

## Inhaltsverzeichnis

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

---

## Inhaltsverzeichnis

---

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

---

Inhaltsverzeichnis

---

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

---

## Inhaltsverzeichnis

---

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

---

Inhaltsverzeichnis

---

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