore (Heracell 150i und 240i), Thermo Fisher Scientific Inc.
- Digitale Präzisionswaage, Kern & Sohn GmbH
- Durchlichtmikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH
- Einbettungsautomat (Leica TP1020), Leica Biosystems GmbH
- Keyence BZ-9000 (Bioevo), Keyence Corporation
- Konfokales Mikroskop, Leica Biosystems GmbH
- Kühlplatte (EG1150 C), Leica Biosystems GmbH
- Kühlschrank 4 °C, Siemens AG
- Magnetrührer (MR-2000), Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- Makroskop (Leica/Wild M420), Leica Biosystems GmbH
- Mikrowelle, Panasonic Corporation
- Mikrozentrifuge (Mikro 20), Andreas Hettich GmbH & Co.KG
- pH-Meter, A. Hartenstein GmbH
- Schlittenmikrotom, Leica Biosystems GmbH
- Schüttelplattform, A. Hartenstein GmbH
- Tiefkühlschrank -20 °C, Siemens AG
- Vortexmischer (Reagenzglasschüttler), Bender & Hobein AG
- Wärmeschrank 37 °C, Memmert GmbH & Co. KG
- Wasserbad 40 °C, Gesellschaft für Labortechnik mbH

2.1.2 Kommerzielle Laborprodukte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- 10 % D-Glukose wasserfrei, AppliChem GmbH
- 48- und 96-well-Platten (MicroAmp), Thermo Fisher Scientific Inc.
- ABC-Kit (VECTASTAIN), Vector Laboratories Inc.

- Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus), Gerhard Menzel GmbH
- Aluminiumsulfat, Riedel-de Haën AG
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl), Sigma-Aldrich Corporation
- Anatomisches Präparierbesteck, Carl Roth GmbH + Co. KG
- Bovines Serumalbumin (BSA), Sigma-Aldrich Corporation
- CHIR-99021, Axon Medchem B.V.
- Clodronatliposomen, Liposoma B.V.
- DAB (3,3'-Diaminobenzidin), Sigma-Aldrich Corporation
- DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol), F. Hoffmann-La Roche AG
- Destilliertes Wasser (dH₂O), B. Braun Melsungen AG
- Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄), AppliChem GmbH
- DMEM (Medium), Thermo Fisher Scientific Inc.
- Einbettungskassetten, Sarstedt AG & Co.
- Eindeckgläser, 24x40 und 24x50 mm, A. Hartenstein GmbH
- Eindeckmittel (DePeX), Serva Electrophoresis GmbH
- Einwegskalpelle, B. Braun Melsungen AG
- Eppendorf Reaktionsgefäße, Sarstedt AG & Co.
- Erlenmeyerkolben 100 ml, A. Hartenstein GmbH
- Ethanol Sorte 642 mind. 99,8 %, Nordbrand Nordhausen GmbH
- Ethanol Sorte 641 mind. 96,0 %, Nordbrand Nordhausen GmbH
- Ethanol 80 % und 70 %, Verdünnung aus 100 % Ethanol
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), AppliChem GmbH
- Fetales Kälberserum 10 % (10 % FCS), Valley Biomedical
- Glukose-Oxidase Typ VII (GOD), Sigma-Aldrich Corporation
- IWR-1, Sigma-Aldrich Corporation
- Kaliumchlorid (KCl), AppliChem GmbH
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), AppliChem GmbH
- Kernechtrot, Merck Chemicals GmbH
- Kollagen (PureCol), CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH
- Lenvatinib (E7080), Kooperation (UKW)

- L-Glutamin, Sigma-Aldrich Corporation
- MEM („Minimum Essential Medium“), Sigma-Aldrich Corporation
- Mowiol, Sigma-Aldrich Corporation
- Natriumbikarbonat (NaHCO_3), Sigma-Aldrich Corporation
- Natriumchlorid (NaCl), AppliChem GmbH
- Natriumhydroxid pH 7,4-7,5 (NaOH), AppliChem GmbH
- Natriumpyruvat, Life Technologies AG
- Nickel(II)-sulfat (NiSO_4), Merck Chemicals GmbH
- Normales Ziegenserum (NGS), Sigma-Aldrich Corporation
- Paraffin (Histosec Pastillen), Merck Chemicals GmbH
- Paraformaldehyd (PFA), Carl Roth GmbH + Co. KG
- PBS-Kontrollliposomen, Liposoma B.V.
- PDGF-BB, PeproTech
- Penicillin/Streptomycin, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Petrischalen, Sarstedt AG & Co.
- Pipetten (0,5-10, 10-100 & 100-1000 μl), Eppendorf AG
- Pipettenspitzen (20, 200 & 1000 μl), Sarstedt AG & Co.
- Salzsäure (HCl), AppliChem GmbH
- Trinatriumcitrat-Dihydrat, AppliChem GmbH
- VEGF-A, Sigma-Aldrich Corporation
- Verschlussfolie (Parafilm), Pechiney Plastic Packaging Inc.
- Vollentsalztes Wasser (dH_2O), Institut für Anatomie und Zellbiologie
- Wasserstoffperoxid (H_2O_2), AppliChem GmbH
- Xylol, Merck Chemicals GmbH
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (Falcon), Thermo Fisher Scientific Inc.
- Zitronensäure, AppliChem GmbH

2.1.3 Puffer und Lösungen

- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) → pH 7,2-7,4:
 - 40,03 g NaCl
 - 1 g KCl
 - 8,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 1 g KH_2PO_4
 - auffüllen auf 5 L mit dH_2O
- 0,1 M Phosphatpuffer (PB-Puffer) → pH 7,4:
 - 4,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 29,2 g KH_2PO_4
 - auffüllen auf 2 L mit dH_2O
 - ggf. pH-Korrektur mit 5N HCl
- 10 mM Natriumcitratpuffer → pH 7,4:
 - 18 ml 0,1 M Zitronensäure
 - 82 ml 0,1 Trinatriumcitrat-Dihydrat
 - auffüllen auf 1 L mit dH_2O
 - ggf. pH-Korrektur mit 1N NaOH
- DAB-Entwicklungslösung:
 - 67,5 ml PB-Puffer
 - 1350 μl $\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{dH}_2\text{O}$
 - 1350 μl 10 % D-Glucose
 - 150 μl NH_4Cl
 - 1,5 ml DAB
 - 225 μl GOD
- 0,1 % Kernechtrot:
 - 0,2 g Kernechtrot
 - 1 g Aluminiumsulfat
 - 200 ml dH_2O

2.1.4 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden Wildtyp-Mäuse (Mausstamm C57BL/6J, kurz: B6) aus der Tierhaltung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin (ZEMM) der Universität Würzburg verwendet. Dabei wurde auf ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Männchen und Weibchen geachtet. Für die Tierversuche wurde ein entsprechender Tierversuchsantrag gestellt und genehmigt (AZ55.2-2531.01-15/13, kurz: 15/13).

2.1.5 Primärantikörper

- Ratte α -Maus CD44 (103002), BioLegend
- Kaninchen α -Maus F4/80 (ab111101), Abcam
- Kaninchen α -Maus IL-10 (orb10892), Biorbyt
- Kaninchen α -Maus iNOS (ab15323), Abcam
- Kaninchen α -Maus Ki-67 (ab16667), Abcam

2.1.6 Sekundärantikörper

- Ziege α -Ratte Biotin (BA9400), Vector Laboratories Inc.
- Ziege α -Kaninchen Biotin (BA1000), Vector Laboratories Inc.
- Ziege α -Ratte Alexa Fluor 647, Jackson ImmunoResearch

2.1.7 Computerprogramme

- Adobe Photoshop CS2, Adobe Systems Incorporated
- BZ-II Bildanalyse-Software [BZ-H2AE], Keyence Corporation
- EndNote, Clarivate Analytics
- ImageJ, Wayne Rasband (NIH)
- Microsoft Excel 2010, Microsoft Corporation
- Microsoft PowerPoint 2010, Microsoft Corporation
- Microsoft Word 2012, Microsoft Corporation
- Statistica, StatSoft GmbH

2.2 Methoden

2.2.1 Murine *ex vivo*-Modelle

Der ARA und der CAA dienen der Untersuchung der Angiogenese sowie der Analyse des Proliferations- und Differenzierungsverhaltens der CD44⁺ Zellen *ex vivo*. In beiden Modellen werden die zu untersuchenden Zellen in ihrem Ursprungsgewebe belassen, wodurch man dem *in vivo*-Zustand nahekomen möchte. Außerdem besteht so die Möglichkeit auch komplexere Interaktionen experimentell zu untersuchen.

2.2.1.1 Organentnahme

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation durch einen entsprechend ausgebildeten Labormitarbeiter. Die Tiere wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Anschließend wurde die Haut vor dem Sternum mit einer Pinzette angehoben und mit einem Skalpell vom Thorax entfernt. Nach vollständiger Darstellung des knöchernen Brustkorbs erfolgte die Thorakotomie mittels Durchtrennung der Rippen. Nach der Entfernung der Lungen wurde das Herz mit einer Pinzette geringfügig angehoben und der darunterliegende Ösophagus entfernt. Die thorakale Aorta wurde mit einer Sonde stumpf aus dem Thorax gelöst und im nächsten Schritt 3 mm kranial des Diaphragmas mit einer Präparierschere durchtrennt und gemeinsam mit dem Herzen aus dem Thorax entnommen. Anschließend wurde das murine Aorten- und Herzgewebe in eisgekühltem PBS gelagert, worin auch die weitere Präparation erfolgte.

2.2.1.2 Aortenringassay

Zunächst wurden Aorta und Herz voneinander getrennt. Unter einem Makroskop wurde das periadventitielle Fettgewebe mittels eines Skalpells von der Aorta entfernt. Anschließend wurde das Blutgefäß in ca. 1 mm breite Ringe geschnitten. Im weiteren Verlauf wurden ausschließlich Ringe mit geschlossenem Lumen verwendet. Ein ca. 3 mm breiter Ring wurde in 4 % Paraformaldehyd (PFA), zur Dokumentation des gegenwärtigen Organzustands, fixiert.

2.2.1.3 Kardialer Angiogeneseassay

Zu Beginn der Präparation wurden die beiden Vorhöfe entfernt. Anschließend wurde der linke Ventrikel mittels eines Skalpell durch einen glatten Schnitt vom restlichen Herzgewebe abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde das linksventrikuläre Herzgewebe in ca. 3 mm³ große Stückchen zerkleinert. Zur Dokumentation des gegenwärtigen Organzustandes wurde ein ca. 5 mm³ großes Gewebestückchen in 4 % PFA fixiert.

Die Zerkleinerung des murinen Aorten- und Herzgewebes erfolgte, um eine Kultivierung in 48- bzw. 96-well-Platten zu ermöglichen.

2.2.1.4 Kultivierung des murinen Gewebes

2.2.1.4.1 Einbettung in eine Kollagenmatrix

Das Ansetzen des Kollagengels und die Einbettung des murinen Gewebes erfolgte unter strenger Einhaltung steriler Kautelen. 1 ml Kollagengel setzte sich aus 377 µl dH₂O, 108 µl 10 x MEM, 11 µl L-Glutamin, 11 µl Natriumpyruvat, 431 µl Purecol (Kollagen), 54 µl 7,5 % Natriumbikarbonat, 4 µl Penicillin/Streptomycin und 4 µl NaOH (pH 7,5) zusammen. Die einzelnen Bestandteile wurden in der eben genannten Reihenfolge hinzugefügt. Um eine vorzeitige Auspolymerisation des Kollagengels zu verhindern, wurde dieses stets auf Eis gelagert.

Zur Kultivierung des murinen Gewebes wurden 48- und 96-well-Platten verwendet. In jedes Well wurden 200 µl (48-well-Platten) bzw. 100 µl (96-well-Platten) Kollagengel pipettiert. Durch den Kontakt zwischen Pipettenspitze und Wandung der Wells wurde die Entstehung von Luftblasen vermieden. Anschließend erfolgte die partielle Auspolymerisation des Kollagengels für 45 min in einem Brutschrank bei 37 °C. Als nächstes wurde das murine Aorten- und Herzgewebe auf das Kollagengel überführt und für weitere 10 min im Brutschrank inkubiert. Schließlich wurden weitere 200 µl (48-well-Platten) bzw. 100 µl (96-well-Platten) Kollagengel in die Wells pipettiert. Mit einer Pipettenspitze wurde die Adhärenz zwischen Kollagengel und Wandung des Wells hergestellt. Nach dem Gießen der zweiten Lage erfolgte die vollständige Auspolymerisation des Kollagengels für 120 min im Brutschrank.

2.2.1.4.2 Ansetzen des Standardmediums

10 ml Standardmedium zur Kultivierung der Aortenringe setzten sich aus 1 ml 10 % FCS und 9 ml DMEM (mit 5 % Penicillin/Streptomycin) zusammen. Das Standardmedium zur Kultivierung des Herzgewebes enthielt zusätzlich PDGF-BB und 10 ml bestanden aus 495 µl 10 % FCS, 9,5 ml DMEM (mit 5 % Penicillin/Streptomycin) und 1 µl PDGF-BB.

2.2.1.4.3 Kultivierungsdauer und -bedingungen

Das in Kollagengel eingebettete murine Aorten- und Herzgewebe wurde anschließend für drei, sieben und 14 Tage, jeweils unter Normoxie (21 % O₂) und unter Hypoxie (2 % O₂) kultiviert. Die hypoxische Kultivierung sollte dabei einen ischämischen Zustand, wie er bspw. nach einem Myokardinfarkt vorliegt, simulieren. Das Medium wurde dreimal wöchentlich, also im Abstand von zwei bzw. drei Tagen, unter strenger Einhaltung steriler Kautelen gewechselt. Nach drei Tagen Inkubation wurden die ersten, nach insgesamt sieben Tagen die nächsten und schließlich nach 14 Tagen die letzten Platten aus den Brutschränken entnommen. Nachdem das Medium abpipettiert wurde, wurden die Wells mit 300 µl (48-well-Platten) bzw. 100 µl (96-well-Platten) 4 % PFA aufgefüllt. Nach der Fixierung in PFA wurde das Gewebe in fünffacher Vergrößerung zur Quantifizierung des Sproutings fotografisch dokumentiert.

2.2.1.4.4 Behandlung des murinen Gewebes mit ausgewählten Faktoren

Das Standardmedium, welches für den CAA verwendet wurde, wurde in einigen Versuchen durch ausgewählte Faktoren ergänzt, um deren Einfluss auf das kardiale Gewebe zu untersuchen. Die Kultivierung erfolgte dabei ausschließlich unter Hypoxie und unter Verwendung von 96-well-Platten.

Ein Teil des Gewebes diente als Kontrolle und wurde daher ausschließlich mit dem Standardmedium versorgt. Ein weiterer Teil des Gewebes wurde mit VEGF-A bzw. mit VEGF-A und zusätzlich Lenvatinib (E7080) behandelt. Der proangiogene Faktor VEGF-A kam in einer Konzentration von 50 ng/ml und der angiogenesehemmende Faktor E7080 in einer Konzentration von 10 µM zum Einsatz.

Der Einfluss von Makrophagen wurde durch den Einsatz von Clodronatliposomen bzw. PBS-Kontrollliposomen untersucht. Diese wurden dem Standardmedium jeweils in einer Konzentration von 100 $\mu\text{l/ml}$ beigelegt.

Zur Untersuchung der Bedeutung des Wnt-Signalwegs, welcher unter anderem einen regulatorischen Einfluss auf die Embryonalentwicklung sowie die Differenzierung und Teilung von Zellen hat, wurde CHIR-99021 und IWR-1 in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. CHIR-99021, ein Aktivator des Signalwegs, kam dabei in einer Konzentration von 4 und 8 μM und IWR-1, ein Signalweginhibitor, in einer Konzentration von 5 und 10 μM zum Einsatz.

2.2.2 Immunhistochemische Färbemethoden

2.2.2.1 Einbettung des kultivierten Gewebes in Paraffin

Nach Abschluss der Kultivierung und anschließender Fixierung in 4 % PFA für 24 h wurde das murine Gewebe von den 48- bzw. 96-well-Platten in Einbettungskassetten überführt. Die Auswaschung des Fixierungsmittels erfolgte für dreimal 60 min in 70 % Ethanol bei Raumtemperatur (RT) auf der Schüttelplattform.

Die weiteren Schritte erfolgten mittels Tauchprinzip durch einen Einbettungsautomaten (Leica TP1020). Hierbei befanden sich die Einbettungskassetten in einem Korb, welcher vom Automaten innerhalb der unterschiedlichen Medien auf- und ab bewegt wurde. Nach einer zuvor festgelegten Zeit wurde der Korb von dem Gerät vollständig aus einem Behälter gehoben und zum nächsten befördert. Der Einbettungsautomat umfasste insgesamt 12 Behälter mit unterschiedlichen Medien. Zur Anfertigung dünner und gleichmäßiger Schnitte musste das murine Gewebe mit einem Einbettungsmedium durchtränkt werden, welches in eine feste und schneidbare Konsistenz übergehen würde. Als Einbettungsmedium diente dabei Paraffin. Da Paraffin eine wasserabstoßende Substanz ist, musste das Gewebe zunächst entwässert werden. Die Entwässerung der Präparate erfolgte schrittweise in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration. Hierbei wurde das Gewebe für zweimal 30 min in 70 % Ethanol, für jeweils 60 min in 80 % und 96 % Ethanol und schließlich für dreimal 60 min

in 100 % Ethanol gewaschen. Nach dieser aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate in Xylol überführt. Xylol war hierbei das Intermedium zwischen Alkohol und Paraffin, da es den Alkohol aus den Präparaten entfernt und gleichzeitig als Lösungsmittel für das Paraffin dient. Hierbei wurden die Präparate für dreimal 60 min in 100 % Xylol getränkt. Im nächsten Schritt wurde der Korb mit den Präparaten vom Gerät in das Einbettungsmedium überführt. Das Paraffin wurde dabei mittels eines Thermostats und einer elektrischen Heizung bei 60 °C zum Schmelzen gebracht. Die Präparate in den Einbettungskassetten wurden für dreimal 180 min in das flüssige Paraffin getaucht, wodurch das Einbettungsmedium das Gewebe infiltrieren konnte.

An einer Paraffinausgießstation (Bavimed) erfolgte die Einbettung der Präparate in Paraffinblöcke. Hierbei war auf die richtige Orientierung des Gewebes innerhalb der Blöcke zu achten. Zunächst wurde flüssiges Paraffin in die tiefste Aussparung einer Ausgießform aus Edelstahl gefüllt. Diese Aussparung diente später als Anschnittfläche für das Mikrotom. Luftbläschen im flüssigen Paraffin wurden mittels einer heißen Pinzette entfernt. Anschließend wurde das Präparat aus der Einbettungskassette entnommen und mittig in der Ausgießform eingebettet. Die Einbettungskassette, welche später beim Schneiden am Mikrotom als Blockhalterung diente, wurde auf die Ausgießform gelegt und vollständig mit Paraffin aufgefüllt. Die gefüllten Formen wurden auf eine Kühlplatte gestellt und nach ca. 15 min wurde der abgekühlte und feste Paraffinblock aus der Ausgießform entnommen.

2.2.2.2 Schneiden der Paraffinblöcke am Schlittenmikrotom

Zur lichtmikroskopischen Analyse des Gewebes mussten aus den Paraffinblöcken optisch transparente bzw. sehr dünne Schnitte erstellt werden. Zur Herstellung dieser Schnitte mit gleichbleibend geringer Dicke wurde ein Schlittenmikrotom verwendet. Die Objekthalterung des Mikrotoms konnte in verschiedene Ebenen gekippt werden, wodurch das präzise Ausrichten der Gewebeproben ermöglicht wurde. Die zuvor auf einer Kühlplatte gelagerten Blöcke wurden auf dem Schlittenmikrotom durch ein feststehendes Messer hindurchbewegt. Die Schnittdicke betrug dabei 6-10 µm. Mit einem feuchten Pinsel wurden die Schnitte in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt,

worin sie sich strecken konnten und plan wurden. Anschließend wurden jeweils zwei bis drei der Paraffinschnitte auf einen Objektträger (SuperFrost) aufgezogen. Zum Trocknen wurden die Schnitte über Nacht bei 37 °C in einem Wärmeschrank gelagert.

2.2.2.3 DAB-basierende Immunfärbungen

Zunächst wurden die 6-10 µm dicken histologischen Schnittpräparate über eine Xylolreihe entparaffiniert und anschließend über eine absteigende Alkoholreihe gewässert, da die Färbelösungen ebenfalls wässrig sind. Die Schnitte wurden dabei für zweimal 10 min in 100 % Xylol, dann für zweimal 5 min in 100 % Ethanol, anschließend für jeweils 5 min in 96 %, 80 % und 70 % Ethanol und schließlich für 5 min in dH₂O gestellt.

Um eine zu starke Hintergrundfärbung bei der DAB-Entwicklung zu vermeiden, wurden die Gewebeperoxidasen durch einen endogenen Peroxidaseblock mit Wasserstoffperoxid abgesättigt. Dieser Schritt ist jedoch ausschließlich bei der DAB-Färbung notwendig und ist daher bei reinen Immunfluoreszenzfärbungen entfallen. Der endogene Peroxidaseblock erfolgte durch eine 3 % Wasserstoffperoxid-Lösung. Die Inkubation erfolgte für 10 min auf einer Schüttelplattform im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte für zweimal 5 min in dH₂O auf der Schüttelplattform gewaschen.

Durch die Fixierung von Geweben werden Proteine miteinander quervernetzt und teilweise auch modifiziert. Einige Epitope werden dann von ihrem zugehörigen Antikörper nicht mehr erkannt. Daher wird die Antigenität des Proteins durch diesen Fixierungsprozess teilweise oder ganz zerstört. Die Quervernetzungen (Maskierungen) können durch die Antigendemaskierung zum Teil wieder rückgängig gemacht werden. Je nach Antigen erfolgte die Demaskierung in einem sauren oder einem basischen Demaskierungspuffer. Dabei kam entweder 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0) oder 10 mM Tris EDTA (pH 9,0) zum Einsatz. Die Schnitte wurden dabei im jeweiligen Puffer in der Mikrowelle für 6-20 min erhitzt, wobei sich die Dauer ebenfalls nach dem entsprechenden Antigen richtet hat. Nach dem Erhitzen wurden die Schnitte in der Pufferlösung bei Raumtemperatur abgekühlt und anschließend wurde der Puffer über

10 min durch fließendes dH₂O ersetzt. Schließlich wurden die Schnitte für dreimal 5 min in PBS auf der Schüttelplattform gewaschen.

Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper binden teilweise an unspezifischen Bindungsstellen im Gewebe, wodurch es zu einer verstärkten Hintergrundfärbung kommen kann. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Normalserum blockiert. Hierfür wurde 5 % NGS/PBS verwendet, da dieses Serum und die verwendeten Sekundärantikörper aus derselben Spezies gewonnen wurden. Die Inkubation erfolgte für 90 min in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur.

Der Primärantikörper wurde in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS verdünnt. Die Einsatzkonzentration der Antikörper hat dabei, je nach gesuchtem Antigen, variiert. Die Inkubation erfolgte über mindestens 12 h in einer feuchten Dunkelkammer im Kühlschrank bei 4 °C. Auf jedem Objektträger befand sich ein Gewebeschnitt ohne Primärantikörper als Negativkontrolle. So konnte bei der Auswertung der Färbungen ausgeschlossen werden, dass der Sekundärantikörper direkt an antigenen Strukturen im Gewebe gebunden hat. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper mit PBS aus einer Pasteurpipette von den Objektträgern heruntergespült. Anschließend wurden die Schnitte für dreimal 5 min auf der Schüttelplattform in PBS gewaschen.

Der Sekundärantikörper wurde in 1 % NGS/PBS verdünnt, wobei die Einsatzkonzentration entsprechend des gesuchten Antigens variierte. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 min in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur. Je nachdem aus welcher Spezies der verwendete Primärantikörper stammte, kam als Sekundärantikörper Ziege α -Ratte Biotin bzw. Ziege α -Kaninchen Biotin zum Einsatz.

Anschließend wurden die Gewebepreparate mit dem Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex) inkubiert. Der Komplex wurde ca. 30 min zuvor angesetzt und im Dunkeln bei RT gelagert. Die Einsatzkonzentration von Avidin und Biotin variierte je nach verwendetem Primärantikörper. Die Verdünnung der beiden Substanzen erfolgte in PBS. Der aus Avidin und Biotin gebildete Komplex bindet an den biotinylierten

Sekundärantikörpern. Im Vergleich zur einfachen Immunmarkierung erhält man über den AB-Komplex ein um ein Vielfaches verstärktes Signal. Da diese Methode sehr sensitiv ist, konnten auch geringe Antigenmengen im Präparat detektiert werden. Darüber hinaus ließ sich auf diese Weise die Antikörperkonzentration stark herabsetzen, wodurch eine unspezifische Färbung des Gewebes reduziert bzw. vermieden werden konnte.

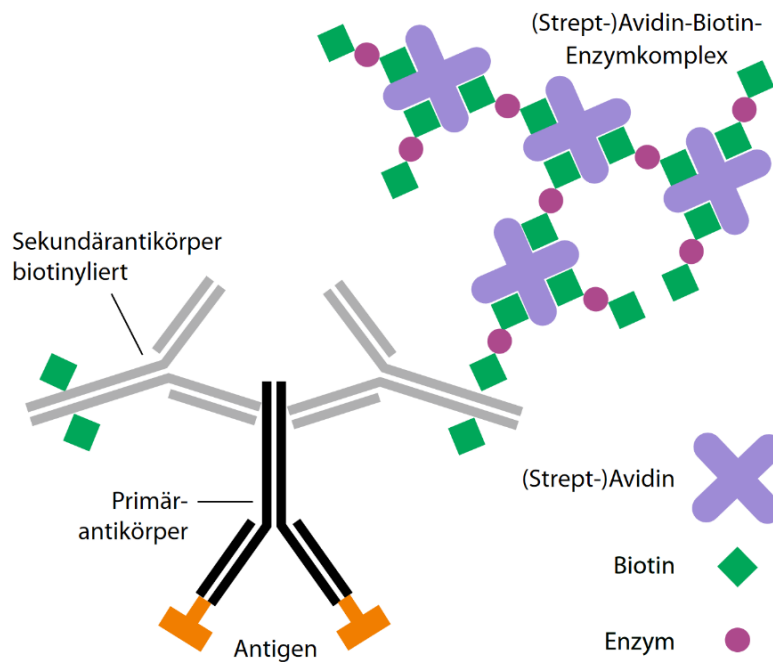


Abbildung 2: Schema der ABC-Technik

Quelle: Mulisch M. (2015) Immunlokalisation. In: Mulisch M., Welsch U. (eds) Romeis - Mikroskopische Technik. Mit freundlicher Erlaubnis von Springer Nature.

Da die Salze im PBS die DAB-Reaktion behindern würden, wurden die Schnitte vor der Entwicklung zweimal für 5 min in PB-Puffer (0,1 M, pH 7,4) gewaschen. Die DAB-Entwicklungslösung wurde lichtgeschützt in einer Hellendahl-Küvette angesetzt und setzte sich aus 67,5 ml PB-Puffer, 1350 µl Nickelsulfat, 1350 µl Glukose (10 %), 150 µl Ammoniumchlorid und 1,5 ml DAB zusammen. Einige Sekunden vor der Entwicklung wurde der Entwicklungslösung 225 µl Glukose-Oxidase beigesetzt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt wurde. Die Entwicklung dauerte, je nach verwendetem Antikörper, 15-25 min. Durch das Überführen der Schnitte in PBS wurde die Reaktion abgestoppt.

Anschließend wurden die Schnitte für dreimal 3 min in PBS und für 1 min in dH₂O auf der Schüttelplattform gewaschen und schließlich für 1 min mit 0,1 % Kernechtrot

gegengefärbt. Im nächsten Schritt erfolgte die Dehydrierung der Schnitte mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Objektträger wurden dabei für jeweils 1 min in 70 %, 80 % und 96 % Ethanol, anschließend für zweimal 3 min in 100 % Ethanol und schließlich für zweimal 5 min in 100 % Xylol gestellt. Nach der Entwässerung erfolgte die Eindeckung der Schnitte mit DePeX, einem Eindeckmittel.

2.2.2.4 Doppelimmunfärbungen

Zur Untersuchung von Koloalisationen bestimmter Antigene wurden Doppelimmunfärbungen durchgeführt. Dies diente bspw. der Analyse des Differenzierungspotenzials der CD44⁺ Zellen. Zunächst wurde die Kombination zweier Immunfluoreszenzfärbungen ausprobiert. Da Erythrozyten bzw. das myokardiale Gewebe im Bereich der Anregungs- und Emissionswellenlänge von Cy2 bzw. Cy3 eine starke Eigenfluoreszenz zeigten, wurde für alle weiteren Doppelfärbungen eine Kombination aus DAB- und Immunfluoreszenzfärbung (Cy5) durchgeführt, wobei stets mit der DAB-Färbung begonnen wurde. Bis zum Abstoppen der DAB-Reaktion war der Ablauf der Einzel- und Doppelfärbung daher absolut identisch. Nach diesem ersten Teil der Doppelimmunfärbung wurden die Schnitte für dreimal 3 min in PBS auf der Schüttelplattform gewaschen.

Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen erneut mit 5 % NGS/PBS blockiert. Hierfür kam normales Ziegen Serum zum Einsatz, da der als zweites verwendete Sekundärantikörper ebenfalls aus der Ziege gewonnen wurde. Die Inkubation erfolgte für 60 min in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur.

Der als zweites verwendete Primärantikörper wurde in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS verdünnt. Die Einsatzkonzentration der Antikörper hat dabei, je nach gesuchtem Antigen, variiert. Die Inkubation erfolgte über mindestens 12 h in einer feuchten Dunkelkammer und in einem Kühlschrank bei 4 °C. Weiterhin diente einer der Gewebeschnitte auf jedem Objektträger als Negativkontrolle und wurde ohne Primärantikörper belassen. Nach der Inkubation wurde der Primärantikörper mit PBS aus einer Pasteurpipette von den Objektträgern heruntergespült. Anschließend wurden die Schnitte für dreimal 5 min auf der Schüttelplattform in PBS gewaschen.

Auch der als zweites verwendete Sekundärantikörper wurde in 1 % NGS/PBS verdünnt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 min in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur.

Die Kernfärbung erfolgte bei den Doppelimmunfärbungen mit DAPI für 10 min in einer feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger für fünfmal 3 min in PBS und ca. 1 min in dH₂O auf der Schüttelplattform gewaschen. Die Eindeckung der Gewebepreparate erfolgte unter Verwendung von Mowiol, einem wasserlöslichen Einschlussmittel.

2.2.2.5 Einsatz der Antikörper bei den immunhistochemischen Färbungen

Bei den immunhistochemischen Färbungen kamen CD44-, F4/80-, IL-10-, iNOS- und Ki-67-Antikörper zum Einsatz. CD44 ist ein Glykoprotein, welches unter anderem auf der Zelloberfläche einiger VW-SCs exprimiert wird. F4/80 ist ein gängiger Marker für reife, murine Makrophagen. Bei IL-10 handelt es sich um ein entzündungshemmendes Zytokin, welches anti-inflammatorische Immunzellen markiert. Die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) dient der Immunabwehr und wird als Marker pro-inflammatorischer Makrophagen eingesetzt. Ki-67 ist ein Protein, das zur Markierung proliferierender Zellen geeignet ist.

Bei allen verwendeten Antikörpern handelte es sich um anti-Maus-Immunglobuline. Der CD44-Antikörper wurde aus dem Serum von immunisierten Ratten gewonnen, während die anderen Antikörper im Kaninchen hergestellt wurden. Bei der Auswahl des Primärantikörpers ist stets darauf zu achten, dass dieser nicht aus dem Serum der Spezies stammt, aus der auch das zu färbende Gewebe entnommen wurde, da der Sekundärantikörper ansonsten an den endogenen Immunglobulinen des Präparats binden würde und damit ein stark gefärbter, unspezifischer Hintergrund entstünde.

Die Antikörper kamen in unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz und wurden in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS verdünnt. Bei der DAB-Färbung betrug die Einsatzkonzentration des CD44-Antikörpers 1:300, die des F4/80- und iNOS-Antikörpers 1:50 und die des IL-10- und Ki-67-Antikörpers 1:100. Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde der CD44-Antikörper im Verhältnis 1:50 in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS verdünnt. Die Demaskierung

erfolgte für 6 min in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle. Ausschließlich bei der Demaskierung von F4/80 wurden die Präparate für 18 min erhitzt, da so eine Verstärkung der Färbung erzeugt werden konnte. Bei Färbungen auf das Glykoprotein CD44 wurde Ziege α -Ratte Biotin in der Einsatzkonzentration 1:250 verwendet. Bei den Färbungen mit den anderen Primärantikörpern kam Ziege α -Kaninchen Biotin in der Konzentration 1:250 (F4/80 und Ki-67) bzw. in der Konzentration 1:100 (IL-10 und iNOS) zum Einsatz. Die Sekundärantikörper wurden stets in 1 % NGS/PBS verdünnt. Die Einsatzkonzentration des AB-Komplexes betrug 1:250 (CD44 und F4/80) bzw. 1:100 (IL-10, iNOS und Ki-67). Die DAB-Entwicklung wurde abgestoppt, nachdem eine kräftige spezifische Färbung zu sehen war und noch bevor eine unspezifische Färbung des Hintergrunds erfolgte. Die Entwicklungsdauer variierte je nach verwendetem Antikörper und betrug 10 min (IL-10), 15 min (CD44 und iNOS), 20 min (F4/80) bzw. 25 min (Ki-67).

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde der CD44-Antikörper in der Einsatzkonzentration 1:50 verwendet. Die Verdünnung erfolgte ebenfalls in 1 % NGS/0,2 % BSA/PBS. Als Sekundärantikörper kam der Farbstoff Alexa Fluor 647, der im Verhältnis 1:200 mit 1 % NGS/PBS verdünnt wurde, zum Einsatz.

1. AK	Verdünnung	Demaskierung	2. AK	Verdünnung	AB-Komplex	DAB-Entwicklung
Ratte α -Maus CD44	1:300	basische Demaskierung für 6 min	Ziege α -Ratte Biotin	1:250	1:250	15 min
Kaninchen α -Maus F4/80	1:50	basische Demaskierung für 18 min	Ziege α -Kaninchen Biotin	1:250	1:250	20 min
Kaninchen α -Maus IL-10	1:100	basische Demaskierung für 6 min	Ziege α -Kaninchen Biotin	1:100	1:100	10 min
Kaninchen α -Maus iNOS	1:50	basische Demaskierung für 6 min	Ziege α -Kaninchen Biotin	1:100	1:100	15 min
Kaninchen α -Maus Ki-67	1:100	basische Demaskierung für 6 min	Ziege α -Kaninchen Biotin	1:250	1:100	25 min

Table 1: Einsatz der Antikörper bei DAB-Färbungen

1. AK	Verdünnung	Demaskierung	2. AK	Verdünnung
Ratte α -Maus CD44	1:50	basische Demaskierung für 6 min	Alexa Fluor 647	1:200

Table 2: Einsatz der Antikörper bei Immunfluoreszenzfärbungen

2.2.3 Quantifizierung

2.2.3.1 Quantifizierung des Sproutings

Nach Abschluss der Kultivierung wurde das murine Gewebe innerhalb der 48- bzw. 96-well-Platten bei fünffacher Vergrößerung abfotografiert. Die Quantifizierung des aortalen und kardialen Sproutings erfolgte anhand dieser Fotos mittels ImageJ.

Beim ARA wurde die Reichweite der aussprossenden Zellen mit dem Pfeilwerkzeug (arrow tool) eingezeichnet und ausgemessen (Strg+M). Die Ausdehnung des Sproutings wurde aus der durchschnittlichen Länge von acht Pfeilen berechnet und in μm angegeben. Der Winkel zwischen den einzelnen Pfeilen betrug jeweils 45° .

Die Quantifizierung des kardialen Sproutings erfolgte mittels Polygonauswahl (polygon selection). Dabei wurde jeweils ein Polygon um das murine Herzgewebe und eines um das Areal, bestehend aus den aussprossenden Zellen, eingezeichnet. Im nächsten Schritt wurde die Fläche der beiden Vielecke berechnet (Strg+M). Anschließend wurde der Quotient aus den beiden Flächen gebildet und als dimensionslose Größe angegeben.

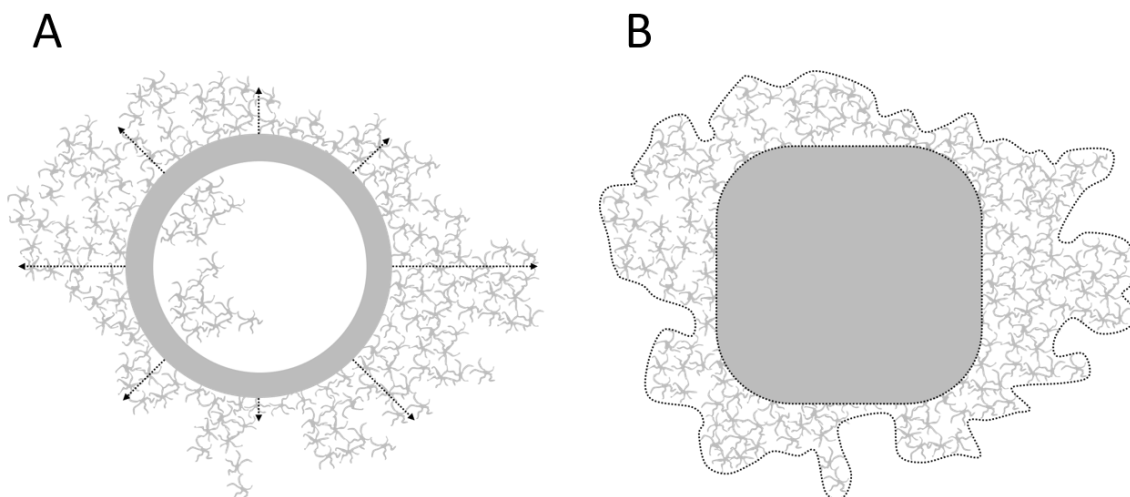


Abbildung 3: Quantifizierung des Sproutings im ARA (A) und im CAA (B)

Quelle: Eigene Darstellung.

2.2.3.2 Quantifizierung der immunhistochemischen Färbungen

Die gefärbten Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-9000) in unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen. DAB-Färbungen wurden durch

hellfeldmikroskopische Aufnahmen dokumentiert, während zur Darstellung der Immunfluoreszenz- und Kernfärbungen fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen im Bereich der Wellenlängen von Cy5 und DAPI erstellt wurden. Durch die Fusion der hellfeldmikroskopischen und der beiden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten Kollokalisierungen von Antigenen dargestellt werden.

Die Auszählung einfachpositiver Zellen erfolgte anhand der hellfeld- bzw. fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung mittels ImageJ. Zunächst wurde die Farbtiefe der Bilder auf 16-Bit-Graustufen reduziert. Anschließend wurde durch die Schwellenwertfunktion ein schwarzweißes Binärbild erzeugt. Der Schwellenwert (threshold) wurde dabei so gewählt, dass sich positive Zellen schwarz und das restliche Gewebe weiß darstellte. Zur Objektivierung wurde während der gesamten Quantifizierung einer Färbung exakt derselbe Schwellenwert verwendet. Im nächsten Schritt erfolgte die automatische Auszählung der schwarzen Partikel (analyze particles). Die Anzahl der Partikel wurde in Relation zur Größe des Präparats gesetzt. Hierzu musste die Fläche des gefärbten Gewebes mittels einer Polygonauswahl (polygon selection) umrandet und berechnet werden.

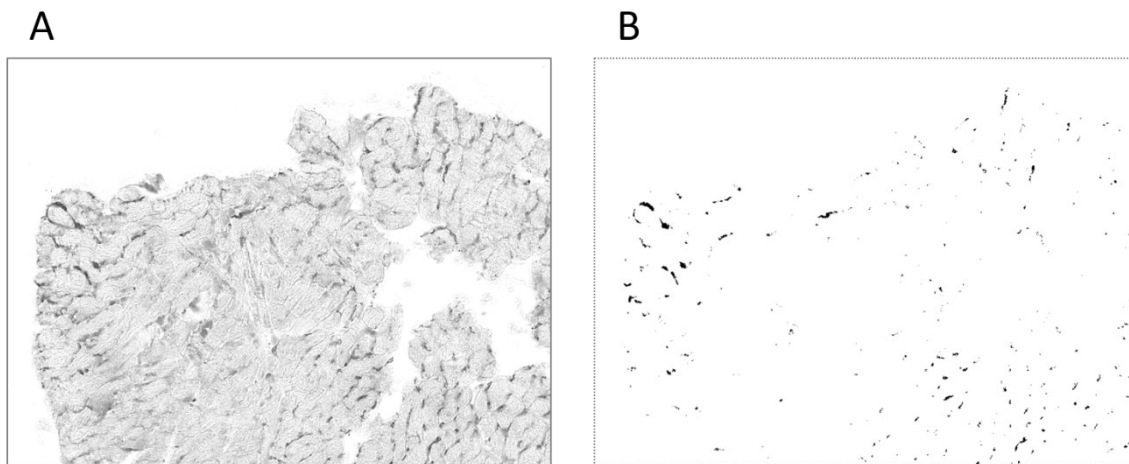


Abbildung 4: Quantifizierung positiver Zellen

Hellfeldmikroskopische Aufnahme (A) und Binärbild (B). Anhand des schwarzweißen Binärbildes erfolgte die automatische Auszählung positiver Zellen.

Die Quantifizierung doppelpositiver Zellen erfolgte manuell anhand der aus hellfeld- und lichtmikroskopischen Aufnahmen erstellten Fusionsbilder.

3. Ergebnisse

Die Eigenschaften der CD44⁺ VW-SCs wurden in den folgenden Experimenten an infarzierten Mäuseherzen sowie im ARA und im CAA untersucht. Die Proliferation mesenchymaler Stammzellen im frühen postischämischen Myokard konnte in Studien bereits nachgewiesen werden (Klopsch et al. 2017). Die folgenden Experimente sollten den Einfluss von Sauerstoff auf CD44-exprimierende Zellen sowie deren Proliferations- und Differenzierungspotenzial näher untersuchen.

3.1 Hypoxie induziert das aortale und kardiale Sprouting *ex vivo*

Das murine Aorten- und Herzgewebe wurde im ARA und CAA sowohl unter Normoxie (21 % Sauerstoff) als auch unter Hypoxie (2 % Sauerstoff) für jeweils drei, sieben und 14 Tage kultiviert. Anschließend wurde das Ausmaß des Sproutings quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen das aortale und kardiale Sprouting induziert. Dieser Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie deutete sich bereits nach dreitägiger Kultivierung an, während er nach 14-tägiger Kultivierung hochsignifikant wurde (p -Wert im doppelten t -Test $< 0,05$ im ARA bzw. $< 0,001$ im CAA).

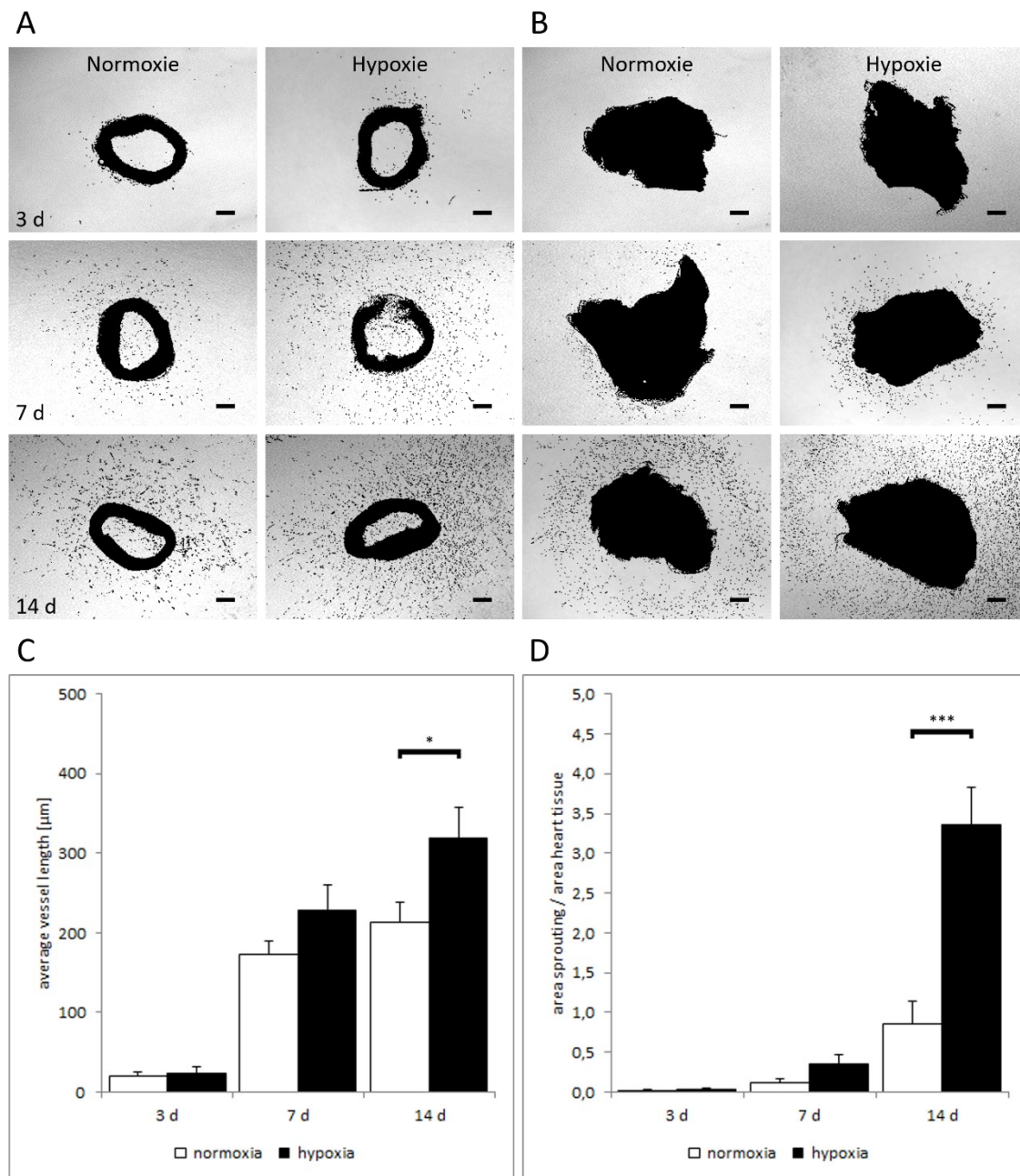


Abbildung 5: Sprouting im ARA und im CAA unter Normoxie und Hypoxie

Aussprossen von Zellen im ARA (A) und im CAA (B), jeweils unter normoxischen und hypoxischen Kultivierungsbedingungen. Bereits nach dreitägiger Kultivierung zeigten sich vereinzelt aussprossende Zellen. Auffallend ist das stärkere Sprouting unter Hypoxie, sowohl im ARA als auch im CAA. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm. Die Diagramme (C und D) zeigen das quantitative Ergebnis des aortalen (C) und des kardialen (D) Sproutings. Nach 14 Tagen zeigte sich unter hypoxischer Kultivierung im Vergleich zur Kultivierung unter normoxischen Bedingungen ein signifikant stärkeres Aussprossen von Zellen (p -Wert im doppelten t -Test 0,03 im ARA bzw. 0,00015 im CAA). Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N = 14$.

3.2 CD44⁺ Zellen sind proliferationsfähig

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten das Vorkommen von CD44⁺ Zellen in der aortalen Adventitia sowie in der Adventitia kardialer Gefäße und im Subepikardium zeigen. Anhand einer Doppelfärbung auf CD44 (Immunfluoreszenzfärbung) und Ki-67 (DAB-Färbung) sollte die Proliferationsfähigkeit der CD44⁺ Zellen analysiert werden.

3.2.1 Proliferation von CD44⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard

Mittels einer DAB-basierenden Immunfärbung konnte das physiologische Vorkommen von CD44⁺ Zellen in der Adventitia kardialer Gefäße sowie subepikardial gezeigt werden. Färbungen an infarziertem Herzgewebe nach 24-stündiger Ischämiezeit bei einer proximalen Ligatur des Ramus interventricularis anterior zeigten eine deutliche Zunahme dieser Zellen. Die Zunahme dieser Zellen wurde an Herzen mit einer 18- bzw. 72-stündigen Ischämiezeit quantifiziert. Dabei wurde der Infarktbereich, also das Versorgungsgebiet des Ramus interventricularis anterior, mit dem nicht infarzierten Myokard verglichen. Zusätzlich wurde die Anzahl der CD44⁺ Zellen im infarzierten Myokardium der Anzahl derer im normal perfundierten Herzgewebe und in sog. Placebotieren (sham) gegenübergestellt. Bei den Placebotieren wurde ebenfalls eine Thorakotomie durchgeführt, ohne dass dabei eine Koronararterie ligiert wurde. Bei der Quantifizierung zeigte sich bereits nach 18-stündiger Ischämiezeit eine signifikante Zunahme der multipotenten Stammzellen (p -Wert < 0,05). 72 Stunden nach Infarktsetzung war diese Zunahme hochsignifikant (p -Wert < 0,001).

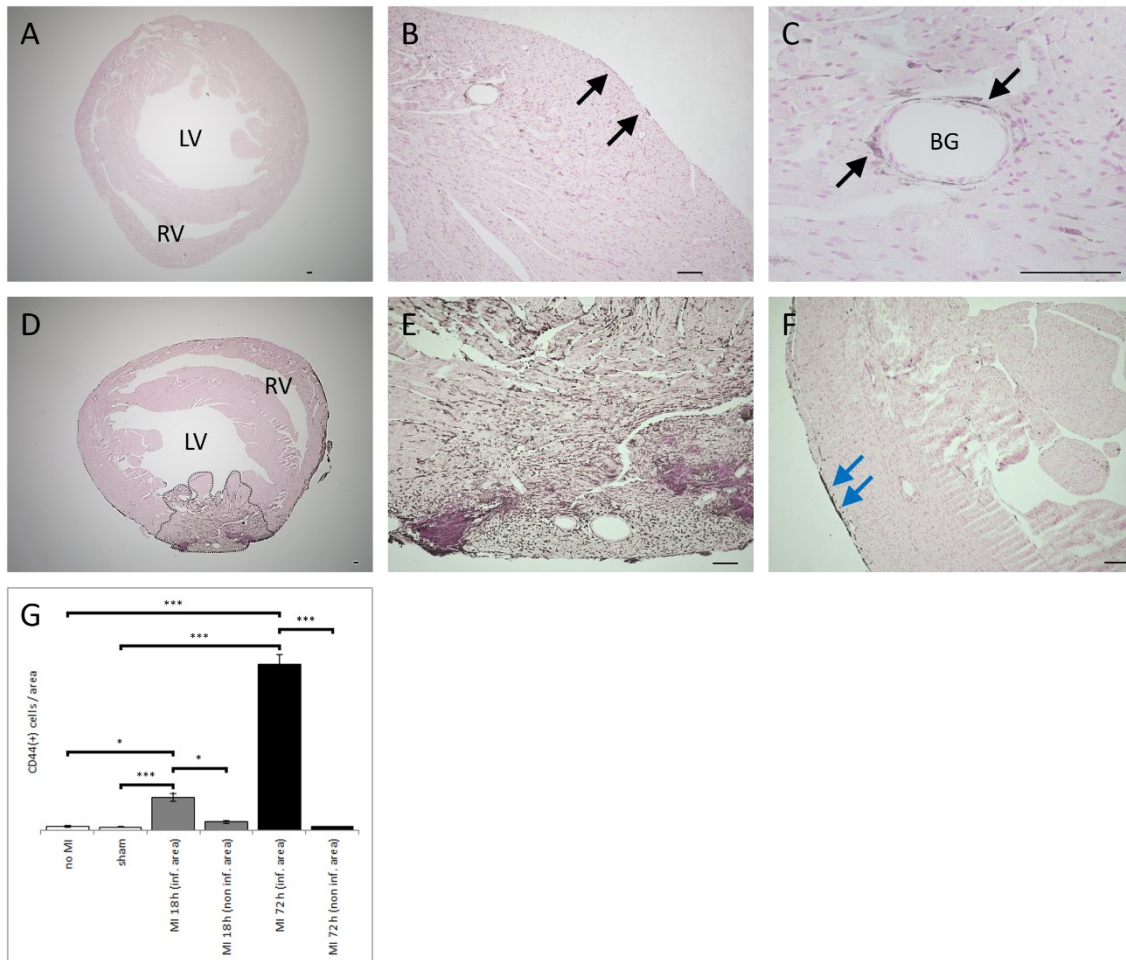


Abbildung 6: CD44⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard

Die Abbildung zeigt den Querschnitt eines Herzens mit normaler Perfusion (obere Zeile) sowie eines Herzens nach 24-stündiger Ischämie bei proximaler Ligatur des Ramus interventricularis anterior (untere Zeile). Die Muskelschicht des linken Ventrikels (LV) ist deutlich kräftiger als die des rechten Ventrikels (RV). In der oberen Zeile (A-C) erkennt man das physiologische Vorkommen von CD44⁺ Zellen im normal perfundierten Mäusemyokard. Einige dieser Zellen sind exemplarisch durch schwarze Pfeile gekennzeichnet und befinden sich sowohl subepikardial (B) als auch adventitiell (C) im Bereich größerer Blutgefäße (BG). In der unteren Spalte (D-F) erkennt man eine massive Expansion der CD44⁺ Zellen nach 24-stündiger Ischämie. Das Infarktareal ist durch eine gestrichelte Linie umrandet (D). Die blauen Pfeile kennzeichnen das subepikardiale Vorkommen von CD44⁺ Zellen (F). Die Maßstabsleiste entspricht jeweils 100 μ m.

Das Diagramm (G) zeigt die signifikante bzw. hochsignifikante Zunahme von CD44⁺ Zellen im Infarktbereich nach 18- bzw. 72-stündiger Ischämiezeit. Der Infarktbereich wurde jeweils mit dem nicht infarzierten Myokard desselben Herzens sowie mit einem normal perfundierten Herzmuskelgewebe und dem Myokard eines Placebotieres verglichen. Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 3$.

Anschließend sollte analysiert werden, ob die Zunahme der CD44⁺ Zellen durch eigene Proliferation oder durch Differenzierung anderer Stamm- und Vorläuferzellen bedingt war. Hierbei kam eine Doppelfärbung auf CD44 (Immunfluoreszenzfärbung) und Ki-67 (DAB-Färbung) zur Anwendung. In dieser Doppelfärbung zeigte sich, dass nahezu alle Ki-67⁺ Zellen auch CD44⁺ waren. Umgekehrt waren jedoch nicht alle CD44⁺ Zellen Ki-67⁺. Die Lokalisation in der Adventitia bzw. im Subepikardium spielte dabei keine Rolle.

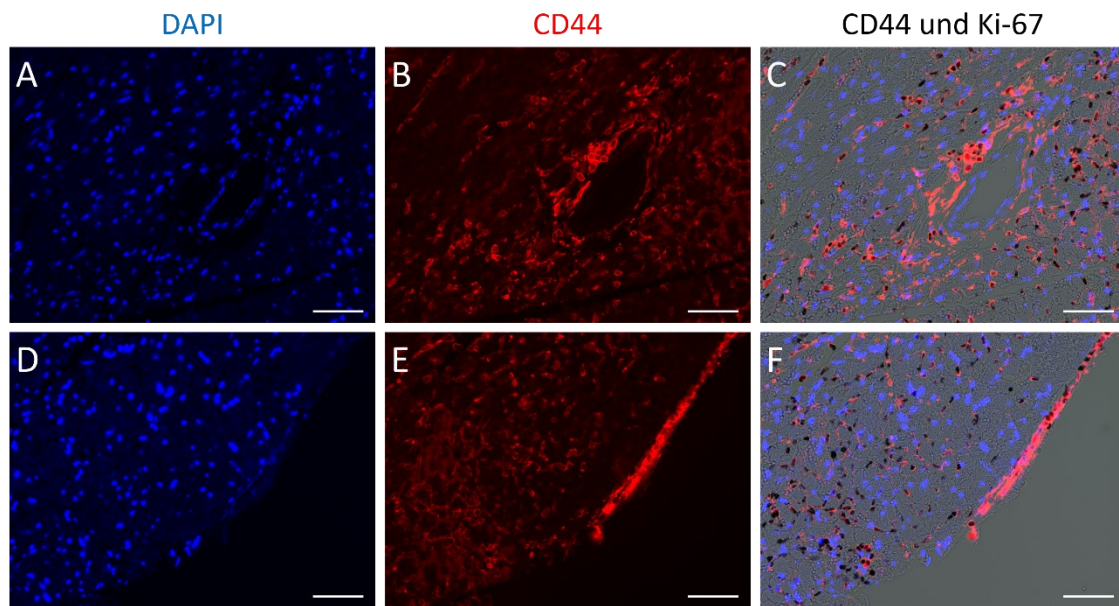


Abbildung 7: Proliferation von CD44⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard

Doppelfärbung auf CD44 und Ki-67 am infarzierten Mäuseherz nach einer 72-stündigen Ischämiezeit. In der linken Spalte (A und D) sieht man eine DAPI-Färbung, in der mittleren Spalte (B und E) eine Immunfluoreszenzfärbung auf CD44 und in der rechten Spalte (C und F) eine fusionierte Darstellung mit zusätzlicher hellfeldmikroskopischer Darstellung einer DAB-Färbung auf Ki-67. In den Fusionsbildern (C und F) kommen Zellkerne blau, CD44⁺ Zellen rot und Ki-67⁺ Zellen schwarz zur Darstellung. In der oberen Zeile (A-C) erkennt man den Anschnitt eines kardialen Gefäßes mit proliferierenden, adventitiellen CD44⁺ Zellen. Die untere Zeile (D-E) zeigt den Anschnitt des Epikards mit proliferierenden, subepikardialen CD44⁺ Zellen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

3.2.2 Proliferation von CD44⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay

Im CAA konnte die Proliferation von CD44⁺ Zellen sowohl unter normoxischer (21 % Sauerstoff) als auch unter hypoxischer (2 % Sauerstoff) Kultivierung gezeigt werden. Dabei erfolgte erneut eine Doppelfärbung auf CD44 (Immunfluoreszenzfärbung) sowie auf Ki-67 (DAB-Färbung) als Proliferationsmarker. Insgesamt zeigte sich ein

vergleichbares Proliferationsverhalten der Zellen, wie im infarzierten Mäusemyokard. Nach 14-tägiger Kultivierung zeigte sich, unabhängig vom Sauerstoffgehalt im Inkubator, ein signifikanter Anstieg der CD44⁺ Zellen (p -Wert < 0,01 unter Normoxie bzw. < 0,05 unter Hypoxie). Tendenziell zeigte sich ab dem siebten Tag eine etwas höhere Anzahl CD44-exprimierender Zellen unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen, wobei dieser Unterschied nicht signifikant wurde. Im frisch isolierten, murinen Herzgewebe zeigten sich vereinzelte adventitielle und subepikardiale CD44⁺ Zellen, jedoch nahezu keine Ki-67-Expression. Bereits nach dreitägiger Kultivierung ließen sich dann jedoch proliferierende CD44⁺ Zellen nachweisen. Dabei ließen sich im Rahmen der Doppelfärbung eindeutige Kollokalisierungen von CD44 und Ki-67 darstellen. Doppeltpositive Zellen ließen sich sowohl adventitiell als auch im Verbund der aussprossenden Zellen nachweisen.

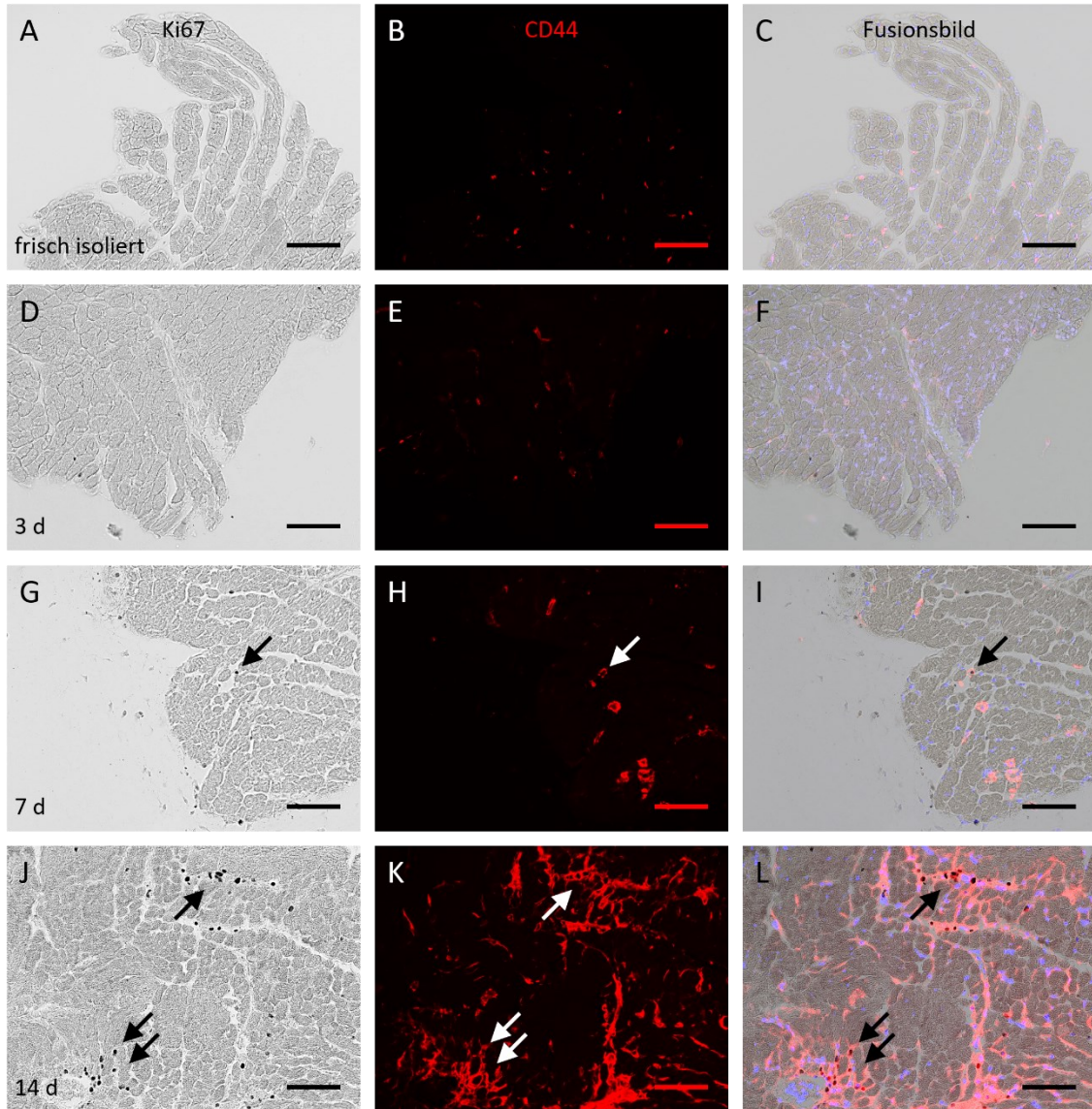


Abbildung 8: Proliferation CD44⁺ Zellen im CAA

Doppelfärbung auf CD44 und Ki-67 im frisch isolierten Mäusemyokard (A-C) sowie unter hypoxischer Kultivierung nach drei (D-F), sieben (G-I) und 14 Tagen (J-L). Die rechte Spalte zeigt hellfeldmikroskopische Aufnahmen einer DAB-Färbung auf Ki-67 (A, D, G und J), die mittlere Spalte zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Färbung auf CD44 (B, E, H und K) und die rechte Spalte die Fusion der jeweiligen Aufnahmen (C, F, I und L). Mit zunehmender Kultivierungsdauer zeigte sich eine signifikante Zunahme von CD44⁺ und Ki-67⁺ Zellen. Ki-67 wurde dabei hauptsächlich von CD44⁺ Zellen exprimiert. Die Pfeile zeigen exemplarisch einige Ki-67⁺ (G und J) sowie CD44⁺ (H und K) und doppelpositive Zellen (I und L). Proliferierende CD44⁺ Zellen waren insbesondere neartig im Bereich der Adventitia myokardialer Blutgefäße sowie im Verbund der aussprossenden Zellen zu finden. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

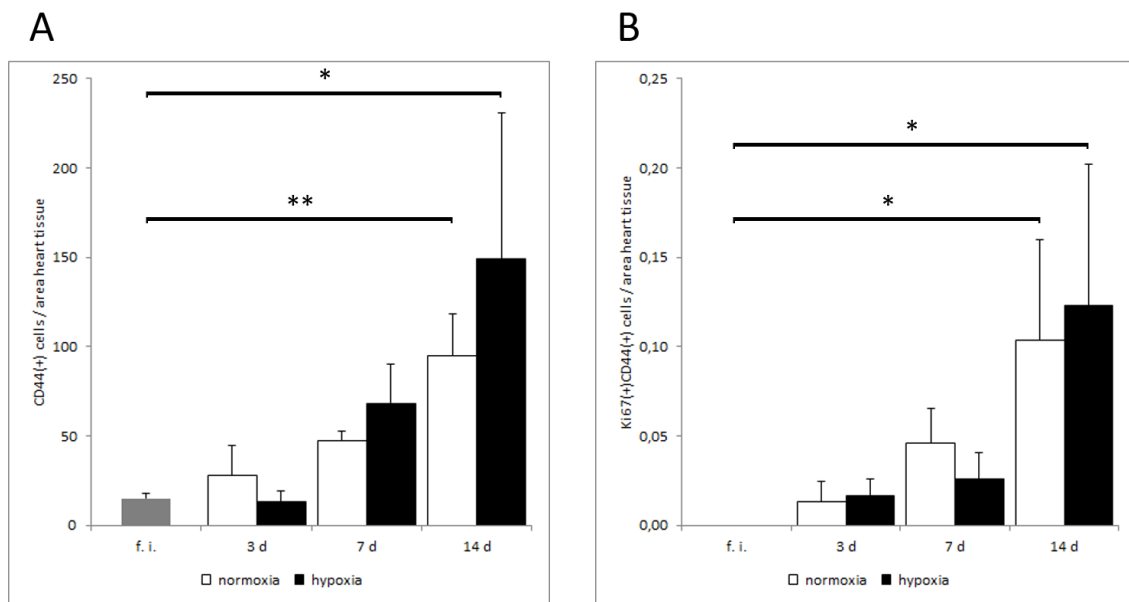


Abbildung 9: Quantifizierung von CD44⁺ und CD44⁺Ki-67⁺ Zellen im CAA

Quantifizierung der CD44⁺ (A) und CD44⁺Ki-67⁺ (B) im frisch isolierten Mäusemyokard (grauer Balken) sowie unter normoxischer (weißer Balken) und hypoxischer Kultivierung (schwarzer Balken). Nach 14-tägiger Kultivierung kam es zu einem signifikanten Anstieg CD44-exprimierender Zellen (p -Wert $< 0,01$ unter Normoxie bzw. $< 0,05$ unter Hypoxie). Tendenziell zeigte sich bei zunehmender Kultivierungsdauer unter Hypoxie ein stärkerer Anstieg der CD44⁺ Zellen. Der Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie war jedoch nicht signifikant. Bei der Quantifizierung der CD44⁺Ki-67⁺ Zellen (B) zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen normoxischen und hypoxischen Kultivierungsbedingungen. Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 3$.

3.3 Differenzierung von CD44⁺ Zellen zu immunmodulatorischen Zellen

Nachdem im infarzierten Mäusemyokard und im CAA ein Anstieg von CD44⁺ Zellen durch Proliferation gezeigt werden konnte, erfolgten im weiteren Verlauf Doppelfärbungen zur Analyse des Differenzierungspotenzials dieser Zellen. Dabei kamen insbesondere Makrophagenmarker zum Einsatz, um immunmodulatorische Funktionen dieser Zellen zu zeigen.

3.3.1 Differenzierung von CD44⁺ Zellen zu aktiven Makrophagen im

Aortenringassay

Im folgenden Versuch erfolgte eine Doppelfärbung auf CD44 (Immunfluoreszenzfärbung) und F4/80 (DAB-Färbung). F4/80 ist ein bekannter und weit verbreiteter Marker für murine Makrophagenpopulationen (Austyn and Gordon 1981). EMR1 ist ein eosinophilspezifischer Zellrezeptor und gilt als das humane Homolog von F4/80 (Hamann et al. 2007). Die Färbung wurde an Gewebeschnitten des murinen Aortengewebes nach einer 14-tägigen Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg von CD44⁺ Zellen subendothelial unterhalb der Membrana elastica interna sowie innerhalb der Adventitia. Durch Kolorisationen von CD44 und F4/80 konnte gezeigt werden, dass sich CD44⁺ Zellen zu aktiven Makrophagen differenzieren können. F4/80 wurde dabei ausschließlich von adventitiellen CD44⁺ Zellen exprimiert. Subendothelial zeigten sich keinen doppelpositiven Zellen.

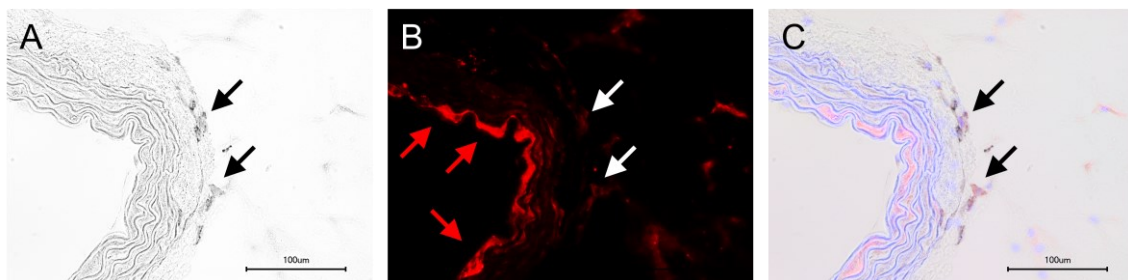


Abbildung 10: CD44⁺ F4/80⁺ Zellen im ARA

Doppelfärbung auf CD44 und F4/80 im ARA nach 14-tägiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen. Die Abbildung zeigt die hellfeldmikroskopische Aufnahme einer DAB-Färbung auf F4/80 (A) sowie eine immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer Färbung auf CD44 (B) und das Fusionsbild der beiden Aufnahmen (C). Die schwarzen Pfeile markieren exemplarisch einige F4/80⁺ (A) sowie einige doppelpositive Zellen (C) im Bereich der vaskulären Adventitia. Die roten Pfeile kennzeichnen das subendotheliale Vorkommen von CD44⁺ Zellen unterhalb der Membrana elastica interna (B). Diese Zellen zeigten keine F4/80-Expression. Die weißen Pfeile markieren einige CD44⁺ Zellen im Bereich der Adventitia (B). Kolorisationen von CD44 und F4/80 ließen sich ausschließlich adventitiell, nicht jedoch subendothelial nachweisen. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

3.3.2 Differenzierung von CD44⁺ Zellen zu pro-inflammatorischen

M1-Makrophagen im kardialen Angiogeneseassay

Studien konnten zeigen, dass im untergehenden Herzgewebe die induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sowohl von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen als auch von Kardiomyozyten exprimiert wird (Kingery et al. 2017). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob CD44⁺ Vorläuferzellen einen pro-inflammatorischen Phänotyp annehmen würden. Dies erfolgte mittels einer Doppelfärbung auf CD44 (Immunfluoreszenzfärbung) und iNOS (DAB-Färbung). Bereits im frisch isolierten Mäusemyokard zeigte sich eine geringfügige Anzahl iNOS-exprimierender Zellen, welche sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen bereits nach dreitägiger Kultivierungsdauer signifikant anstieg (p -Wert < 0,001 unter Normoxie und Hypoxie). Bei längerer Kultivierung kam es insbesondere unter Hypoxie nach dem initialen iNOS-Anstieg zu einem anschließenden Abfall der Anzahl iNOS-exprimierender Zellen. So wurde nach sieben- bzw. 14-tägiger Kultivierung signifikant weniger iNOS exprimiert (p -Wert < 0,001 [jeweils im Vergleich zur Anzahl iNOS-exprimierender Zellen nach dreitägiger Kultivierung]). Anhand der Doppelfärbung ließen sich sowohl CD44⁺iNOS⁺ als auch doppelpositive Zellen darstellen.

Insgesamt gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl von iNOS⁺ Zellen in Abhängigkeit vom Sauerstoffgehalt im Inkubator.

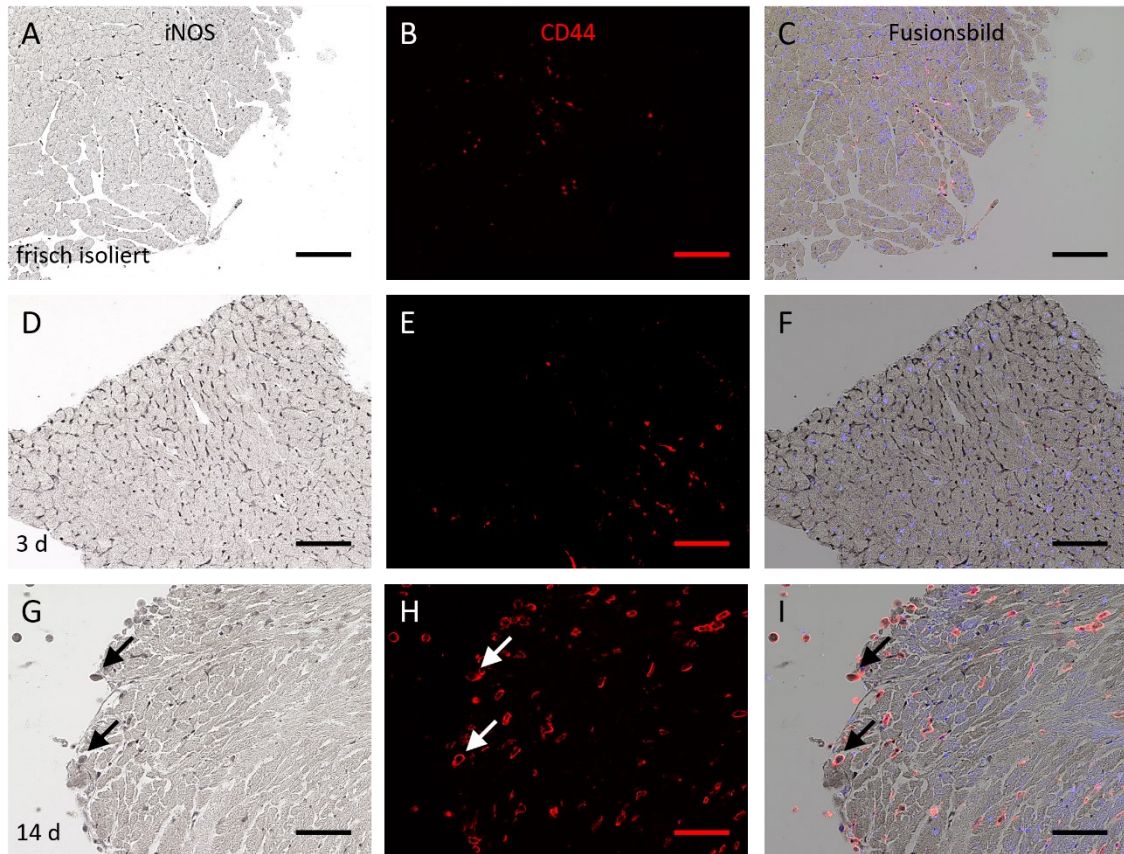


Abbildung 11: CD44⁺iNOS⁺ Zellen im CAA

Doppelfärbung auf CD44 und iNOS im frisch isolierten Mäusemyokard (A-C) sowie im CAA nach dreitägiger (D-F) und nach 14-tägiger Kultivierung (G-I) unter hypoxischen Bedingungen. In der linken Spalte (A, D und G) sieht man eine DAB-Färbung auf iNOS, in der mittleren Spalte eine Immunfluoreszenzfärbung auf CD44 (B, E und H) und in der rechten Spalte (C, F und I) das Fusionsbild beider Färbungen. Bereits im frisch isolierten Gewebe zeigten sich einige CD44⁺ und iNOS⁺ Zellen sowie einige doppelpositive Zellen. Nach dreitägiger Kultivierung kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg der iNOS-exprimierenden Zellen. Initial (nach dreitägiger Kultivierung) wurde iNOS insbesondere von CD44⁺ Zellen exprimiert. Nach sieben- bzw. 14-tägiger Kultivierung kam es zu einem signifikanten Abfall der iNOS⁺ Zellen, jedoch mit einem deutlich höheren Anteil doppelpositiver Zellen. Die Pfeile markieren exemplarisch einige iNOS⁺ (G), CD44⁺ (H) und doppelpositive Zellen (I). Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

3.3.3 Differenzierung von CD44⁺ Zellen zu anti-inflammatorischen

M2-Makrophagen im kardialen Angiogeneseassay

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CD44⁺ Zellen einen pro-inflammatorischen Phänotyp annehmen können, wurde eine Doppelfärbung auf CD44 und Interleukin-10 (IL-10) durchgeführt. IL-10 ist ein Marker für anti-inflammatorische M2-Makrophagen

(Eghbalzadeh et al. 2019). Im frisch isolierten Mäusemyokard ließ sich (nahezu) keine IL-10-Expression nachweisen. Mit zunehmender Kultivierungsdauer kam es jedoch zu einem Anstieg von IL-10⁺ Zellen. IL-10 wurde dabei zwar nicht von allen CD44⁺ Zellen, jedoch ausschließlich von diesem Zelltyp exprimiert. Zwischen Normoxie und Hypoxie gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der IL-10⁺ Zellen.

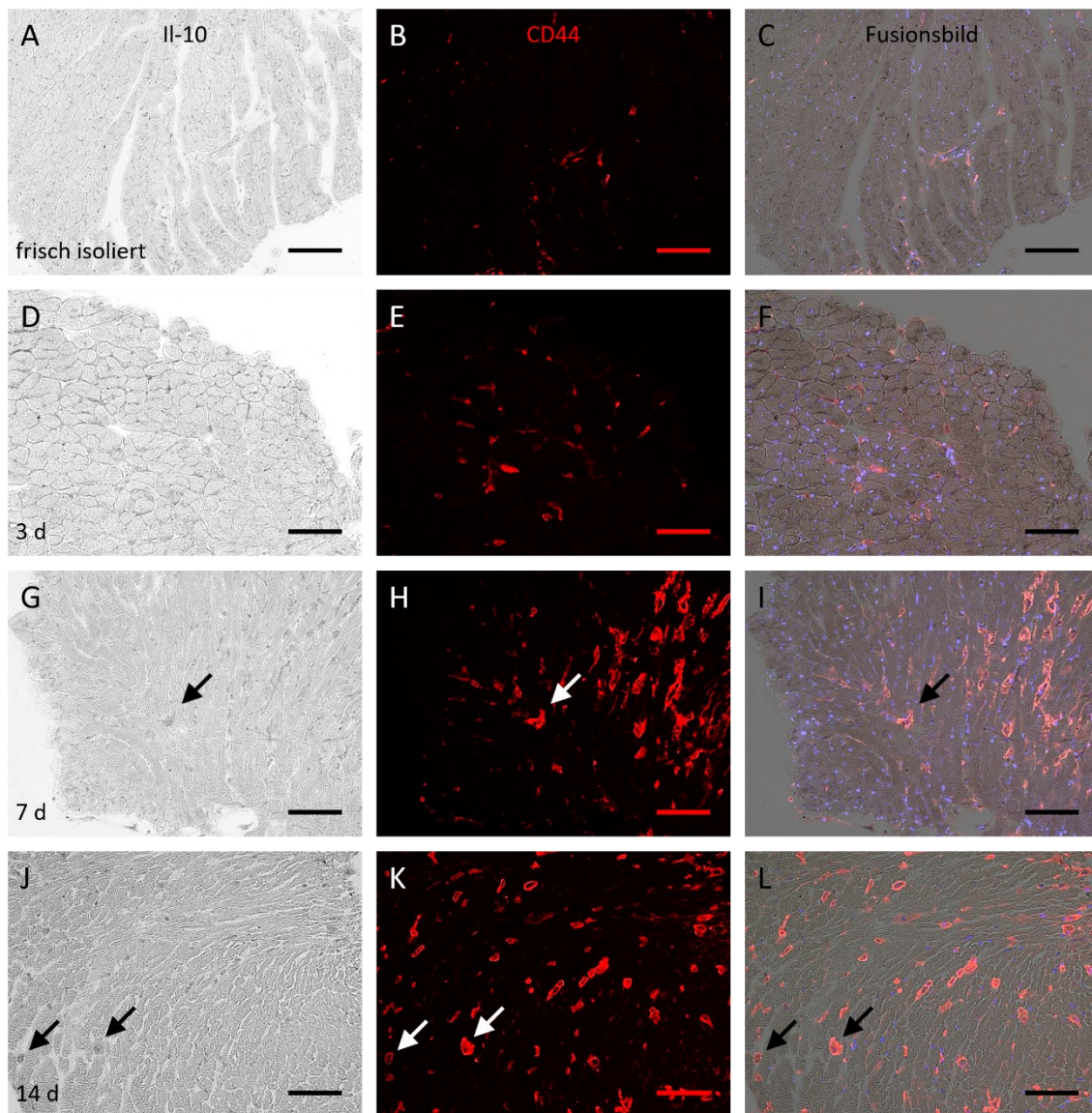


Abbildung 12: CD44⁺IL-10⁺ Zellen im CAA

Doppelfärbung auf CD44 und IL-10 im frisch isolierten Mäusemyokard (A-C) sowie im CAA nach drei- (D-F), nach sieben- (G-I) und nach 14-tägiger Kultivierung (J-L) unter hypoxischen Bedingungen. In der linken Spalte (A, D, G und J) sieht man eine DAB-Färbung auf IL-10, in der mittleren Spalte (B, E, H und K) eine Immunfluoreszenzfärbung auf CD44 und in der rechten Spalte (C, F, I und L) das Fusionsbild beider Färbungen. Bereits im frisch isolierten Gewebe zeigten sich einige CD44⁺ Zellen, jedoch keine IL-

10⁺ Zellen. Nach siebentägiger Kultivierung kam es zum Anstieg der IL-10-Expression durch CD44⁺ Zellen. Die Pfeile markieren dabei exemplarisch einige IL-10⁺ (G und J), CD44⁺ (H und K) sowie einige doppelpositive Zellen (I und L). IL-10 schien dabei zwar nicht von allen, jedoch ausschließlich von CD44⁺ Zellen exprimiert zu werden. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μ m.

3.4 Ausgewählte Faktoren beeinflussen das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay

3.4.1 Einfluss von VEGF-A und Lenvatinib auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay

Viele Zellen reagieren auf Hypoxie mit einer gesteigerten VEGF-A-Produktion. VEGF-A wirkt über zwei VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1 und -2) und induziert die Angiogenese. Bei den VEGF-Rezeptoren handelt es sich um Tyrosinkinase-Rezeptoren, die sich auf Endothelzellen des kardiovaskulären Systems befinden (Huusko et al. 2010). Lenvatinib wirkt als Multikinase-Inhibitor und hemmt unter anderem VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1 bis 3) sowie FGF-Rezeptoren (FGF1-4) und PDGF-Rezeptoren (PDGFR α) (Tohyama et al. 2014).

Im Folgenden sollte der Einfluss von VEGF auf das kardiale Sprouting und die Anzahl CD44-exprimierender Zellen untersucht werden. Dabei wurden dem Standardmedium entweder ausschließlich VEGF-A oder VEGF-A in Kombination mit Lenvatinib beigemischt. Als Kontrollmedium diente weiterhin das unveränderte Standardmedium. Die Kultivierung erfolgte nun ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen.

VEGF-A induzierte das Aussprossen von Zellen, während das kardiale Sprouting unter Lenvatinib-Therapie auch nach 14-tägiger Kultivierung vollständig ausblieb. Bereits ab dem siebten Kultivierungstag kam es dabei zu einem signifikanten Unterschied zwischen dem VEGF-A- und dem Lenvatinib-Medium (p -Wert < 0,02).

Anschließend wurde der Einfluss von VEGF-A bzw. Lenvatinib auf die Anzahl der CD44⁺ Zellen im CAA analysiert. Unter VEGF-A kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer stärkeren Proliferation von CD44⁺ Zellen, während die Anzahl der CD44⁺ Zellen unter Lenvatinib weitgehend konstant blieb und auch nach 14-tägiger Kultivierung im Mittel

nicht anstieg. Bereits nach dreitägiger Kultivierung war die Anzahl von CD44⁺ Zellen unter VEGF-A signifikant höher als unter Lenvatinib (p -Wert $< 0,02$). Unter Behandlung mit dem Multikinase-Inhibitor waren CD44⁺ Zellen ausschließlich adventitiell und subepikardial lokalisiert. Eine von diesen Nischen ausgehende Migration der Zellen blieb unter dieser Behandlung aus.

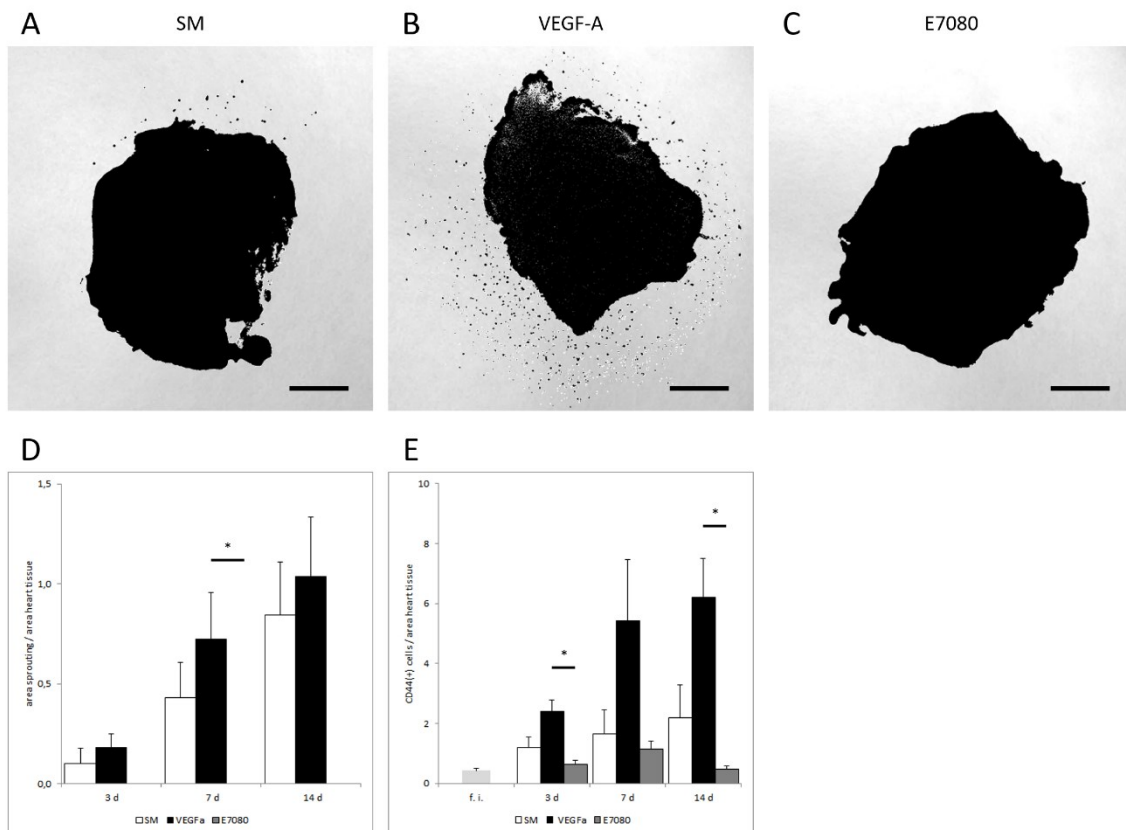


Abbildung 13: Sprouting im CAA unter VEGF-A und Lenvatinib

Hellfeldmikroskopische Aufnahme des kardialen Sproutings im CAA mit Standardmedium als Kontrolle (A) sowie unter Behandlung mit VEGF-A (B) und Lenvatinib (C), jeweils nach siebentägiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen. Unter VEGF-A kam es zum vermehrten Aussprossen von Zellen (B), während das kardiale Sprouting unter Lenvatinib vollständig ausblieb (C). Die Maßstabsleiste entspricht 500 μ m.

Die Quantifizierung des kardialen Sproutings (D) zeigte ab dem siebten Kultivierungstag einen signifikanten Unterschied zwischen dem VEGF-A- und dem Lenvatinib-Medium (p -Wert $< 0,02$). Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 6$.

Bei der Quantifizierung der CD44⁺ Zellen (E) fiel auf, dass es unter VEGF-A zu einer deutlich stärkeren Proliferation von CD44⁺ Zellen kam, während die Anzahl CD44-exprimierender Zellen unter Lenvatinib-Behandlung stagnierte. Der Unterschied zwischen dem VEGF-A- und dem Lenvatinib-Medium wurde bereits nach dreitägiger Kultivierung signifikant (p -Wert $< 0,02$). Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 3$.

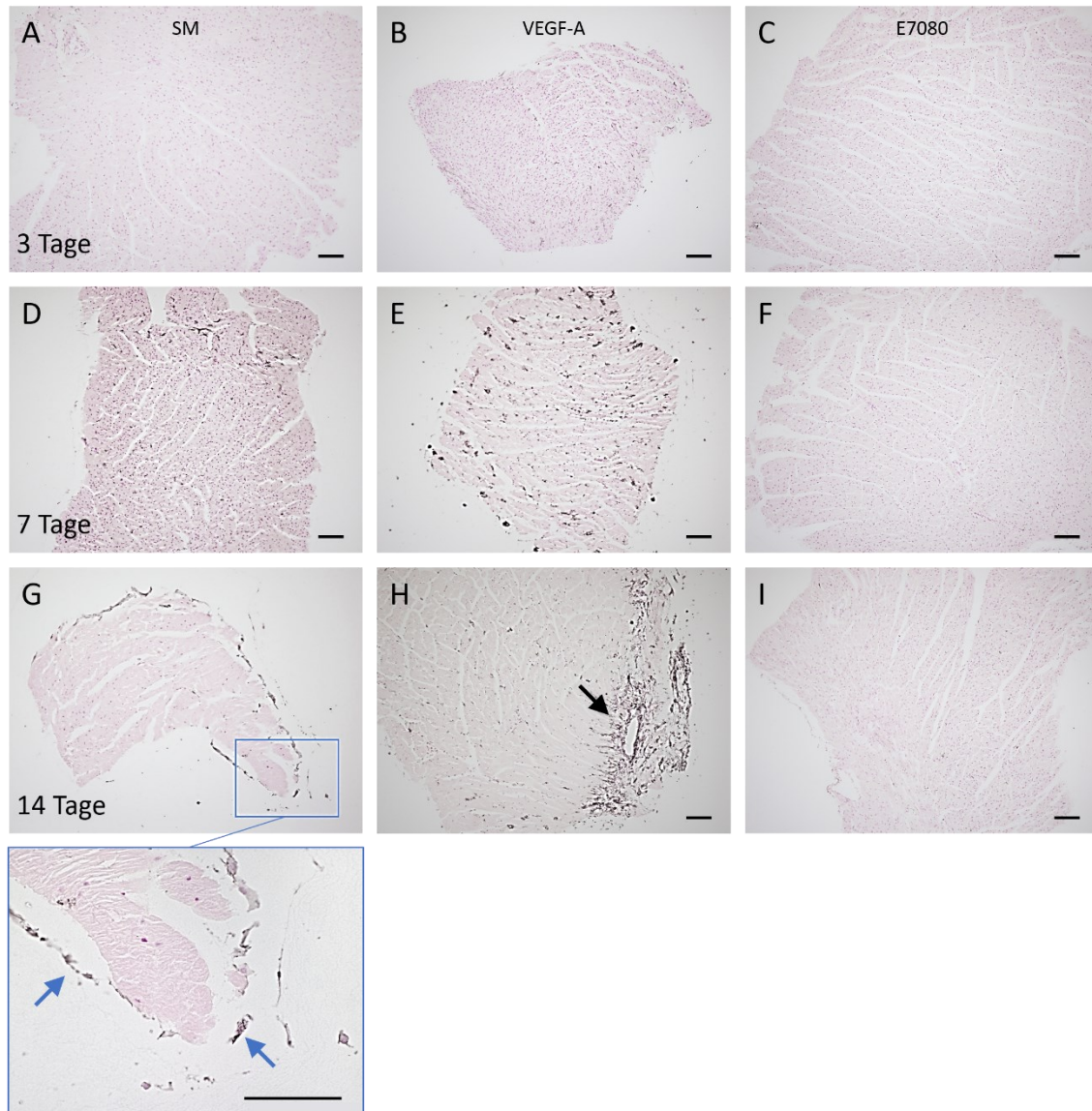


Abbildung 14: CD44⁺ Zellen im CAA unter VEGF-A und Lenvatinib

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen einer DAB-Färbung auf CD44 im CAA unter Hypoxie nach drei- (A-C), sieben- (D-F) und 14-tägiger Kultivierung (G-I). Ein Teil des Gewebes wurde unter Standardbedingungen kultiviert (A, D und G), während ein anderer Teil durch VEGF-A stimuliert (B, E und H) bzw. durch Lenvatinib (E7080) inhibiert wurde (C, F und I). VEGF-A induzierte das kardiale Sprouting und erhöhte die Anzahl von CD44⁺ Zellen. Unter Therapie mit dem Multikinase-Inhibitor Lenvatinib blieb das kardiale Sprouting vollständig aus und die Anzahl der CD44⁺ Zellen blieb auch nach 14-tägiger Kultivierung (I) weitgehend konstant. Der schwarze Pfeil markiert exemplarisch ein myokardiales Blutgefäß, von dessen Adventitia eine starke Proliferation positiver Zellen ausgeht. Die blauen Pfeile markieren exemplarisch einige CD44⁺ Zellen, welche sich im Verbund der aussprossenden Zellen befinden (vergrößerter Ausschnitt G).

3.4.2 Einfluss einer Makrophagendepletion auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay

Im folgenden Versuch sollte der Einfluss von Makrophagen auf das kardiale Sprouting und die Anzahl CD44-exprimierender Zellen im CAA untersucht werden. Dabei erfolgte eine Makrophagendepletion mittels Clodronatliposomen. Die hydrophilen Clodronat-Moleküle werden in einer liposomal verkapselten Form von den Makrophagen aufgenommen. Sobald die Liposomen mithilfe lysosomaler Phospholipasen verdaut werden, akkumuliert das Clodronat im Zytoplasma der Makrophagen. Bei einer bestimmten intrazellulären Clodronat-Konzentration werden die entsprechenden Makrophage mittels Apoptose eliminiert (Martins-Neves et al. 2018). Als Kontrolle wurde zum einen Standardmedium verwendet, zum anderen kamen PBS-Kontrollliposomen zum Einsatz. Diese werden von den Makrophagen ebenfalls phagozytiert, enthalten jedoch nur phosphatgepufferte Kochsalzlösung. Die Makrophagendepletion hatte keinen signifikanten Einfluss auf das kardiale Sprouting. Zumindest unter diesen Versuchsbedingungen scheint die Anwesenheit von Makrophagen für das Aussprossen von Zellen nicht obligatorisch zu sein. Interessanterweise zeigte sich nach 14-tägiger Kultivierung eine signifikant höhere Anzahl von CD44⁺ Zellen in dem myokardialen Gewebe, welches mit PBS-Kontrollliposomen behandelt wurde (p -Wert < 0,05). Möglicherweise beruht die verstärkte Expression auf einer Zellschwellung der phagozytierenden CD44⁺ Zellen, nicht jedoch auf einer Proliferation ebendieser. Auch unter Makrophagendepletion mittels Clodronatliposomen ließen sich stets CD44⁺ Zellen im Gewebe nachweisen. Dies deutet darauf hin, dass sich nur ein gewisser Anteil der CD44⁺ Zellen zu phagozytierenden Makrophagen differenziert.

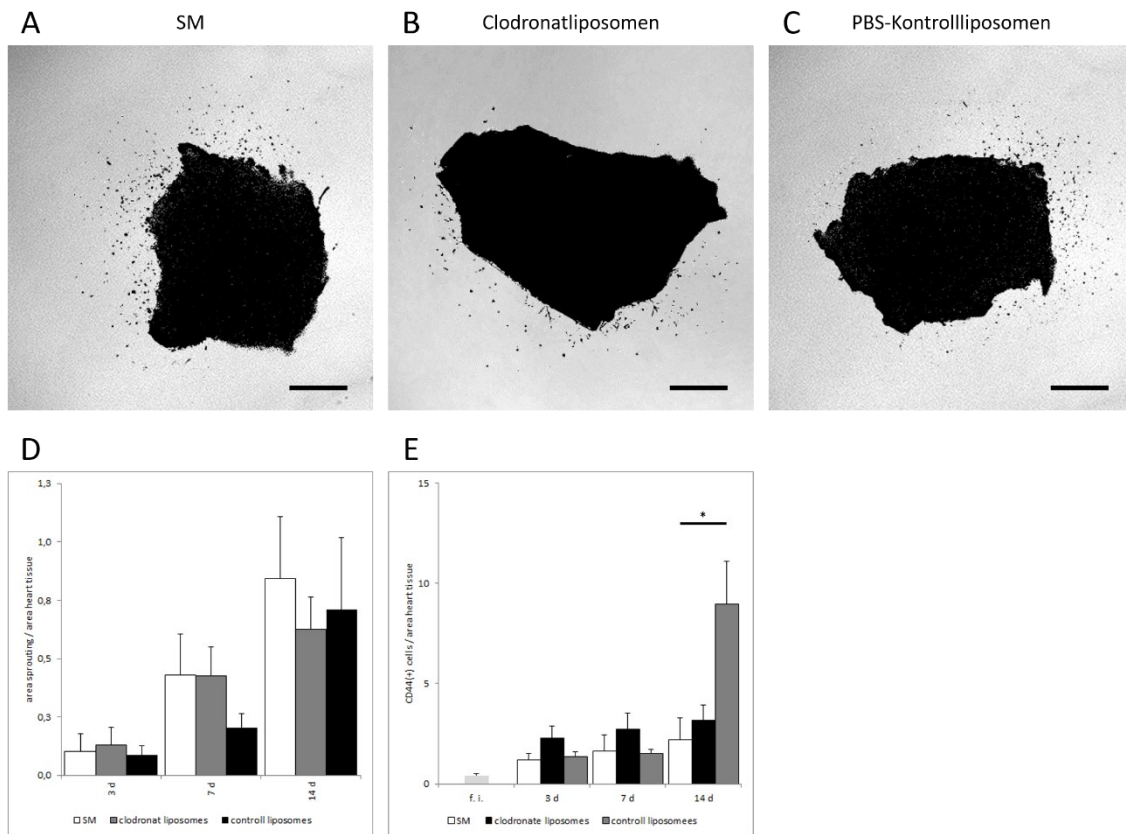


Abbildung 15: Sprouting im CAA unter Makrophagendepletion

Kardiales Sprouting im CAA nach 14-tägiger Kultivierung unter Hypoxie. Kultivierung unter Verwendung des Standardmediums (A) sowie Behandlung mit Clodronatliposomen (B) und PBS-Kontrollliposomen (C). Hinsichtlich des kardialen Sproutings zeigten sich unter der Makrophagendepletion keine Unterschiede (D). Nach 14-tägiger Kultivierung kam es unter Verwendung der PBS-Kontrollliposomen zu einer scheinbar höheren CD44-Expression (p -Wert $< 0,05$). Ein Erklärungsansatz dafür wäre, dass es durch die phagozytierten PBS-Kontrollliposomen zu einer Hypertrophie, nicht jedoch Proliferation der phagozytierenden CD44⁺ Zellen kommt. Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 3$.

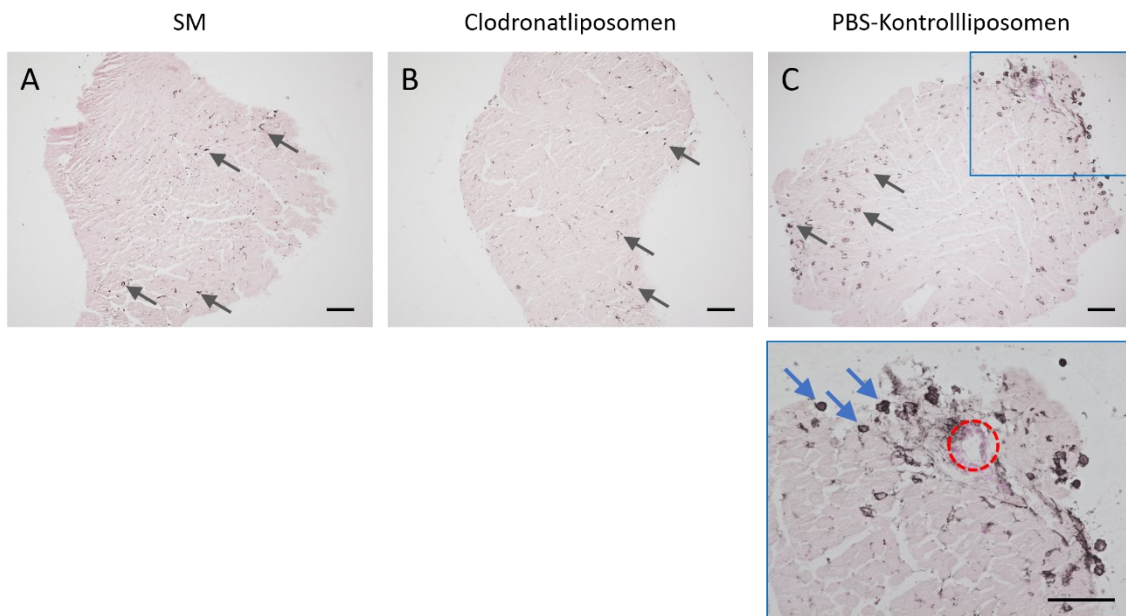


Abbildung 16: CD44⁺ Zellen im CAA unter Makrophagendepletion

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen einer DAB-Färbung auf CD44 im CAA nach 14-tägiger Kultivierung unter Hypoxie. Ein Teil des Gewebes wurde im Standardmedium kultiviert (A), ein weiterer Teil wurde zur Makrophagendepletion mit Clodronatliposomen behandelt (B) und ein weiterer Teil wurde mit PBS-Kontrollliposomen versetzt (C). Unter allen drei Kultivierungsbedingungen ließen sich CD44⁺ Zellen nachweisen. Einige dieser Zellen wurden exemplarisch mit grauen Pfeilen markiert (A-C). Das Vorkommen von CD44⁺ Zellen unter Behandlung mit Clodronatliposomen zeigt, dass sich nur ein gewisser Anteil dieser Zellen zu phagozytierenden Makrophagen differenziert (B). Die blauen Pfeile im Bildausschnitt C markieren exemplarisch einige Zellen mit hoher CD44-Expression, welche um ein kardiales Blutgefäß (rot umrandet) lokalisiert sind. Insgesamt kam es unter Behandlung mit den Kontrollliposomen zu einer scheinbar stärkeren CD44-Expression. Die Maßstabsleiste entspricht 100 µm.

3.4.3 Einfluss des Wnt-Signalwegs auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44⁺ Zellen im kardialen Angiogeneseassay

Der Wnt-Signalweg spielt bei zahlreichen zellulären Prozessen, inklusive der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Zellpolarität sowie der Organogenese während der Embryonalentwicklung, eine wichtige Rolle (Komiya and Habas 2008). Im folgenden Versuch sollte der Einfluss des Signaltransduktionswegs auf das kardiale Sprouting und die Anzahl CD44-exprimierender Zellen im CAA untersucht werden. Dabei kamen sowohl ein Wnt-Aktivator als auch ein Wnt-Inhibitor, in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen, zum Einsatz. CHIR-99021 ist ein etablierter Agonist

des Wnt-Signaltransduktionswegs, der bereits im Rahmen zahlreicher Studien zum Einsatz kam (Schou 2001; Zhang et al. 2012; Tran and Zheng 2017). IWR-1 ist hingegen ein gängiger Wnt-Inhibitor (Martins-Neves et al. 2018). Die Behandlung mit den beiden Faktoren hatte keinen signifikanten Einfluss auf das kardiale Sprouting und die Anzahl der CD44⁺ Zellen im CAA. Der Wnt-Signalweg scheint daher, zumindest unter diesen Versuchsbedingungen, keinen größeren Einfluss auf das kardiale Sprouting und die Proliferation von CD44⁺ Zellen zu haben.

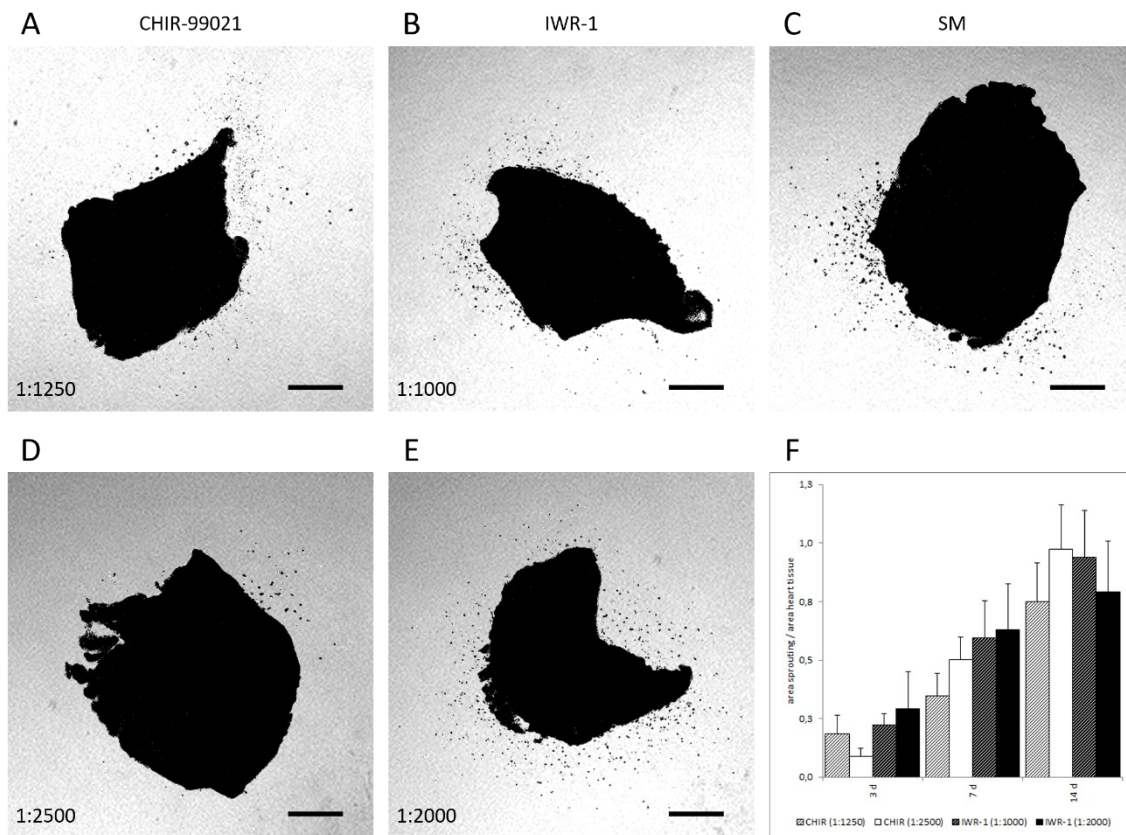


Abbildung 17: Sprouting im CAA unter Wnt-Aktivierung und -Inhibierung

Kardiales Sprouting im CAA nach 14-tägiger Kultivierung unter Hypoxie. Kultivierung unter Behandlung CHIR-99021 (A und D) und IWR-1 (B und E) sowie unter Verwendung des Standardmediums (C). Die beiden Faktoren kamen dabei in unterschiedlichen Konzentrationen zum Einsatz. CHIR-99021 wurde dem Standardmedium im Verhältnis 1:1250 = 8 μ M (A) sowie im Verhältnis 1:2500 = 4 μ M (D) beigesetzt. IWR-1 wurde dem Standardmedium im Verhältnis 1:1000 = 10 μ M (B) und im Verhältnis 1:2000 = 5 μ M (E) beigesetzt. Hinsichtlich des kardialen Sproutings zeigten sich dabei weder substanz- noch konzentrationsabhängige Unterschiede (F). Der Wnt-Signalweg scheint daher, zumindest unter diesen Versuchsbedingungen, keinen wesentlichen Einfluss auf das Aussproßen von Zellen aus dem myokardialen Gewebe zu haben. Die Fehlerbalken entsprechen dem jeweiligen Standardfehler. $N \geq 3$.

4. Diskussion

4.1 Hypoxie induziert das Aussprießen von Zellen in unterschiedlichen Angiogeneseassays

Sowohl im ARA als auch im CAA konnte gezeigt werden, dass Hypoxie das Aussprießen von Zellen aus dem Gewebe induziert. Verglichen zur Kultivierung unter normalen Sauerstoffbedingungen (21 % O₂) zeigte sich unter hypoxischen Bedingungen (2 % O₂) bereits nach dreitägiger Kultivierung eine Verstärkung des aortalen und des kardialen Sproutings. Nach 14-tägiger Kultivierung imponierte in beiden Angiogeneseassays ein hochsignifikanter Unterschied.

Einige dieser aussprießenden Zellen formieren sich zu neuen Blutgefäßen. Wenn man bedenkt, dass das vaskuläre System nahezu alle Säugetierzellen mit Sauerstoff versorgt, ist es nicht verwunderlich, dass Hypoxie einen zentralen Einfluss auf die Entstehung neuer Blutgefäße besitzt. Die Reaktion des Menschen auf Hypoxie ist durch systemische Veränderungen der hämatopoetischen, respiratorischen und kardiovaskulären Physiologie gekennzeichnet, die in Kombination eine angemessene Sauerstoffversorgung gewährleisten (Smith, Robbins, and Ratcliffe 2008). Auf zellulärer Ebene scheinen dabei Hypoxie-induzierbare Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen (Hirota and Semenza 2006). Diese Hypoxie-induzierbaren Faktoren sind Transkriptionsfaktoren, die auf eine Abnahme des verfügbaren Sauerstoffs in der zellulären Umgebung reagieren (Smith, Robbins, and Ratcliffe 2008; Wilkins et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich einige, wenn auch nicht ausschließlich CD44⁺ Zellen im Verbund der aussprießenden Zellen befinden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese multipotenten Stammzellen einen Beitrag zur Angiogenese leisten. Dabei ist jedoch unklar, ob CD44, ein Zelloberflächenmarker, eher als pro- oder antiangiogener Faktor fungiert. Versuche von Cao et al. konnten zeigen, dass der Verlust von CD44 die Angiogenese beeinträchtigt (Cao et al. 2006). Ein genaueres Verständnis der potenziell vielfältigen Funktionen von CD44 bei der

Entstehung und Morphogenese neuer Blutgefäße, könnte entscheidende Hinweise für die Bedeutung von CD44 als therapeutisches Target liefern.

4.2 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44⁺ Zellen

Sowohl *in vivo* im infarzierten Mäusemyokard als auch *in vitro* im CAA konnte ein Anstieg von CD44⁺ Zellen gezeigt werden. Ein Teil dieser Zellen exprimierte Ki-67 im Zellkern, wodurch sich die Teilungsfähigkeit dieser Zellen bestätigen ließ. Ob die Zunahme dieser Zellen ausschließlich auf Proliferation beruht oder ob sie zusätzlich durch Differenzierung anderer Zelltypen zu CD44⁺ Zellen bedingt ist, bleibt dabei jedoch noch unklar.

4.2.1 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44⁺ Zellen *in vivo* im infarzierten Mäusemyokard

Mittels histologischer Färbungen an murinem Herzgewebe konnte das physiologische Vorkommen von CD44⁺ Zellen in der Adventitia kardialer Gefäße sowie im Subepikardium gezeigt werden. Im infarzierten Mäusemyokard zeigte sich eine massive Zunahme dieser Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass CD44-vermittelte Prozesse entscheidend an der Infarktheilung beteiligt sind. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen unterstützen diese Vermutung (Huebener et al. 2008; Carlson et al. 2011). Ob und inwiefern sich die Funktion der subepikardial lokalisierten CD44⁺ Zellen von denen in der vaskulären Adventitia unterscheidet, ist bislang noch nicht geklärt.

4.2.2 Bestätigung proliferativer Eigenschaften von CD44⁺ Zellen *in vitro* im kardialen Angiogeneseassay

Auch im CAA konnte mit zunehmender Kultivierungsdauer ein hochsignifikanter Anstieg von CD44⁺ Zellen gezeigt werden. Interessanterweise kam es sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen zu einer deutlichen Zunahme der CD44⁺ Zellen. Unabhängig vom Sauerstoffgehalt im Inkubator zeigte sich ein weitgehend vergleichbares Proliferationsverhalten der multipotenten Stammzellen. Vermutlich wurde die Proliferation der CD44⁺ Zellen bereits durch die

Gewebsschädigung im Rahmen der vorherigen Präparation induziert. Ischämie scheint daher nicht der einzige Trigger für die Expansion dieser Zellen zu sein. In der Vergangenheit konnten bereits zahlreiche Studien eine Hochregulation von CD44 nach Gewebsverletzungen zeigen (Cuff et al. 2001; Moon et al. 2004; Zhao et al. 2011; Govindaraju et al. 2019).

4.3 CD44⁺ Zellen haben das Potenzial sich zu immunmodulatorischen Zellen zu differenzieren

F4/80 ist ein bekannter und weit verbreiteter Marker für murine Makrophagenpopulationen (Austyn and Gordon 1981). EMR1 ist ein eosinophilspezifischer Zellrezeptor und gilt als das humane Homolog von F4/80 (Hamann et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit gelang im ARA nach 14-tägiger Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen der Nachweis von CD44⁺F4/80⁺ Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass sich CD44⁺ Stamm- und Vorläuferzellen zu aktiven Makrophagen differenzieren können. Anschließend wurde untersucht, inwieweit diese Zellen einen pro- bzw. anti-inflammatorischen Phänotyp annehmen.

Makrophagen können in zwei Gruppen unterteilt werden: pro-inflammatorische M1- und anti-inflammatorische M2-Makrophagen (Mills et al. 2000). M1-Makrophagen spielen bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle, während M2-Makrophagen entzündungshemmend wirken (Krzyszczuk et al. 2018). Pro-inflammatorische M1-Makrophagen sezernieren entzündliche Zytokine und bilden über die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) das toxische Stickstoffmonoxid. Deshalb konnte sich iNOS als gängiger Marker muriner M1-Makrophagen etablieren (Martinez and Gordon 2014). Trotz der Heterogenität anti-inflammatorischer M2-Makrophagen eignet sich das entzündungshemmende Zytokin IL-10 als Marker der unterschiedlichen Subtypen (Wang et al. 2019).

Doppelfärbungen auf CD44 und iNOS bzw. auf CD44 und IL-10 konnten im CAA eindeutige Kollokalisierungen der jeweiligen Marker zeigen. Dies deutet darauf hin, dass CD44⁺ Stammzellen sowohl einen pro- als auch einen anti-inflammatorischen Phänotyp

annehmen können. Bereits nach dreitägiger Kultivierung zeigte sich ein signifikanter Anstieg beider Makrophagenmarker. Das Maximum der Anzahl iNOS-exprimierender Zellen wurde bereits nach drei Tagen erreicht, während die Il-10-Expression bis zum 14. Kultivierungstag kontinuierlich anstieg. Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, dass es im Rahmen der Wundheilung häufig zunächst zu einem Anstieg pro-inflammatorischer M1-Makrophagen kommt, während im weiteren Verlauf der Anteil anti-inflammatorischer M2-Makrophagen überwiegt (Krzyszczyk et al. 2018).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass Makrophagen während der ersten drei Tage nach einem Myokardinfarkt eher einen pro-inflammatorischen M1-ähnlichen Phänotyp aufweisen, welcher eine akute Entzündung auslöst und der Beseitigung nekrotischer Zellen dient. Etwa am fünften bis siebten Tag nach dem Myokardinfarkt beginnen diese Makrophagen einen M2-ähnlichen Phänotyp anzunehmen, der die Entzündung auflöst und die Wundheilung fördert (Ma, Mouton, and Lindsey 2018; O'Rourke, Dunne, and Monaghan 2019).

Die Auswirkungen von Makrophagen auf die kardiale Regeneration und Kardiogenese sind weiterhin umstritten. In mehreren Studien wurde vermutet, dass es durch inflammatorische Vorgänge, welche durch myokardiale Hypoxie oder Ischämie induziert wurden, zu einer Verschlechterung der myokardialen Regeneration komme. Daher wurde diese Entzündungsreaktion in der Vergangenheit intensiv als mögliches therapeutisches Target diskutiert (Frangogiannis 2014). Neuere Veröffentlichungen zeigten jedoch auch positive Effekte der Makrophagen, da diese scheinbar regenerative Signale induzierten, die zur Remuskularisierung infarzierter neonataler Herzen beitrugen (Aurora et al. 2014). Darüber hinaus kam es bei Mäusen nach der Depletion von Makrophagen, innerhalb der ersten Woche nach einem Myokardinfarkt, zu einer stärker ausgeprägten Narbenbildung und einer erhöhten Mortalität (Frantz et al. 2013).

Passend dazu konnten Mekala et al. zeigen, dass eine Makrophagendepletion die Generierung schlagender Kardiomyozyten unter *in vitro* Bedingungen verhindert (Mekala et al. 2018). Dies beruht vermutlich unter anderem auf der Freisetzung von Wachstumsfaktoren durch Makrophagen (Mekala et al. 2018). Beispielsweise spielt das

von Makrophagen sezernierte VEGF für die Entstehung von Endothelzellen und die Angiogenese eine unerlässliche Rolle. Außerdem kann der proangiogene Faktor VEGF scheinbar auch direkt auf die Differenzierung kardialer Vorläuferzellen wirken, da diese mit der Expression von FLK1 über einen entsprechenden Rezeptor verfügen (Mekala et al. 2018). Bemerkenswert ist auch, dass kürzlich gezeigt werden konnte, dass sich Makrophagen mittels Connexin 43, einem Transmembranprotein, mit Kardiomyozyten verbinden und dabei die elektrische Leitfähigkeit des Herzens erleichtern (Hulsmans et al. 2017).

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass CD44⁺ Zellen bei der Kardiomyogenese eine wichtige Rolle spielen könnten. Inwieweit das Vorhandensein pro-inflammatorischer M1- bzw. entzündungshemmender M2-Makrophagen die Generierung schlagender Zellen aus FLK1⁺CD34⁺Sca-1⁻CD44⁻ Zellen beeinflusst, sollte in Zukunft näher untersucht werden. Unter Umständen ließe sich durch eine Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen M1- und M2-Makrophagen die postischämische Narbenbildung reduzieren und die Entstehung neuer Kardiomyozyten fördern. CD44⁺ Zellen könnten also in Zukunft bei der Behandlung von Myokardinfarkten und Myokardschäden anderer Ursache als therapeutisches Target eine wichtige Rolle spielen.

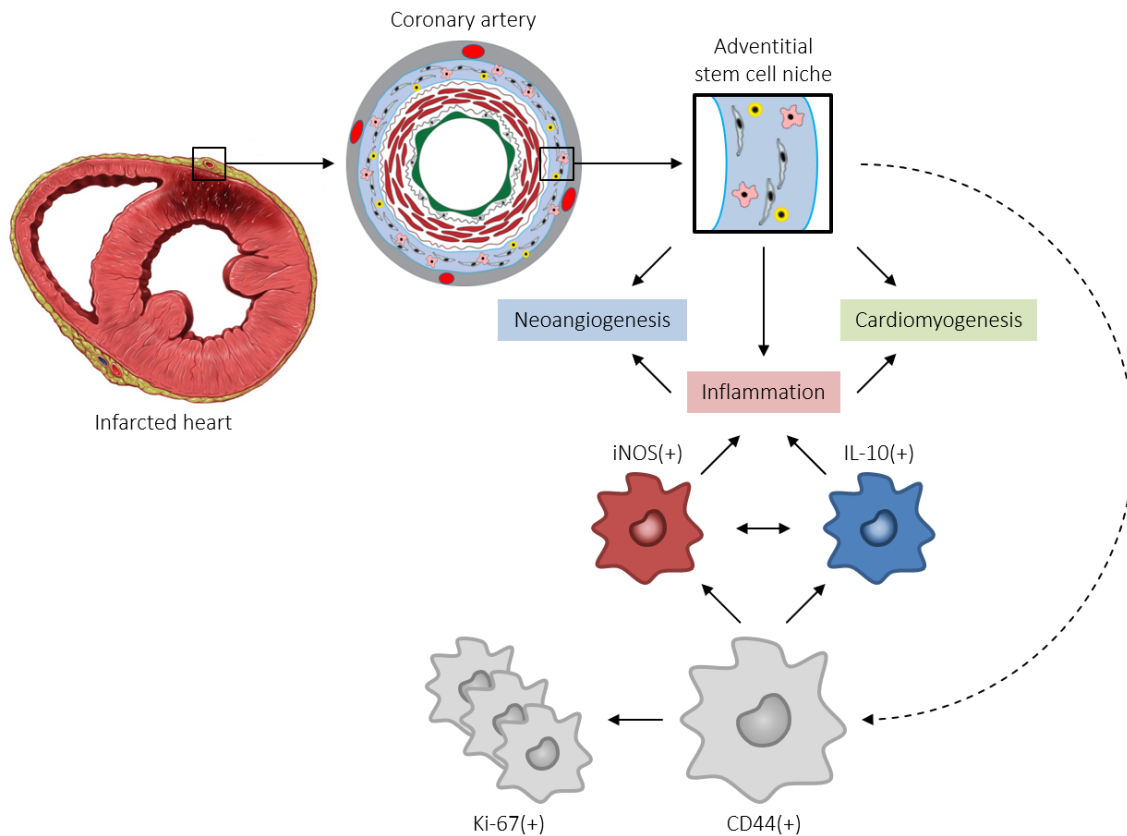


Abbildung 18: Eigenschaften von CD44⁺ VW-SCs

Die Adventitia reifer Blutgefäße stellt eine Nische für Stamm- und Vorläuferzellen dar. Immunphänotypisch lassen sich dabei unter anderem CD34⁺FLK1⁺CD31⁻CD45⁻ und CD44⁺CD31⁻CD34⁻ Zellen voneinander abgrenzen. In infarzierten Mäuseherzen kommt es im Infarktareal zu einem signifikanten Anstieg von CD44⁺ Zellen. Auch im Aortenringassay und kardialen Angiogeneseassay konnte bei zunehmender Kultivierungsdauer eine deutliche Zunahme dieser Stamm- und Vorläuferzellen verzeichnet werden. CD44⁺ Zellen exprimieren Ki-67 im Zellkern, wodurch sich die Teilungsfähigkeit dieser Zellen beweisen ließ. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich aus den adventitiellen Zellen reife F4/80⁺ Makrophagen generieren lassen. Dabei können CD44⁺ Zellen sowohl einen inflammatorischen als auch einen anti-inflammatorischen Phänotyp annehmen, was mittels Doppelfärbungen auf CD44 und iNOS bzw. CD44 und IL-10 gezeigt werden konnte. Das Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen M1- und anti-inflammatorischen M2-Makrophagen beeinflusst dabei scheinbar die Angiogenese und die Entstehung von Kardiomyozyten.

Quelle: Eigene Darstellung. Der obere Teil der Abbildung ist angelehnt an Wörsdörfer et al. The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body. Pharmacol Ther. 2017. Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

4.4 Einfluss ausgewählter Faktoren auf das kardiale Sprouting und auf CD44⁺ Zellen

4.4.1 VEGF-A ist entscheidend für die Proliferation und Migration von CD44⁺ Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Aussprossen von Zellen im CAA unter VEGF-A induziert wird, während es unter Behandlung mit Lenvatinib vollständig ausblieb. Lenvatinib wirkt als Multikinase-Inhibitor und hemmt unter anderem VEGF- (VEGFR-1 bis 3) sowie FGF- (FGFR-1 bis 4) und PDGF-Rezeptoren (PDGFR α) (Tohyama et al. 2014). Auffallend war, dass es unter VEGF-A-Stimulation zu einer Zunahme der CD44⁺ Zellen kam, während die Anzahl der CD44-exprimierenden Zellen unter Lenvatinib weitgehend konstant blieb. Außerdem konnte gezeigt werden, dass unter Lenvatinib die Migration dieser Zellen weitgehend ausblieb, sodass sie sich unter Behandlung mit diesem Multikinase-Inhibitor ausschließlich in ihren physiologischen Nischen adventitiell und subepikardial nachweisen ließen.

VEGF-A gilt als Hauptregulator der Angiogenese und der vaskulären Permeabilität (Rutanen et al. 2004; Rissanen et al. 2005; Yla-Herttuala et al. 2007). VEGF-A wirkt über zwei VEGF-Rezeptoren (VEGFR-1 [FLT1] und -2 [FLK1]) und ist ein spezifischer Aktivator vaskulärer Endothelzellen (Huusko et al. 2010). Wenn man bedenkt, dass CD44⁺ Zellen bei der Bildung neuer Blutgefäße eine Rolle zu spielen scheinen, so ist es nicht verwunderlich, dass VEGF-A die Anzahl CD44-exprimierender Zellen steigert. Dies geschieht vermutlich durch zwei Mechanismen, nämlich einer erhöhten Proliferation und einer Aktivierung ruhender VW-SCs, die dann CD44 exprimieren. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass CD44⁺ Zellen mit FLK1 über einen entsprechenden VEGF-Rezeptor verfügen (Krishnamurthy et al. 2008).

4.4.2 Nicht alle CD44⁺ Zellen differenzieren sich zu phagozytierenden Makrophagen

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass sich aus CD44⁺ Stamm- und Vorläuferzellen reife Makrophagen generieren lassen. Wie bereits erwähnt, konnten

Mekala et al. zuvor zeigen, dass sich eine Makrophagendepletion negativ auf die Kardiogenese auswirkt. Dementsprechend sollte nun untersucht werden, ob und inwieweit sich eine Makrophagenreduktion mittels Clodronatliposomen auf die Anzahl CD44-exprimierender Zellen im CAA auswirken würde.

Die hydrophilen Clodronat-Moleküle werden in einer liposomal verkapselten Form von den Makrophagen aufgenommen. Sobald die Liposomen mithilfe lysosomaler Phospholipasen verdaut werden, akkumuliert das Clodronat im Zytoplasma der Makrophagen. Ab einer bestimmten intrazellulären Clodronat-Konzentration werden die entsprechenden Makrophagen mittels Apoptose eliminiert (Martins-Neves et al. 2018). Eine Behandlung des murinen Herzgewebes mit Clodronatliposomen zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl CD44-exprimierender Zellen. Insgesamt liegt daher die Vermutung nahe, dass sich nur ein gewisser Anteil der CD44⁺ Zellen zu phagozytierenden Makrophagen differenziert.

Interessanterweise kam es unter Behandlung mit PBS-Kontrollliposomen nach 14-tägiger Kultivierung zu einer scheinbar höheren Anzahl von CD44⁺ Zellen. Möglicherweise beruht dieser Effekt auf einer Hypertrophie der phagozytierenden Zellen, nicht jedoch auf einer tatsächlichen Zellproliferation. Passend zu dieser Vermutung ließen sich in den entsprechenden Präparaten überdurchschnittlich große CD44⁺ Zellen nachweisen. Analog zu den Clodronatliposomen werden PBS-Kontrollliposomen von Makrophagen phagozytiert, enthalten jedoch nur phosphatgepufferte Salzlösung.

4.4.3 Unabhängigkeit der CD44⁺ Zellen vom Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist während der Embryogenese (bspw. bei der Entstehung der Gliedmaßen) von entscheidender Bedeutung, bleibt jedoch auch angesichts seiner wesentlichen Rolle bei der Stammzellenrenewal adulter Stamm- und Vorläuferzellen lebenslang unverzichtbar (Clevers 2006; Schmitt et al. 2015). Der Signalweg wird jedoch auch mit zahlreichen pathologischen Prozessen, insbesondere der Entstehung von Krebs (Karzinogenese), eng in Verbindung gebracht. Am prominentesten wurde dies für

Darmkrebs beschrieben, abnormale Wnt-Signale wurden jedoch auch bei zahlreichen anderen Krebsentitäten beobachtet (Zhan, Rindtorff, and Boutros 2017).

CD44 ist ein wichtiges Zielgen der Signalkaskade und scheint darüber hinaus selbst als potenzieller Modulator des Signalwegs zu fungieren (Schmitt et al. 2015). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss des Wnt-Pfades auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der CD44⁺ Zellen untersucht werden. Dabei kamen ein Aktivator (CHIR-99021) und ein Inhibitor (IWR-1) der Signalkaskade zum Einsatz. CHIR-99021 ist ein etablierter Antagonist des Wnt-Pfades (Schou 2001; Zhang et al. 2012; Tran and Zheng 2017), während IWR-1 als gängiger Inhibitor gilt (Martins-Neves et al. 2018).

Obwohl ein Zusammenhang zwischen dem Wnt-Signalweg und CD44 wiederholt von anderen Gruppen gezeigt wurde (Schmitt et al. 2015; Wei et al. 2019), hatte die Aktivierung bzw. Inhibierung der Signalkaskade im CAA keine Auswirkungen auf das Aussprossen von Zellen und die Proliferation der CD44⁺ Zellen. Dies legt die Vermutung nahe, dass andere Signalwege, zumindest bei diesem Versuchsaufbau, eine übergeordnete Rolle bei der Regulierung der gefäßwandresidenten Stamm- und Vorläuferzellen spielen.

Wnt-Signalwege scheinen jedoch bei der Entwicklung des Herzens (Kardiogenese) und auch bei der Reparatur ischämischer Myokardschäden eine wichtige Rolle zu spielen. Die Hemmung des Signalweges hat sich im Myokardinfarkt, durch eine Verbesserung des kardialen Remodelings, als vorteilhaft erwiesen. Wnt-Inhibitoren könnten daher in Zukunft bei der Therapie des Herzinfarktes zum Einsatz kommen (Fu, Wang, and Zeng 2019).

5. Zusammenfassung

Der Myokardinfarkt (MI) zählt in den Industrieländern zu einer der häufigsten Todesursachen. Trotz einiger Fortschritte in der kardioregenerativen Medizin kam es bislang noch zu keinem Durchbruch bei der regenerativen Therapie myokardialer Defekte. Die Identifizierung neuer endogener Stammzellen mit kardiogenem Potenzial und die Möglichkeit, deren Differenzierung gezielt zu steuern, würde einen Meilenstein in der kardioregenerativen Stammzelltherapie darstellen. In den letzten zwei Jahrzehnten konnten in der Gefäßwand, insb. in der vaskulären Adventitia, unterschiedliche Stamm- und Vorläuferzellpopulationen identifiziert werden, die sog. Gefäßwand-residenten Stammzellen (VW-SCs). Der Arbeitsgruppe von Prof. Ergün gelang es aus VW-SCs der Aorta adulter Mäuse, ohne jegliche genetische Manipulation, spontan schlagende Kardiomyozyten zu generieren. Zusätzlich fungiert die Gefäßwand als Quelle inflammatorischer Zellen, die essenziell für die kardiogene Differenzierung der VW-SCs zu sein scheinen.

Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten von $CD44^+CD31^-CD34^-$ VW-SCs zu untersuchen, um herauszufinden, inwieweit dieser Stammzelltyp eine endogene Generierung funktioneller Kardiomyozyten unterstützen könnte. Dabei wurde mit frisch infarzierten Mäuseherzen und unterschiedlichen Angiogeneseassays, dem Aortenringassay (ARA) und dem kardialen Angiogeneseassay (CAA), gearbeitet. Die Kultivierung des murinen Gewebes im Rahmen der Angiogeneseassays erfolgte unter Normoxie und unter Hypoxie, wodurch ein ischämischer Zustand simuliert werden sollte.

Es konnte gezeigt werden, dass es *in vivo* in ischämischen Arealen infarzierter Mäuseherzen zu einer hochsignifikanten Zunahme von $CD44^+$ Zellen kommt, was die Vermutung nahelegt, dass lokale $CD44^+$ VW-SCs entscheidend an der Infarktheilung beteiligt sind. Analog dazu konnte auch *in vitro* im CAA ein signifikanter Anstieg dieser Zellen gezeigt werden, welcher sich unter Hypoxie etwas ausgeprägter darstellte. Die beobachtete Zunahme der $CD44^+$ VW-SCs unter Normoxie wurde vermutlich bereits durch die Gewebsschädigung im Rahmen der vorherigen Präparation induziert. Hypoxie scheint also nicht der einzige Proliferationsstimulus dieser VW-SCs zu sein. Die

Teilungsfähigkeit der CD44⁺ Zellen ließ sich mittels Doppelfärbungen auf CD44 und Ki-67 demonstrieren. Weiterhin kam es in beiden Angiogeneseassays unter Hypoxie zu einem ausgeprägteren Aussprossen von Zellen (Sprouting).

Im ARA ließen sich aus CD44⁺ Zellen aktive F4/80⁺ Makrophagen generieren. Darüber hinaus ließ sich im CAA demonstrieren, dass sich CD44⁺ VW-SCs sowohl zu inflammatorischen iNOS⁺ M1- als auch zu anti-inflammatorischen IL-10⁺ M2-Makrophagen differenzieren können. Eine Beeinflussung dieses Gleichgewichtes zwischen pro- und anti-inflammatorischen Makrophagen könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Generierung schlagender Kardiomyozyten haben.

Zusätzlich wurde im CAA der Einfluss ausgewählter Faktoren untersucht. Unter Hinzunahme von VEGF-A kam es zu einer deutlichen Zunahme des kardialen Sproutings und der Proliferation der CD44⁺ Zellen. Folglich blieb unter Behandlung mit Lenvatinib, einem Multikinase-Inhibitor, der u. a. VEGF-Rezeptoren inhibiert, das Sprouting gänzlich aus, die Anzahl der CD44⁺ Zellen stagnierte und die VW-SCs verblieben in ihren physiologischen Nischen innerhalb der vaskulären Adventitia. Obwohl sich aus CD44⁺ VW-SCs reife Makrophagen generieren ließen, kam es unter Behandlung mit Clodronatliposomen zu keiner vollständigen Depletion der CD44⁺ Zellen. Dies deutet daraufhin, dass sich diese VW-SCs nur zu einem gewissen Anteil zu phagozytierenden Zellen differenzieren. Obwohl ein Zusammenhang zwischen dem Wnt-Signalweg und CD44 von anderen Arbeitsgruppen wiederholt gezeigt werden konnte, hatte die Aktivierung bzw. Inhibierung dieser Signalkaskade im CAA keine wesentlichen Auswirkungen auf das Sprouting und die Proliferation der CD44⁺ Zellen.

Warum es nach einem MI allenfalls in sehr geringem Umfang zu einer funktionellen Herzmuskelregeneration kommt ist weiterhin unklar. Die therapeutische Beeinflussung koronaradventitieller CD44⁺ VW-SCs und lokal-inflammatorischer Prozesse könnte dabei in Zukunft eine wichtige therapeutische Option der Behandlung des MI darstellen.

6. Summary

Myocardial infarction (MI) is one of the leading causes of death in industrialized countries. Despite some advances in cardio-regenerative medicine, there has been no breakthrough in regenerative therapy of myocardial defects. The identification of new endogenous stem cells with cardiogenic potential and the possibility to target their differentiation would represent a milestone in cardio-regenerative stem cell therapy. In the last two decades, different stem and progenitor cell populations have been identified in the vascular wall, especially in the vascular adventitia, the so-called vascular wall-resident stem cells (VW-SCs). The research group of Prof. Ergün succeeded in generating spontaneously beating cardiomyocytes from VW-SCs of adult mouse aorta without any genetic manipulation. In addition, the vessel wall acts as a source of inflammatory cells, which appear to be essential for cardiogenic differentiation of VW-SCs.

The aim of this work was to investigate the behavior of CD44⁺CD31⁻CD34⁻ VW-SCs to determine the extent to which this stem cell type might support endogenous generation of functional cardiomyocytes. Freshly infarcted mouse hearts and different angiogenesis assays, the aortic ring assay (ARA) and the cardiac angiogenesis assay (CAA), were used. Culturing of murine tissue in the angiogenesis assays was performed under normoxia and hypoxia simulating an ischemic state.

It could be shown that there is a highly significant increase of CD44⁺ cells *in vivo* in ischemic areas of infarcted mouse hearts, suggesting that local CD44⁺ VW-SCs are critically involved in infarct healing. Analogously, a significant increase of these cells was also shown *in vitro* in the CAA, which was somewhat more pronounced under hypoxia. The observed increase in CD44⁺ VW-SCs under normoxia was probably already induced by the tissue damage during the initial preparation. Thus, hypoxia does not seem to be the only proliferation stimulus of these VW-SCs. The ability of CD44⁺ cells to proliferate could be demonstrated by double immunostaining for CD44 and Ki-67. Furthermore, in both angiogenesis assays, a more pronounced sprouting of cells occurred under hypoxia.

In the ARA, active F4/80⁺ macrophages could be generated from CD44⁺ cells. Furthermore, in CAA, it could be demonstrated that CD44⁺ VW-SCs can differentiate into both inflammatory iNOS⁺ M1 and anti-inflammatory IL-10⁺ M2 macrophages. Influencing this balance between pro- and anti-inflammatory macrophages could have a critical impact on the generation of beating cardiomyocytes.

In addition, the influence of selected factors was investigated in CAA. With the addition of VEGF-A, there was a marked increase in cardiac sprouting and proliferation of CD44⁺ cells. Consequently, when treated with lenvatinib, a multikinase inhibitor that inhibits VEGF receptors, among others, sprouting was absent, altogether, the number of CD44⁺ cells stagnated, and VW-SCs remained in their physiological niches within the coronary vessel adventitia. Although mature macrophages could be generated from CD44⁺ VW-SCs, treatment with clodronate liposomes did not result in complete depletion of CD44⁺ cells. This suggests that these VW-SCs differentiate into phagocytosing cells only to a certain extent. Although a link between the Wnt signaling pathway and CD44 has been repeatedly shown by other research groups, activation or inhibition of this signaling cascade in the CAA did not have a significant effect on sprouting and proliferation of CD44⁺ cells.

Why functional myocardial regeneration occurs to a very small extent at best after MI remains unclear. Therapeutic manipulation of coronary adventitial CD44⁺ VW-SCs and local inflammatory processes may thereby represent an important therapeutic option for the treatment of MI in the future.

7. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Sanchez, C., M. Michael, and S. Pennings. 2018. 'Cardiac Stem Cells in the Postnatal Heart: Lessons from Development', *Stem Cells Int*, 2018: 1247857.
- Akira, S., T. Misawa, T. Satoh, and T. Saitoh. 2013. 'Macrophages control innate inflammation', *Diabetes Obes Metab*, 15 Suppl 3: 10-8.
- Alessandri, G., M. Girelli, G. Taccagni, A. Colombo, R. Nicosia, A. Caruso, M. Baronio, S. Pagano, L. Cova, and E. Parati. 2001. 'Human vasculogenesis ex vivo: embryonal aorta as a tool for isolation of endothelial cell progenitors', *Lab Invest*, 81: 875-85.
- Ambarus, C. A., K. C. Santegoets, L. van Bon, M. H. Wenink, P. P. Tak, T. R. Radstake, and D. L. Baeten. 2012. 'Soluble immune complexes shift the TLR-induced cytokine production of distinct polarized human macrophage subsets towards IL-10', *PLoS One*, 7: e35994.
- Anderson, C. F., and D. M. Mosser. 2002. 'A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage', *J Leukoc Biol*, 72: 101-6.
- Aplin, A. C., and R. F. Nicosia. 2015. 'The rat aortic ring model of angiogenesis', *Methods Mol Biol*, 1214: 255-64.
- Arackal, A., and K. Alsayouri. 2019. 'Histology, Heart.' in, *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Aspelund, A., M. R. Robciuc, S. Karaman, T. Makinen, and K. Alitalo. 2016. 'Lymphatic System in Cardiovascular Medicine', *Circ Res*, 118: 515-30.
- Atri, C., F. Z. Guerfali, and D. Laouini. 2018. 'Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases', *Int J Mol Sci*, 19.
- Aurora, A. B., E. R. Porrello, W. Tan, A. I. Mahmoud, J. A. Hill, R. Bassel-Duby, H. A. Sadek, and E. N. Olson. 2014. 'Macrophages are required for neonatal heart regeneration', *J Clin Invest*, 124: 1382-92.
- Austyn, J. M., and S. Gordon. 1981. 'F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage', *Eur J Immunol*, 11: 805-15.
- Badorff, C., R. P. Brandes, R. Popp, S. Rupp, C. Urbich, A. Aicher, I. Fleming, R. Busse, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2003. 'Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes', *Circulation*, 107: 1024-32.
- Barandon, L., T. Couffinhal, P. Dufourcq, J. Ezan, P. Costet, D. Daret, C. Deville, and C. Duplaa. 2004. 'Frizzled A, a novel angiogenic factor: promises for cardiac repair', *Eur J Cardiothorac Surg*, 25: 76-83.
- Bergmann, O., R. D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabe-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B. A. Buchholz, H. Druid, S. Jovinge, and J. Frisen. 2009. 'Evidence for cardiomyocyte renewal in humans', *Science*, 324: 98-102.
- Buja, L. M. 2013. 'The pathobiology of acute coronary syndromes: clinical implications and central role of the mitochondria', *Tex Heart Inst J*, 40: 221-8.
- Campagnolo, P., D. Cesselli, A. Al Haj Zen, A. P. Beltrami, N. Krankel, R. Katare, G. Angelini, C. Emanuelli, and P. Madeddu. 2010. 'Human adult vena saphena contains perivascular progenitor cells endowed with clonogenic and proangiogenic potential', *Circulation*, 121: 1735-45.

- Cao, G., R. C. Savani, M. Fehrenbach, C. Lyons, L. Zhang, G. Coukos, and H. M. Delisser. 2006. 'Involvement of endothelial CD44 during in vivo angiogenesis', *Am J Pathol*, 169: 325-36.
- Carlson, S., J. Trial, C. Soeller, and M. L. Entman. 2011. 'Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction', *Cardiovasc Res*, 91: 99-107.
- Carmeliet, P. 2005. 'Angiogenesis in life, disease and medicine', *Nature*, 438: 932-6.
- Celada, A., P. W. Gray, E. Rinderknecht, and R. D. Schreiber. 1984. 'Evidence for a gamma-interferon receptor that regulates macrophage tumoricidal activity', *J Exp Med*, 160: 55-74.
- Clevers, H. 2006. 'Wnt/beta-catenin signaling in development and disease', *Cell*, 127: 469-80.
- Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi, and B. Staels. 2014. 'Macrophage phenotypes in atherosclerosis', *Immunol Rev*, 262: 153-66.
- Corselli, M., C. W. Chen, B. Sun, S. Yap, J. P. Rubin, and B. Peault. 2012. 'The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells', *Stem Cells Dev*, 21: 1299-308.
- Cuff, C. A., D. Kothapalli, I. Azonobi, S. Chun, Y. Zhang, R. Belkin, C. Yeh, A. Secreto, R. K. Assoian, D. J. Rader, and E. Pure. 2001. 'The adhesion receptor CD44 promotes atherosclerosis by mediating inflammatory cell recruitment and vascular cell activation', *J Clin Invest*, 108: 1031-40.
- de Couto, G., W. Liu, E. Tseliou, B. Sun, N. Makkar, H. Kanazawa, M. Ardit, and E. Marban. 2015. 'Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction', *J Clin Invest*, 125: 3147-62.
- De Paoli, F., B. Staels, and G. Chinetti-Gbaguidi. 2014. 'Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis', *Circ J*, 78: 1775-81.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj Prockop, and E. Horwitz. 2006. 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, 8: 315-7.
- Duluc, D., Y. Delneste, F. Tan, M. P. Moles, L. Grimaud, J. Lenoir, L. Preisser, I. Anegon, L. Catala, N. Ifrah, P. Descamps, E. Gamelin, H. Gascan, M. Hebbar, and P. Jeannin. 2007. 'Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells', *Blood*, 110: 4319-30.
- Efe, J. A., S. Hilcove, J. Kim, H. Zhou, K. Ouyang, G. Wang, J. Chen, and S. Ding. 2011. 'Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy', *Nat Cell Biol*, 13: 215-22.
- Eghbalzadeh, K., L. Georgi, T. Louis, H. Zhao, U. Keser, C. Weber, M. Mollenhauer, A. Conforti, T. Wahlers, and A. Paunel-Gorgulu. 2019. 'Compromised Anti-inflammatory Action of Neutrophil Extracellular Traps in PAD4-Deficient Mice Contributes to Aggravated Acute Inflammation After Myocardial Infarction', *Front Immunol*, 10: 2313.
- Ellison-Hughes, G. M., and P. Madeddu. 2017. 'Exploring pericyte and cardiac stem cell secretome unveils new tactics for drug discovery', *Pharmacol Ther*, 171: 1-12.

- Ergun, S., D. Tilki, and D. Klein. 2011. 'Vascular wall as a reservoir for different types of stem and progenitor cells', *Antioxid Redox Signal*, 15: 981-95.
- Fang, R., S. Qiao, Y. Liu, Q. Meng, X. Chen, B. Song, X. Hou, and W. Tian. 2015. 'Sustained co-delivery of BIO and IGF-1 by a novel hybrid hydrogel system to stimulate endogenous cardiac repair in myocardial infarcted rat hearts', *Int J Nanomedicine*, 10: 4691-703.
- Fang, S., J. Wei, N. Pentimikko, H. Leinonen, and P. Salven. 2012. 'Generation of functional blood vessels from a single c-kit+ adult vascular endothelial stem cell', *PLoS Biol*, 10: e1001407.
- Ferrante, C. J., and S. J. Leibovich. 2012. 'Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing', *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1: 10-16.
- Folkman, J. 2007. 'Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?', *Nat Rev Drug Discov*, 6: 273-86.
- Forbes, S. J., and N. Rosenthal. 2014. 'Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy', *Nat Med*, 20: 857-69.
- Frangogiannis, N. G. 2014. 'The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling', *Nat Rev Cardiol*, 11: 255-65.
- Frantz, S., U. Hofmann, D. Fraccarollo, A. Schafer, S. Kranepuhl, I. Hagedorn, B. Nieswandt, M. Nahrendorf, H. Wagner, B. Bayer, C. Pachel, M. P. Schon, S. Kneitz, T. Bobinger, F. Weidemann, G. Ertl, and J. Bauersachs. 2013. 'Monocytes/macrophages prevent healing defects and left ventricular thrombus formation after myocardial infarction', *FASEB J*, 27: 871-81.
- Fu, W. B., W. E. Wang, and C. Y. Zeng. 2019. 'Wnt signaling pathways in myocardial infarction and the therapeutic effects of Wnt pathway inhibitors', *Acta Pharmacol Sin*, 40: 9-12.
- Goktepe, S., O. J. Abilez, K. K. Parker, and E. Kuhl. 2010. 'A multiscale model for eccentric and concentric cardiac growth through sarcomerogenesis', *J Theor Biol*, 265: 433-42.
- Goodwin, A. M. 2007. 'In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents', *Microvasc Res*, 74: 172-83.
- Govindaraju, P., L. Todd, S. Shetye, J. Monslow, and E. Pure. 2019. 'CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing', *Matrix Biol*, 75-76: 314-30.
- Graff, J. W., A. M. Dickson, G. Clay, A. P. McCaffrey, and M. E. Wilson. 2012. 'Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes', *J Biol Chem*, 287: 21816-25.
- Hamann, J., N. Koning, W. Pouwels, L. H. Ulfman, M. van Eijk, M. Stacey, H. H. Lin, S. Gordon, and M. J. Kwakkenbos. 2007. 'EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor', *Eur J Immunol*, 37: 2797-802.
- Hirota, K., and G. L. Semenza. 2006. 'Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1', *Crit Rev Oncol Hematol*, 59: 15-26.
- Hu, X., and L. B. Ivashkiv. 2009. 'Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases', *Immunity*, 31: 539-50.

- Hu, Y., and Q. Xu. 2011. 'Adventitial biology: differentiation and function', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31: 1523-9.
- Hu, Y., Z. Zhang, E. Torsney, A. R. Afzal, F. Davison, B. Metzler, and Q. Xu. 2004. 'Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice', *J Clin Invest*, 113: 1258-65.
- Huebener, P., T. Abou-Khamis, P. Zymek, M. Bujak, X. Ying, K. Chatila, S. Haudek, G. Thakker, and N. G. Frangogiannis. 2008. 'CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response', *J Immunol*, 180: 2625-33.
- Huet, S., H. Groux, B. Caillou, H. Valentin, A. M. Prieur, and A. Bernard. 1989. 'CD44 contributes to T cell activation', *J Immunol*, 143: 798-801.
- Hulsmans, M., S. Clauss, L. Xiao, A. D. Aguirre, K. R. King, A. Hanley, W. J. Hucker, E. M. Wulfers, G. Seemann, G. Courties, Y. Iwamoto, Y. Sun, A. J. Savol, H. B. Sager, K. J. Lavine, G. A. Fishbein, D. E. Capen, N. Da Silva, L. Miquerol, H. Wakimoto, C. E. Seidman, J. G. Seidman, R. I. Sadreyev, K. Naxerova, R. N. Mitchell, D. Brown, P. Libby, R. Weissleder, F. K. Swirski, P. Kohl, C. Vinegoni, D. J. Milan, P. T. Ellinor, and M. Nahrendorf. 2017. 'Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart', *Cell*, 169: 510-22 e20.
- Huusko, J., M. Merentie, M. H. Dijkstra, M. M. Ryhanen, H. Karvinen, T. T. Rissanen, M. Vanwildemeersch, M. Hedman, J. Lipponen, S. E. Heinonen, U. Eriksson, M. Shibuya, and S. Yla-Herttuala. 2010. 'The effects of VEGF-R1 and VEGF-R2 ligands on angiogenic responses and left ventricular function in mice', *Cardiovasc Res*, 86: 122-30.
- Ibanez, B., S. James, S. Agewall, M. J. Antunes, C. Bucciarelli-Ducci, H. Bueno, A. L. P. Caforio, F. Crea, J. A. Goudevenos, S. Halvorsen, G. Hindricks, A. Kastrati, M. J. Lenzen, E. Prescott, M. Roffi, M. Valgimigli, C. Varenhorst, P. Vranckx, and P. Widimsky. 2018. '2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)', *Eur Heart J*, 39: 119-77.
- Ingram, D. A., L. E. Mead, D. B. Moore, W. Woodard, A. Fenoglio, and M. C. Yoder. 2005. 'Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells', *Blood*, 105: 2783-6.
- Invernici, G., P. Madeddu, C. Emanuelli, E. A. Parati, and G. Alessandri. 2008. 'Human fetal aorta-derived vascular progenitor cells: identification and potential application in ischemic diseases', *Cytotechnology*, 58: 43-7.
- Kingery, J. R., T. Hamid, R. K. Lewis, M. A. Ismahil, S. S. Bansal, G. Rokosh, T. M. Townes, S. T. Ildstad, S. P. Jones, and S. D. Prabhu. 2017. 'Leukocyte iNOS is required for inflammation and pathological remodeling in ischemic heart failure', *Basic Res Cardiol*, 112: 19.
- Klein, D., M. Benchellal, V. Kleff, H. G. Jakob, and S. Ergun. 2013. 'Hox genes are involved in vascular wall-resident multipotent stem cell differentiation into smooth muscle cells', *Sci Rep*, 3: 2178.

- Klein, D., N. Meissner, V. Kleff, H. Jastrow, M. Yamaguchi, S. Ergun, and V. Jendrossek. 2014. 'Nestin(+) tissue-resident multipotent stem cells contribute to tumor progression by differentiating into pericytes and smooth muscle cells resulting in blood vessel remodeling', *Front Oncol*, 4: 169.
- Klein, D., P. Weisshardt, V. Kleff, H. Jastrow, H. G. Jakob, and S. Ergun. 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.
- Klopsch, C., A. Skorska, M. Ludwig, R. Gaebel, H. Lemcke, G. Kleiner, M. Beyer, B. Vollmar, R. David, and G. Steinhoff. 2017. 'Cardiac Mesenchymal Stem Cells Proliferate Early in the Ischemic Heart', *Eur Surg Res*, 58: 341-53.
- Komiya, Y., and R. Habas. 2008. 'Wnt signal transduction pathways', *Organogenesis*, 4: 68-75.
- Krautler, N. J., V. Kana, J. Kranich, Y. Tian, D. Perera, D. Lemm, P. Schwarz, A. Armulik, J. L. Browning, M. Tallquist, T. Buch, J. B. Oliveira-Martins, C. Zhu, M. Hermann, U. Wagner, R. Brink, M. Heikenwalder, and A. Aguzzi. 2012. 'Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors', *Cell*, 150: 194-206.
- Kreider, T., R. M. Anthony, J. F. Urban, Jr., and W. C. Gause. 2007. 'Alternatively activated macrophages in helminth infections', *Curr Opin Immunol*, 19: 448-53.
- Krishnamurthy, K., G. Wang, D. Rokhfeld, and E. Bieberich. 2008. 'Deoxycholate promotes survival of breast cancer cells by reducing the level of pro-apoptotic ceramide', *Breast Cancer Res*, 10: R106.
- Krzyszczuk, P., R. Schloss, A. Palmer, and F. Berthiaume. 2018. 'The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes', *Front Physiol*, 9: 419.
- Lin, C. J., C. Y. Lin, C. H. Chen, B. Zhou, and C. P. Chang. 2012. 'Partitioning the heart: mechanisms of cardiac septation and valve development', *Development*, 139: 3277-99.
- Lunde, K., S. Solheim, S. Aakhus, H. Arnesen, M. Abdelnoor, T. Egeland, K. Endresen, A. Ilebakk, A. Mangschau, J. G. Fjeld, H. J. Smith, E. Taraldsrud, H. K. Groggaard, R. Bjornerheim, M. Brekke, C. Muller, E. Hopp, A. Ragnarsson, J. E. Brinchmann, and K. Forfang. 2006. 'Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction', *N Engl J Med*, 355: 1199-209.
- Ma, Y., A. J. Mouton, and M. L. Lindsey. 2018. 'Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction', *Transl Res*, 191: 15-28.
- Mackaness, G. B. 1962. 'Cellular resistance to infection', *J Exp Med*, 116: 381-406.
- Majesky, M. W., X. R. Dong, V. Hoglund, G. Daum, and W. M. Mahoney, Jr. 2012. 'The adventitia: a progenitor cell niche for the vessel wall', *Cells Tissues Organs*, 195: 73-81.
- Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati. 2004. 'The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization', *Trends Immunol*, 25: 677-86.
- Martinez, F. O., and S. Gordon. 2014. 'The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment', *F1000Prime Rep*, 6: 13.

- Martins-Neves, S. R., D. I. Paiva-Oliveira, C. Fontes-Ribeiro, Jvmg Bovee, A. M. Cleton-Jansen, and C. M. F. Gomes. 2018. 'IWR-1, a tankyrase inhibitor, attenuates Wnt/beta-catenin signaling in cancer stem-like cells and inhibits in vivo the growth of a subcutaneous human osteosarcoma xenograft', *Cancer Lett*, 414: 1-15.
- McMahon, A. P., P. W. Ingham, and C. J. Tabin. 2003. 'Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling', *Curr Top Dev Biol*, 53: 1-114.
- Mekala, S. R., P. Worsdorfer, J. Bauer, O. Stoll, N. Wagner, L. Reeh, K. Loew, G. Eckner, C. K. Kwok, E. Wischmeyer, M. E. Dickinson, H. Schulze, D. Stegner, R. A. Benndorf, F. Edenhofer, V. Pfeiffer, S. Kuerten, S. Frantz, and S. Ergun. 2018. 'Generation of Cardiomyocytes From Vascular Adventitia-Resident Stem Cells', *Circ Res*, 123: 686-99.
- Mills, C. D., K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill. 2000. 'M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm', *J Immunol*, 164: 6166-73.
- Mishra, M. N., V. Chandavarkar, R. Sharma, and D. Bhargava. 2019. 'Structure, function and role of CD44 in neoplasia', *J Oral Maxillofac Pathol*, 23: 267-72.
- Moon, C., S. Heo, K. B. Sim, and T. Shin. 2004. 'Upregulation of CD44 expression in the spinal cords of rats with clip compression injury', *Neurosci Lett*, 367: 133-6.
- Morath, I., T. N. Hartmann, and V. Orian-Rousseau. 2016. 'CD44: More than a mere stem cell marker', *Int J Biochem Cell Biol*, 81: 166-73.
- Mortality, G. B. D., and Collaborators Causes of Death. 2016. 'Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015', *Lancet*, 388: 1459-544.
- Mosser, D. M., and J. P. Edwards. 2008. 'Exploring the full spectrum of macrophage activation', *Nat Rev Immunol*, 8: 958-69.
- Naito, H., H. Kidoya, S. Sakimoto, T. Wakabayashi, and N. Takakura. 2012. 'Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels', *EMBO J*, 31: 842-55.
- Narhoveva, D. A., R. Vukmirovic, M. E. Davis, R. D. Kamm, and R. T. Lee. 2004. 'Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration', *Circulation*, 110: 962-8.
- Nau, G. J., J. F. Richmond, A. Schlesinger, E. G. Jennings, E. S. Lander, and R. A. Young. 2002. 'Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 1503-8.
- Nicosia, R. F. 2009. 'The aortic ring model of angiogenesis: a quarter century of search and discovery', *J Cell Mol Med*, 13: 4113-36.
- O'Rourke, S. A., A. Dunne, and M. G. Monaghan. 2019. 'The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling', *Front Cardiovasc Med*, 6: 101.
- Olivetti, G., E. Cigola, R. Maestri, D. Corradi, C. Lagrasta, S. R. Gambert, and P. Anversa. 1996. 'Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart', *J Mol Cell Cardiol*, 28: 1463-77.

- Orian-Rousseau, V. 2010. 'CD44, a therapeutic target for metastasising tumours', *Eur J Cancer*, 46: 1271-7.
- Orlandi, A. 2015. 'The contribution of resident vascular stem cells to arterial pathology', *Int J Stem Cells*, 8: 9-17.
- Pace, J. L., S. W. Russell, R. D. Schreiber, A. Altman, and D. H. Katz. 1983. 'Macrophage activation: priming activity from a T-cell hybridoma is attributable to interferon-gamma', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 3782-6.
- Passman, J. N., X. R. Dong, S. P. Wu, C. T. Maguire, K. A. Hogan, V. L. Bautch, and M. W. Majesky. 2008. 'A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 9349-54.
- Psaltis, P. J., A. S. Puranik, D. B. Spoon, C. D. Chue, S. J. Hoffman, T. A. Witt, S. Delacroix, L. S. Kleppe, C. S. Mueske, S. Pan, R. Gulati, and R. D. Simari. 2014. 'Characterization of a resident population of adventitial macrophage progenitor cells in postnatal vasculature', *Circ Res*, 115: 364-75.
- Reddy, K., A. Khaliq, and R. J. Henning. 2015. 'Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction', *World J Cardiol*, 7: 243-76.
- Rissanen, T. T., P. Korpisalo, J. E. Markkanen, T. Liimatainen, M. R. Orden, I. Kholova, A. de Goede, T. Heikura, O. H. Grohn, and S. Yla-Herttuala. 2005. 'Blood flow remodels growing vasculature during vascular endothelial growth factor gene therapy and determines between capillary arterialization and sprouting angiogenesis', *Circulation*, 112: 3937-46.
- Rodriguez, E. R., and C. D. Tan. 2017. 'Structure and Anatomy of the Human Pericardium', *Prog Cardiovasc Dis*, 59: 327-40.
- Roszer, T. 2015. 'Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms', *Mediators Inflamm*, 2015: 816460.
- Rutanen, J., T. T. Rissanen, J. E. Markkanen, M. Gruchala, P. Silvennoinen, A. Kivela, A. Hedman, M. Hedman, T. Heikura, M. R. Orden, S. A. Stacker, M. G. Achen, J. Hartikainen, and S. Yla-Herttuala. 2004. 'Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart', *Circulation*, 109: 1029-35.
- Schmitt, M., M. Metzger, D. Gradl, G. Davidson, and V. Orian-Rousseau. 2015. 'CD44 functions in Wnt signaling by regulating LRP6 localization and activation', *Cell Death Differ*, 22: 677-89.
- Schou, M. 2001. 'Lithium treatment at 52', *J Affect Disord*, 67: 21-32.
- Shimada, T., H. Kawazato, A. Yasuda, N. Ono, and K. Sueda. 2004. 'Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart', *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 280: 940-51.
- Sica, A., and A. Mantovani. 2012. 'Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas', *J Clin Invest*, 122: 787-95.
- Smith, T. G., P. A. Robbins, and P. J. Ratcliffe. 2008. 'The human side of hypoxia-inducible factor', *Br J Haematol*, 141: 325-34.
- Sneath, R. J., and D. C. Mangham. 1998. 'The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia', *Mol Pathol*, 51: 191-200.

- Stenmark, K. R., M. E. Yeager, K. C. El Kasmi, E. Nozik-Grayck, E. V. Gerasimovskaya, M. Li, S. R. Riddle, and M. G. Frid. 2013. 'The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function', *Annu Rev Physiol*, 75: 23-47.
- Sunakawa, Y., S. Stintzing, S. Cao, V. Heinemann, C. Cremolini, A. Falcone, D. Yang, W. Zhang, Y. Ning, S. Stremitzer, S. Matsusaka, S. Yamauchi, A. Parekh, S. Okazaki, M. D. Berger, S. Graver, A. Mendez, S. J. Scherer, F. Loupakis, and H. J. Lenz. 2015. 'Variations in genes regulating tumor-associated macrophages (TAMs) to predict outcomes of bevacizumab-based treatment in patients with metastatic colorectal cancer: results from TRIBE and FIRE3 trials', *Ann Oncol*, 26: 2450-6.
- Tang, Z., A. Wang, F. Yuan, Z. Yan, B. Liu, J. S. Chu, J. A. Helms, and S. Li. 2012. 'Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases', *Nat Commun*, 3: 875.
- Tavian, M., B. Zheng, E. Oberlin, M. Crisan, B. Sun, J. Huard, and B. Peault. 2005. 'The vascular wall as a source of stem cells', *Ann N Y Acad Sci*, 1044: 41-50.
- Thygesen, K., J. S. Alpert, A. S. Jaffe, M. L. Simoons, B. R. Chaitman, H. D. White, E. S. C. Accf A. H. A. W. H. F. Task Force for Universal Definition of Myocardial Infarction Joint, Chairpersons Authors/Task Force Members, K. Thygesen, J. S. Alpert, H. D. White, Subcommittee Biomarker, A. S. Jaffe, H. A. Katus, F. S. Apple, B. Lindahl, D. A. Morrow, E. C. G. Subcommittee, B. R. Chaitman, P. M. Clemmensen, P. Johanson, H. Hod, Subcommittee Imaging, R. Underwood, J. J. Bax, J. J. Bonow, F. Pinto, R. J. Gibbons, Subcommittee Classification, K. A. Fox, D. Atar, L. K. Newby, M. Galvani, C. W. Hamm, Subcommittee Intervention, B. F. Uretsky, P. G. Steg, W. Wijns, J. P. Bassand, P. Menasche, J. Ravkilde, Trials, Subcommittee Registries, E. M. Ohman, E. M. Antman, L. C. Wallentin, P. W. Armstrong, M. L. Simoons, Trials, Subcommittee Registries, J. L. Januzzi, M. S. Nieminen, M. Gheorghide, G. Filippatos, Trials, Subcommittee Registries, R. V. Luepker, S. P. Fortmann, W. D. Rosamond, D. Levy, D. Wood, Trials, Subcommittee Registries, S. C. Smith, D. Hu, J. L. Lopez-Sendon, R. M. Robertson, D. Weaver, M. Tendera, A. A. Bove, A. N. Parkhomenko, E. J. Vasilieva, S. Mendis, E. S. C. Committee for Practice Guidelines, J. J. Bax, H. Baumgartner, C. Ceconi, V. Dean, C. Deaton, R. Fagard, C. Funck-Brentano, D. Hasdai, A. Hoes, P. Kirchhof, J. Knuuti, P. Kolh, T. McDonagh, C. Moulin, B. A. Popescu, Z. Reiner, U. Sechtem, P. A. Sirnes, M. Tendera, A. Torbicki, A. Vahanian, S. Windecker, Reviewers Document, J. Morais, C. Aguiar, W. Almahmeed, D. O. Arnar, F. Barili, K. D. Bloch, A. F. Bolger, H. E. Botker, B. Bozkurt, R. Bugiardini, C. Cannon, J. de Lemos, F. R. Eberli, E. Escobar, M. Hlatky, S. James, K. B. Kern, D. J. Moliterno, C. Mueller, A. N. Neskovic, B. M. Pieske, S. P. Schulman, R. F. Storey, K. A. Taubert, P. Vranckx, and D. R. Wagner. 2012. 'Third universal definition of myocardial infarction', *J Am Coll Cardiol*, 60: 1581-98.
- Tilki, D., H. P. Hohn, B. Ergun, S. Rafii, and S. Ergun. 2009. 'Emerging biology of vascular wall progenitor cells in health and disease', *Trends Mol Med*, 15: 501-9.
- Tintut, Y., Z. Alfonso, T. Saini, K. Radcliff, K. Watson, K. Bostrom, and L. L. Demer. 2003. 'Multilineage potential of cells from the artery wall', *Circulation*, 108: 2505-10.
- Tohyama, O., J. Matsui, K. Kodama, N. Hata-Sugi, T. Kimura, K. Okamoto, Y. Minoshima, M. Iwata, and Y. Funahashi. 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: 638747.
- Torsney, E., and Q. Xu. 2011. 'Resident vascular progenitor cells', *J Mol Cell Cardiol*, 50: 304-11.
- Tran, F. H., and J. J. Zheng. 2017. 'Modulating the wnt signaling pathway with small molecules', *Protein Sci*, 26: 650-61.
- Trochon, V., C. Mabilat, P. Bertrand, Y. Legrand, F. Smadja-Joffe, C. Soria, B. Delpuch, and H. Lu. 1996. 'Evidence of involvement of CD44 in endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis in vitro', *Int J Cancer*, 66: 664-8.
- Vono, R., G. Spinetti, M. Governador, and P. Madeddu. 2012. 'What's new in regenerative medicine: split up of the mesenchymal stem cell family promises new hope for cardiovascular repair', *J Cardiovasc Transl Res*, 5: 689-99.
- Wang, L. X., S. X. Zhang, H. J. Wu, X. L. Rong, and J. Guo. 2019. 'M2b macrophage polarization and its roles in diseases', *J Leukoc Biol*, 106: 345-58.
- Wang, Q., H. Ni, L. Lan, X. Wei, R. Xiang, and Y. Wang. 2010. 'Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages', *Cell Res*, 20: 701-12.
- Wei, C. Y., M. X. Zhu, Y. W. Yang, P. F. Zhang, X. Yang, R. Peng, C. Gao, J. C. Lu, L. Wang, X. Y. Deng, N. H. Lu, F. Z. Qi, and J. Y. Gu. 2019. 'Downregulation of RNF128 activates Wnt/beta-catenin signaling to induce cellular EMT and stemness via CD44 and CTTN ubiquitination in melanoma', *J Hematol Oncol*, 12: 21.
- Wiegering, A., D. Korb, A. Thalheimer, U. Kammerer, J. Allmanritter, N. Matthes, M. Linnebacher, N. Schlegel, I. Klein, S. Ergun, C. T. Germer, and C. Otto. 2014. 'E7080 (lenvatinib), a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, demonstrates antitumor activities against colorectal cancer xenografts', *Neoplasia*, 16: 972-81.
- Wilkins, S. E., M. I. Abboud, R. L. Hancock, and C. J. Schofield. 2016. 'Targeting Protein-Protein Interactions in the HIF System', *ChemMedChem*, 11: 773-86.
- Wong, M. M., B. Winkler, E. Karamariti, X. Wang, B. Yu, R. Simpson, T. Chen, A. Margariti, and Q. Xu. 2013. 'Sirolimus stimulates vascular stem/progenitor cell migration and differentiation into smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase/beta-catenin signaling pathway', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33: 2397-406.
- Worsdorfer, P., S. R. Mekala, J. Bauer, F. Edenhofer, S. Kuerten, and S. Ergun. 2017. 'The vascular adventitia: An endogenous, omnipresent source of stem cells in the body', *Pharmacol Ther*, 171: 13-29.
- Wu, H., J. B. Xu, Y. L. He, J. J. Peng, X. H. Zhang, C. Q. Chen, W. Li, and S. R. Cai. 2012. 'Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and lymphangiogenesis of gastric cancer', *J Surg Oncol*, 106: 462-8.
- Wynn, T. A., A. Chawla, and J. W. Pollard. 2013. 'Macrophage biology in development, homeostasis and disease', *Nature*, 496: 445-55.
- Wynn, T. A., and K. M. Vannella. 2016. 'Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis', *Immunity*, 44: 450-62.
- Xue, J., S. V. Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M. R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T. C. Freeman, T. Ulas, and J. L.

- Schultze. 2014. 'Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation', *Immunity*, 40: 274-88.
- Yla-Herttuala, S., T. T. Rissanen, I. Vajanto, and J. Hartikainen. 2007. 'Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine', *J Am Coll Cardiol*, 49: 1015-26.
- Yu, B., M. M. Wong, C. M. Potter, R. M. Simpson, E. Karamariti, Z. Zhang, L. Zeng, D. Warren, Y. Hu, W. Wang, and Q. Xu. 2016. 'Vascular Stem/Progenitor Cell Migration Induced by Smooth Muscle Cell-Derived Chemokine (C-C Motif) Ligand 2 and Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1 Contributes to Neointima Formation', *Stem Cells*, 34: 2368-80.
- Yue, Y., X. Yang, K. Feng, L. Wang, J. Hou, B. Mei, H. Qin, M. Liang, G. Chen, and Z. Wu. 2017. 'M2b macrophages reduce early reperfusion injury after myocardial ischemia in mice: A predominant role of inhibiting apoptosis via A20', *Int J Cardiol*, 245: 228-35.
- Zengin, E., F. Chalajour, U. M. Gehling, W. D. Ito, H. Treede, H. Lauke, J. Weil, H. Reichenspurner, N. Kilic, and S. Ergun. 2006. 'Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis', *Development*, 133: 1543-51.
- Zhan, T., N. Rindtorff, and M. Boutros. 2017. 'Wnt signaling in cancer', *Oncogene*, 36: 1461-73.
- Zhang, L., and Q. Xu. 2014. 'Stem/Progenitor cells in vascular regeneration', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 1114-9.
- Zhang, M., J. Shi, Y. Huang, and L. Lai. 2012. 'Expression of canonical WNT/beta-CATENIN signaling components in the developing human lung', *BMC Dev Biol*, 12: 21.
- Zhao, G., R. S. Shaik, H. Zhao, J. Beagle, S. Kuo, and C. A. Hales. 2011. 'Low molecular weight (LMW) heparin inhibits injury-induced femoral artery remodeling in mouse via upregulating CD44 expression', *J Vasc Surg*, 53: 1359-67 e3.
- Zhao, T., W. Zhao, Y. Chen, R. A. Ahokas, and Y. Sun. 2010. 'Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A: role on cardiac angiogenesis following myocardial infarction', *Microvasc Res*, 80: 188-94.
- Zimmet, H., P. Porapakham, P. Porapakham, Y. Sata, S. J. Haas, S. Itescu, A. Forbes, and H. Krum. 2012. 'Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials', *Eur J Heart Fail*, 14: 91-105.

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Histologischer Aufbau der Gefäßwand	2
Abb. 2:	Schema der ABC-Technik	29
Abb. 3:	Quantifizierung des Sproutings im ARA und im CAA	33
Abb. 4:	Quantifizierung positiver Zellen	34
Abb. 5:	Sprouting im ARA und im CAA unter Normoxie und Hypoxie	36
Abb. 6:	CD44 ⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard	38
Abb. 7:	Proliferation von CD44 ⁺ Zellen im infarzierten Mäusemyokard	39
Abb. 8:	Proliferation CD44 ⁺ Zellen im CAA	41
Abb. 9:	Quantifizierung von CD44 ⁺ und CD44 ⁺ Ki-67 ⁺ Zellen im CAA	42
Abb. 10:	CD44 ⁺ F4/80 ⁺ Zellen im ARA	43
Abb. 11:	CD44 ⁺ iNOS ⁺ Zellen im CAA	45
Abb. 12:	CD44 ⁺ IL-10 ⁺ Zellen im CAA	46
Abb. 13:	Sprouting im CAA unter VEGF-A und Lenvatinib	48
Abb. 14:	CD44 ⁺ Zellen im CAA unter VEGF-A und Lenvatinib	49
Abb. 15:	Sprouting im CAA unter Makrophagendepletion	51
Abb. 16:	CD44 ⁺ Zellen im CAA unter Makrophagendepletion	52
Abb. 17:	Sprouting im CAA unter Wnt-Aktivierung und -Inhibierung	53
Abb. 18:	Eigenschaften von CD44 ⁺ VW-SCs	59

9. Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
AB-Komplex	Avidin-Biotin-Komplex
ARA	Aortenringassay (aortic ring assay)
BG	Blutgefäß
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CAA	kardialer Angiogeneseassay (cardiac angiogenesis assay)
CD	Cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM Medium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
E7080	Lenvatinib
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
GOD	Glucose-Oxidase
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
IL-10	Interleukin-10
IL-13	Interleukin-13

IL-4	Interleukin-4
inkl.	inklusive
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
insb.	insbesondere
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LV	linker Ventrikel
MEM	Minimum Essential Medium
MI	Myokardinfarkt
min	Minute(n)
mm	Millimeter
mM	millimolar
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	normales Ziegen Serum
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NiSO ₄	Nickel(II)-sulfat
O ₂	Sauerstoff
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PFA	Paraformaldehyd
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel
Sca1	Stammzellen-Antigen-1 (stem cells antigen-1)

Shh	Sonic-Hedgehog-Signalweg
SM	Standardmedium
sog.	sogenannt
TLR	Toll-like-Rezeptor
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGF-A	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VW-SC	Gefäßwand-residente Stammzelle
ZEMM	Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Süleyman Ergün bedanken, der mir die Erarbeitung dieses spannenden Themas ermöglichte und mir stets mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Frau Prof. Kristina Lorenz und Herrn Prof. Christoph Maack danke ich für die gute Mitbetreuung im Rahmen des Betreuungskomitees.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jochen Bauer, der mir mit unerschöpflicher Geduld stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Danken möchte ich auch dem Laborpersonal. Die engagierte und tatkräftige Hilfsbereitschaft meiner Laborkolleginnen und -kollegen hat im Wesentlichen zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich mich in diesem Zusammenhang auch bei Frau Erna Kleinschroth bedanken, die mir durch ihre guten Ratschläge stets eine große Stütze war.

Bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der *Graduate School of Life Sciences* bedanke ich mich für die gute Mitbetreuung. Das strukturierte Promotionsprogramm der Graduiertenschule war mir beim Bearbeiten meines Themas eine große Hilfe.

Meiner Freundin danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit. *Last but not least* möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mich bei meinem privaten und beruflichen Werdegang beständig begleitet und unterstützt haben.