

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis _____ **I**

Abbildungsverzeichnis _____ **VII**

Tabellenverzeichnis _____ **IX**

Abkürzungsverzeichnis _____ **XI**

1. Einleitung _____ **1**

2. Literatur _____ **3**

2.1. Multipotente mesenchymale Stammzellen _____ **3**

 2.1.1. Definition und Einteilung von Stammzellen _____ 3

 2.1.2. Charakterisierung von MSCs _____ 5

 2.1.2.1. Spezifisches Markerprofil _____ 5

 2.1.2.2. Tripotentes Differenzierungspotential _____ 7

 2.1.2.2.1. Adipogene Differenzierung _____ 8

 2.1.2.2.2. Osteogene Differenzierung _____ 8

 2.1.2.2.3. Chondrogene Differenzierung _____ 9

 2.1.2.3. Plastikadhärenz _____ 10

 2.1.3. Isolierung und Kultivierung von MSCs aus Fettgewebe _____ 10

 2.1.3.1. Fettgewebe _____ 10

 2.1.3.2. Isolierung _____ 10

 2.1.3.3. Kultivierung _____ 11

 2.1.3.4. Heterogenität der gewonnenen MSCs _____ 12

 2.1.3.5. Proliferationspotential _____ 13

2.2. Einsatz von multipotenten mesenchymalen Stammzellen in der regenerativen Medizin _____ **13**

 2.2.1. Stammzellbasierte in-vitro-Modelle _____ 15

2.3. Kardiomyogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen _____ **15**

 2.3.1. Kardiomyogenese und Signaltransduktionswege *in vivo* _____ 16

 2.3.1.1. Bedeutung des TGFβ-/BMP-Signalweges _____ 18

 2.3.1.2. Bedeutung des Wnt/β-Catenin-Signalweges _____ 19

 2.3.2. Kardiomyogene Differenzierungsprotokolle *in vitro* _____ 20

 2.3.3. Kardiale Markergene und Strukturproteine _____ 22

2.4. Die kardiale Elektrophysiologie des Pferdes und Notwendigkeit speziesspezifischer in-vitro-Modelle _____ **24**

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

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

Inhaltsverzeichnis

5.7.2. Induktionsfaktoren Activin A, knochenmorphogenetisches Protein-4 und Dickkopf-1	106
5.8. Schlussfolgerungen und Ausblick	108
6. Zusammenfassung	111
7. Summary	113
8. Literaturverzeichnis	115
9. Anhang	157
9.1. Materialien	157
9.2. Studienkollektiv (<i>n</i> = 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 (<i>n</i> = 20 Tiere)	184
Publikationen	186
Danksagung	187
Förderung der Promotionsarbeit	189
Erklärung Interessenskonflikt	190
Selbstständigkeitserklärung	191