

**Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg**

Amtierender Institutsdirektor: Prof. Dr. rer. nat. T. Hollemann

Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. T. Braun

**„Untersuchung der Differenzierung und der Proliferation von Cardiomyozyten des
Molches *Notophthalmus viridescens* nach Transplantation in regenerierende
Hinterbeinstümpfe unter besonderer Berücksichtigung der Rolle von extrazellulären
Matrixproteinen.“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)



vorgelegt

der medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Matthias Heister

geboren am 01.10.1978 in Eisenach

Gutachter:

1. Prof. Dr. T. Braun (Bad Nauheim)
2. Prof. Dr. T. Hollemann

Verteidigungsdatum: 30.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014242

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014242>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Bestimmte Tiere wie der in dieser Arbeit untersuchte Molch *Notophthalmus viridescens*, sind in der Lage verschiedene Körperteile komplett oder große Teile davon zu ersetzen. Herz, Augenlinse, Schwanz und Beine kann dieser nach einer Schädigung, die für uns Menschen eine lebenslange Behinderung oder sogar den Tod bedeuten würden, ersetzen ohne bleibende Narben oder Mißbildungen zurück zu behalten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Umfang sich, in ein Blastemgebiet eines sich regenerierenden Hinterbeinstumpf des *Notophthalmus viridescens*, injizierte Herzmuskelzellen der selben Spezies beteiligen. Zudem wurde untersucht, ob diese dabei die gleichen Komponenten der Extrazellulärmatrix (ECM), die gleichen Signalwege und Zell-ECM-Bindungspartner und Überlebensstrategien nutzen. Desweiteren wurde der Einfluss des Empfängerblastems auf diese Vorgänge betrachtet.

Schon einen Tag nach Injektion in ein Regenerat (Wachstumsspitze = Blastemgebiet), dedifferenzierten diese Molchcardiomyozyten selbst zu Blastemzellen. Sie wiesen die Blastemzellmarker Vimentin und 22/18 auf. In der unmittelbaren Umgebung fand sich ein großes Vorkommen an Fibronektin und Tenascin (molchspezifisches).

Durch Nachweis der Fokalen-Adhäsions-Kinase konnte auf eine Signaltransduktion, ausgelöst durch bestimmte ECM-Proteine, geschlossen werden. Möglicherweise waren diese Zellen in der Lage, ebenfalls wie es normale Blastemzellen des *N. v.* können, zu dedifferenzieren, zu überleben, zu proliferieren und sich zu redifferenzieren und am Aufbau neuer Gewebestrukturen, wie neuen Muskelfasern, teilzunehmen. Im Verlauf ihrer Dedifferenzierung verloren die Herzmuskelzellen ihre für quergestreifte Muskulatur typische Laminin-alpha-2-Verteilung, die bei einem Teil der Zellen während der Redifferenzierung wieder auftrat. Diese Zellen differenzierten sich wahrscheinlich nach dem Blastemzellstadium zu neuen Muskelzellen des nachwachsenden Hinterbeines.

Das Ergebnis, dass Cardiomyozyten nach Transplantation in ungeschädigte Hinterbeine nicht dedifferenzierten, ihre Laminin-alpha-2-Verteilung beibehielten und die ECM nicht blastemtypisch war, zeigte, dass das Blastemgebiet für eine Dedifferenzierung dieser Zellen zumindest mitverantwortlich ist.

Heister, Matthias: Untersuchung der Differenzierung und der Proliferation von Cardiomyozyten des Molches *Notophthalmus viridescens* nach Transplantation in regenerierende Hinterbeinstümpfe unter besonderer Berücksichtigung von extrazellulären Matrixproteinen.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 61 Seiten, 2006

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung und Zielstellung	1
1.1 Die Regenerationsfähigkeit des Molches <i>Notophthalmus viridescens</i>	1
1.2 Wundheilung, Blastemzellbildung und Redifferenzierung	1
1.3 Apoptose	2
1.4 Blastemzellen und ihre Eigenschaften	3
1.4.1 Der Blastemzellmarker 22/18	3
1.4.2 Vimentin	4
1.4.3 Tenascin und Fibronectin	4
1.4.4 Integrine und die Fokale-Adhäsions-Kinase	5
1.4.5 Histone und Proliferation	8
1.4.6 Redifferenzierung	10
1.5 Zielstellung der Arbeit	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Tierhaltung	14
2.2 Cardiomyozyten-Gewinnung und Zellkultur	14
2.3 Hinterbeinamputation und Zelltransplantation	16
2.4 Herstellung der Gewebeschnitte	16
2.5 TUNEL-Assay	18
2.6 Immunhistochemie	19
2.6.1 Durchführung	19
2.6.2 Verwendete Antikörper und Konjugate	19
2.7 Fluoreszenzphotographie	21
3.8 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	22
3 Ergebnisse	23
3.1 Transplantierte Zellen zeigen keine ausgeprägte Apoptosebereitschaft	23
3.2 Vimentin und 22/18	26
3.2.1 Vimentin- und 22/18-Expression bei Blastemzellen treten gleichzeitig auf	26
3.2.2 Molchcardiomyozyten dedifferenzieren innerhalb des Hinterbeinstumpfes	27
3.3 Nur im Hinterbeinstumpf ist Tenascin in der ECM der Implantate nachweisbar	31

	Seite
3.4 Viel Fibronectin in der ECM der Implantate in Hinterbeinstümpfen	33
3.5 Nachweisbares FAK P-Tyr-397-Vorkommen in Implantaten in Hinterbeinstümpfen	36
3.6 Implantatzellen im Hinterbeinstumpf proliferieren	40
3.7 Unterschiedliche Laminin - alpha 2 – Verteilung	43
4 Diskussion	47
4.1 Material und Methoden	47
4.1.1 Untersuchungszeitpunkte	47
4.1.2 Tierhaltung	47
4.1.3 Operationsbedingungen und Zellkultivierung	47
4.1.4 Implantation	48
4.1.5 Betrachtung der Gewebeschnitte	48
4.1.6 Diskussion der Dokumentation und Nachbearbeitung	50
4.2 Diskussion der Ergebnisse	50
4.2.1 Transplantierte Zellen zeigen keine ausgeprägte Apoptosebereitschaft	50
4.2.2 Transplantierte Cardiomyozyten nehmen im Hinterbeinstumpf Charakteristika von Blastemzellen an	51
4.2.3 Das Wiederauftreten von Merosin deutet auf die Redifferenzierung der Implantate hin	52
5 Zusammenfassung	54
6 Literaturverzeichnis	56
7 Thesen	60

Verwendete Abkürzungen

Ak	Antikörper
Arp2/3-complex	Gruppe von 7 Proteinen, einschliesslich der aktinbindenden Proteine Arp2 und Arp3, Regulation d. Aktin-Netzwerkbildung
Cdc42	engl., cell-division-cycle-gene 42 von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> bzw. homologe Gene anderer Spezies
CDK	engl., cyclin dependend kinases
DNS	Desoxy-Ribonuklein-Säure
ECM	Extrazellulärmatrix
ERK	engl., extracellular signal-related kinases
FAK	Fokale-Adhäsions-Kinase
Fas-Ligand	entspricht CD95L
FKHRL	engl., forkhead transcriptionfaktor
GTPase	Guanosin-Triphosphatase
HB	komplettes nicht amputiertes Hinterbein
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
MAP-Kinase	mitogen aktivierte Phosphorylase-Kinase
MT1	Antigen, mit Tenascin identisch
NS	engl., Newt stump, sich regenerierender Hinterbeinstumpf
<i>N. v.</i>	<i>Notophthalmus viridescens</i>
PBS	engl. phosphate-buffered saline
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat
pRB	phosphoryliertes Retino blastoma protein
Ras	engl., Rat sarcoma (Genprodukt des Harvey-Rattensarkomonkogens)
Rac	Ras-verwandtes C3-Botulinumtoxinsubstrat (GTPase)
Roh	Ras-homologes Protein
RB	Retino blastoma protein
TdT	engl., terminal desoxynucleotidyl transferase
TUNEL	engl., terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
UTP	Uridin-Triphosphat
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

1 Einleitung und Zielstellung

1.1 Die Regenerationsfähigkeit des *Notophthalmus viridescens*

Bestimmte Amphibien aus der Ordnung der *caudata* (Schwanzlurche) sind als adulte Individuen in der Lage, Teile ihres Körpers wie abgetrennte Extremitäten oder beschädigte Teile des Herzens, vollständig zu regenerieren (3, 35). Diese Eigenschaft trifft auch auf den in dieser Arbeit untersuchten Molch *Notophthalmus viridescens* zu (19,31). Nach Verlust einer Extremität wird diese vollständig neu nachgebildet, je nach Länge des Stumpfes innerhalb eines Zeitraumes von 45 bis 50 Tagen (19). Während dieses Vorganges werden drei Regenerationsstadien bis zur vollständigen restitutio durchlaufen. Nach einem Stadium der Wundheilung und der Dedifferenzierung schließt sich eine Blastemzell- und Proliferationsphase an, denen schließlich die Differenzierungsphase folgt, in der sich die endgültige Morphologie der Extremität manifestiert und die Regeneration abgeschlossen wird. Diese Stadien gehen fließend ineinander über (19, 33). Ein geschädigtes Herz kann der *N. v.* durch Wiedereintritt der Cardiomyozyten in den Zellzyklus vollständig regenerieren (3). Aus dem Wundrand entnommene proliferierende Zellen sind sogar *in vitro* in der Lage kleine rhythmisch schlagende Zellgruppen zu bilden (3).

1.2 Wundheilung, Blastemzellbildung und Redifferenzierung

Nach dem Abtrennen einer Extremität setzt bei dem untersuchten *Notophthalmus viridescens* unmittelbar die Wundheilung ein (19, 33). Dabei finden die Blutgerinnung, die Anreicherung von Makrophagen und Blutzellen, die Ansammlung von Flüssigkeit und die Ausbildung einer Wundepidermis statt (19, 33). Zugleich werden Zellreste absorbiert (19).

Nach zwei bis fünf Tagen, mit dem Abschluß der Wundheilungsphase, beginnen im Stumpfe einige adulte Zellen einen Prozess der Dedifferenzierung (19, 33). Hierbei verlieren diese Zellen ihre für den jeweiligen Zelltypus spezifische Morphologie und werden zu Blastemzellen (3, 33). Am Beispiel der Skelettmuskelzellen des *Notophthalmus viridescens* wird dies besonders deutlich: Hier beginnen die einzelnen Muskelfasern, die mehrkernige Synzytien darstellen, sich zu deorganisieren und einkernige Einzelzellen zu bilden (26, 13). Diese entstandenen Blastemzellen sind in der Lage, sich zu verschiedenen Zelltypen zu redifferenzieren (5). Das heißt, dass sich diese Zellen in neue oder beschädigte Muskelfasern integrieren oder aber auch zu Bindegewebszellen oder Nervenzellen

differenzieren können (5, 13, 19, 29).

Mit dem Wiedereintritt in den Zellzyklus sind diese Blasten zusätzlich in der Lage, im Gegensatz zu den adulten Ursprungszellen, zu migrieren und zu proliferieren, was für die Extremitätsneubildung die Grundlage bildet (3, 19, 26, 33). Die Blastenzellen sind somit der wichtigste Bestandteil der sich bildenden Wachstumsfront und essentiell für die Regeneration einer Extremität (5, 13, 19).

Für die komplette Wiederherstellung eines Beines des Molches *Notophthalmus viridescens* sind, neben der beschriebenen Blastenzellbildung, mehrere Vorgänge und Faktoren von entscheidender Bedeutung, die im Folgenden den Ablauf der Wundheilung und Regeneration berücksichtigend näher betrachtet werden.

1.3 Apoptose

Apoptose bezeichnet eine bestimmte Art des programmierten Zelltodes, bei dem die einzelnen Zellbestandteile wie Zellwand, Organellen und Mikrostrukturen wie DNS, Tubuli usw. fragmentiert und ohne Entzündungsreaktion abgebaut und von Phagozyten abtransportiert werden. Sie kann durch andere Zellen über Botenstoffe ausgelöst werden oder die Zellen treten nach dem Verlust von Kontakten zu anderen Zellen wie es zum Beispiel bei Verletzungen von Geweben auftritt, von selbst in die Apoptose ein (15, 45).

Die Apoptose hat zwei grundsätzliche Funktionen: Zum einen dient sie dem Abbau von beschädigten oder entarteten Zellen, um eine Entzündungsreaktion durch das Freiwerden von inneren Zellbestandteilen durch den Verlust der Zellmembranintegrität oder deren unkontrolliertes Wachstum zu verhindern. Zum zweiten ist sie wichtig für die Bildung von vollständigen Organen und Extremitäten, damit Grundstrukturen wie zum Beispiel Zehen gebildet werden können (19, 45).

Während der Differenzierungsphase im Verlauf der Hinterbeinregeneration des *Notophthalmus viridescens*, bildet sich im distalen Beinabschnitt eine Gewebsplatte heraus, bei der im späteren Ablauf zur Bildung der Zehen dickere Gewebeabschnitte von dünneren abgrenzbar sind. Es lassen sich so nun *frühe Zehen* von *interdigitalem Gewebe* unterscheiden. Dieses *interdigitale Gewebe* unterliegt apoptotischen Vorgängen, wird also gezielt abgebaut und es bildet sich dann die endgültige Form der Zehen heraus (19).

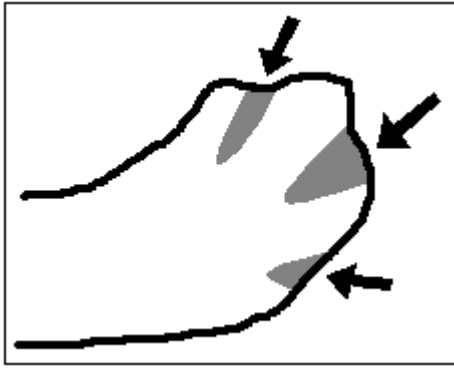


Abb. 1: in Anlehnung an Abb. 11 aus Quelle 19, sich regenerierendes Hinterbein, 28 Tage nach Amputation, die grauen mit Pfeilen markierten Flächen stellen die interdigitalen Gewebeabschnitte dar, welche den beschriebenen apoptotischen Vorgängen unterliegen

1.4 Blastemzellen und ihre Eigenschaften

Zur Identifizierung von Blastemzellen, die an der Regeneration einer Extremität des *Notophthalmus viridescens* beteiligt sind und zur Beurteilung von deren Rolle, gibt es verschiedene charakteristische Antigene und ECM-Proteine, die sich unter anderem mit immunhistochemischen Methoden nachweisen lassen.

1.4.1 Der Blastemzellmarker 22/18

Ein Antigen des *Notophthalmus viridescens* zeigt die starke Ähnlichkeit von Blastemzellen zu mesenchymalen Zellen, das während der Ontogenese stark exprimiert wird (10). Dieses als 22/18 bezeichnete Antigen stellt eine zytoplasmatische, filamentöse Komponente dar, die sich mit dem dazugehörigen und in dieser Arbeit verwendeten Antikörper ebenfalls in einer sehr frühen Phase der Hinterbeinregeneration nachweisen lässt (4, 10, 12). Schwanzzellen die periphere Nerven umschneiden, zeigen nach deren Verletzung durch die Amputation des Hinterbeines schon in der frühen Regenerationsphase (19) in der Stumpfspitze eine signifikante 22/18-Expression. Nach Dedifferenzierung beteiligen sich Schwanzzell-abgeleitete Blastemzellen an der Regeneration (10 ,18, 21). Sobald sich die Blastemzellen zu neuen adulten Zelltypen redifferenzieren, lässt sich das 22/18-Antigen nicht mehr nachweisen (4, 11).

1.4.2 Vimentin

Ein zweiter wichtiger Marker für die Charakterisierung von Blastemzellen stellt das intermediäre Filament Vimentin dar (5, 40). Dieses Protein findet sich in Leukozyten, roten Blutkörperchen, einigen Endothelzellen aber auch in mesenchymalen Zellen und Blasten, also in einer frühen Entwicklungsphase bei Vertebraten einschließlich dem Menschen (14, 40). Vimentin ist typisch für Zellen, die aktiv beweglich sind und die Fähigkeit zur Migration besitzen wie es auch für die Ontogenese eines Individuums wichtig ist (14).

In Rückenmarkszellen des *Notophthalmus viridescens* ist kein Vimentin nachweisbar (47). Dedifferenzieren diese z. B. nach der Amputation des Schwanzes zu Blastemzellen, zeigen sie nun eine signifikante Vimentinexpression (47). Ebenfalls verschwindet das zuvor nachweisbare Vimentin ab dem Zeitpunkt der Redifferenzierung der Blasten (47).

1.4.3 Tenascin und Fibronektin

Die beiden extrazellulären Glycoproteine Fibronektin und Tenascin (MT1) spielen eine zentrale Rolle für die Adhäsion der Blastemzellen und somit der Regeneration bei dem *Notophthalmus viridescens* (6, 7, 29, 36, 46). Diese beiden Proteine sind typisch für Zellen, einschließlich der Blastemzellen, die aktiv beweglich sind und somit migrieren können (8, 17, 32). Fibronektin und Tenascin sind grundlegende Adhäsionsmoleküle der Extrazellulärmatrix, wodurch die Apoptose der Blastemzellen verhindert wird, wenn diese ihre Zell-Zellkontakte aufgeben und zu migrieren beginnen, um neue Strukturen zu bilden (7, 6, 33).

Das hier beschriebene Tenascinantigen (MT1) lässt sich fünf Tage nach der Amputation eines Hinterbeines des *Notophthalmus viridescens* zu einem Zeitpunkt an dem man auch das 22/18 - Antigen findet, mit Beginn der Blastemzellphase in der Stumpfspitze, nachweisen (6, 36). Es handelt sich hierbei um ein >1,000 kDa großes sechsbarmiges Glycoprotein, dessen Struktur durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird (36).

Wie das menschliche Korrelat Tenascin-C, das in der ECM von Tumorzellen, Wunden und Entzündungsherden reichlich vorhanden ist, hemmt das schwanzlurchspezifische Tenascin Zellkontakte zu Fibronektin (22, 6, 36). Das Tenascin ist wichtig für die Interaktion zwischen den Blasten und dem umgebenen Gewebe (36).

Aufgrund der antiadhäsiven Funktion des Tenascins und der dadurch veränderten Zellkontakte zur ihrer Umgebung haben diese Zellen ein abgerundetes Aussehen und sind in der Lage ihre Position zu wechseln. Dies ist unter anderem nötig für das Tumorwachstum bei Vertebraten, für die Migrationsfähigkeit der Blasten und der Regenerationsfähigkeit des *Notophthalmus viridescens* (6, 16, 36).

Das kleinere Glycoprotein Fibronectin (MT4, molchspezifisch) ist ebenfalls sehr früh in der Amputationszone vorhanden (33). Es bildet als dicke, schnurartige Struktur zusammen mit Fibrin ein provisorisches Grundgerüst in einer Wunde und in frischen Stumpfenden (32, 33). Es ist ebenfalls typisch für die Umgebung von Blastenzellen (17). Hier ist die Konzentration allerdings sehr viel höher als in der anfänglichen Wunde und ist nun in dünnen Fibrillen angeordnet (33). Viele Zellen produzieren zwei bis drei Tage nach der Amputation des Hinterbeines bei dem *Notophthalmus viridescens* Fibronectin, wenn sie beginnen sich zu Blastenzellen zu dedifferenzieren (33).

Fibronectin besitzt Fibrin-, Kollagen-, Heparin- und Zellbindungsstellen (über Integrine) und bildet so das beschriebene Grundgerüst, das es Zellen ermöglicht sich entlang dieser Struktur fort zu bewegen und sich für die Bildung von neuen Strukturen wie neuen Muskelfasern auszurichten (20, 32, 33). So können die Blasten aus ihrer ursprünglichen Umgebung innerhalb des Stumpfgebietes an einen anderen Ort migrieren, ohne einen direkten Zell-Zellkontakt zu benötigen (32, 33).

Die Migrationsfähigkeit der Blastenzellen resultiert also unter anderem aus der Schaffung von Zell-ECM-Kontakten mittels Fibronectin und der durch Tenascin vermittelten Hemmung der Kontakte zum Fibrin-Fibronectin-Gerüst (6, 32). Differenzieren die Blasten zu adulten unbeweglichen Zelltypen, sind Tenascin und Fibronectin innerhalb der ECM in der beschriebenen hohen Konzentration nicht mehr nachweisbar (17, 29, 37).

1.4.4 Integrine und die Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK)

Integrine sind eine heterogene Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die eine alpha- und eine betha-Kette enthalten (15, 39, 48). Sie stellen u.a. den für die Zellen wichtigen Kontakt zwischen dem Fibrin – Fibronectin - Gerüst der ECM und den Mikrofilamentstrukturen der Zelle her (15).

Dieses ist für die hier betrachteten Blastenzellen die aus ihrem ursprünglichem Gewebeverband herausgelöst sind von Bedeutung (15).

Dabei bindet der lange extrazelluläre Teil des Integrins an das Fibronektin (15, 48). Der kürzere intrazelluläre Teil ist über Talin und Vinculin mit Aktin verbunden, das Teil des Zytoskeletts ist (15, 48).

Zudem wird durch Integrine ein Informationsweg zwischen ECM und Zelle geschaffen, zu dem diese allerdings weitere Partner benötigen, da sie selbst keine eigene katalytische Aktivität besitzen, um weitere Informationskaskaden in Gang zu setzen (42). Zu diesen Partnern zählt die Fokale-Adhäsions-Kinase (15, 39, 42, 48).

Die FAK ist eine, nicht als Rezeptor in die Zellmembran integrierte, zytoplasmatische Tyrosinkinase, die evolutionär in ihrer Beschaffenheit über Speziesgrenzen hinweg konserviert ist (39). Sie hat über das Talin Kontakt zu den Integrinen und ist in der Lage, Tyrosinreste in ihrer Proteinstruktur selbst zu phosphorylieren (15, 39). Die Fokale-Adhäsions-

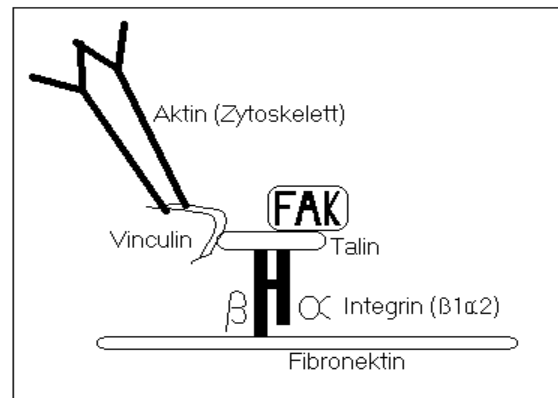


Abb. 2: in Anlehnung an die Abb. 14.12 (a) aus 15, Fokaler Adhäsionskomplex, Fibronektin der ECM, Integrine, Fokale-Adhäsions-Kinase mit ihrer Lage zum Zytoskelett

Kinase ist ein wichtiges Schlüsselement im Zusammenspiel von Zellen und ECM-Komponenten und der Steuerung wichtiger Signalwege (15, 39, 42, 48). Auf diese Weise werden die Integrine zu Rezeptoren für die Zelle und Informationen in das Zellinnere weitergeleitet (20, 39).

Die Fokale-Adhäsions-Kinase steuert verschiedene Informationswege, die unter anderem für das Überleben der Blastemzellen und für deren Proliferations- und Migrationsfähigkeit entscheidend sind. Die Bindung von Integrinen an ihre Liganden der ECM wie das Fibronektin, führt zur Autophosphorylierung des Tyrosinrestes an der Position 397 der Fokalen-Adhäsions-Kinase, dem initialen Autophosphorylierungsschritt (39, 48). Durch diese Aktivierung bindet die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase an die FAK und führt zur Bildung von PIP₃ aus PIP₂ (15, 39). An PIP₃ bindet unter anderem die Proteinkinase-B, die dadurch ebenfalls phosphoryliert wird (ein Serin- und ein Threoninrest) (15). Die Proteinkinase-B kann danach von der Innenseite der Zellmembran abkoppeln und phosphoryliert ihrerseits die Apoptose-Mediatoren *Bad* und *Caspase-9* sowie den Transkriptionsfaktor *FKHRL-1*, der zu der Aktivierung von weiteren Apoptosefaktoren führt (z.B. *Fas-Ligand*), wodurch die Apoptose verhindert wird (15).

Das Vorhandensein von Fibronektin in der ECM ermöglicht so Blastemzellen nach ihrem Herauslösen aus ihrem ursprünglichen Gewebsverband das Überleben (15).

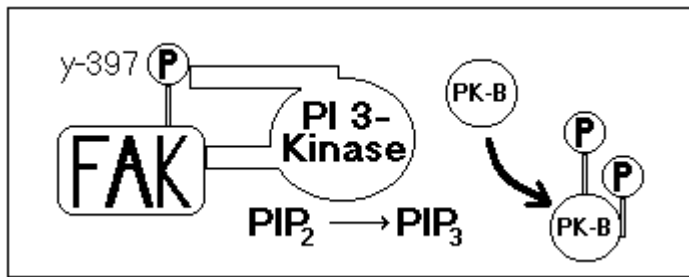


Abb. 3: in Anlehnung an Abb. 14.12 aus 15, Anheftung der PI 3-K, Umwandlung von PIP₂ zu PIP₃, resultierende Phosphorylierung und damit Aktivierung der Proteinkinase-B

Andere Zellen, wie z.B. Leukozyten, die schnell migrieren, greifen dabei auf andere Mechanismen ohne FAK zurück (15, 42). Dieses geht aber mit einer kürzeren Lebensdauer einher (15, 42).

Die Autophosphorylierung des Tyrosinrestes Tyr-397 führt ebenfalls zur Bildung einer Bindungsstelle an der Fokalen-Adhäsions-Kinase für das *Src* (15, 39). Dies bewirkt die Phosphorylierung eines weiteren Tyrosinrestes an Position 925 der Fokalen-Adhäsions-Kinase (15, 39). An diesen phosphorylierten Tyrosinrest kann *Shc* binden, wodurch es ebenfalls phosphoryliert wird und den *Grb2-SOS-Komplex* bindet (15, 39). Dieser veranlasst das G-Protein *Ras* den *Ras-ERK-Signalweg* in Gang zu setzen, was zum Eintritt in den Zellzyklus führt und die Zellkontraktilität beeinflusst (15, 39, 42).

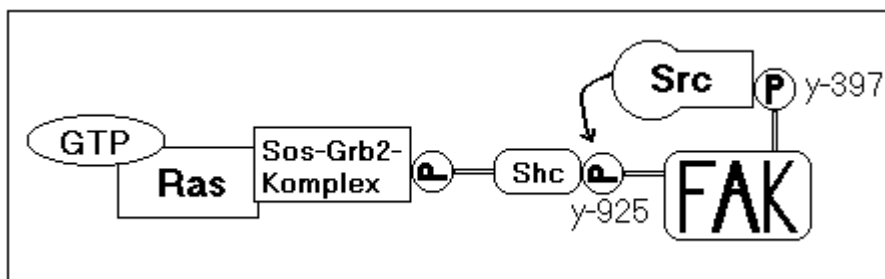


Abb. 4: in Anlehnung an Abb. 14.12 (b) (15), Auslösung des Ras-ERK-Signalweges durch die Src-induzierte Phosphorylierung der Tyrosinkinase FAK an y-925

Neben diesen Funktionen regelt die aktivierte Fokale-Adhäsions-Kinase die Aktivität zahlreicher GTP-asen der *Rho-Familie* und somit unter anderem die kortikale Aktin-Polymerisation (39). Die GTP-ase *Rac* und *Cdc42* interagieren zum Beispiel mit WASP/Scar-Proteinen, die an den *Arp2/3-complex* binden (39, 42). Dadurch wird die Aktin-Polymerisation stimuliert, die Bildung neuer Tochterfilamente induziert und die Schaffung von Quervernetzungen zwischen den einzelnen Filamenten ermöglicht (39, 42). Dadurch wird die Zellmotilität beeinflusst (39, 42).

Daneben werden durch die FAK-induzierten *Rac*-Aktivierungen Feedback-Signalwege in Gang gesetzt (42). *Rac* aktiviert unter anderem die PI 3-Kinase an der Plasmamembran, wodurch die eigene Aktivität gesteigert wird (42). Das produzierte PIP₃ erhöht wiederum die *Rac*-Aktivität, was zur Bildung neuer Zellkontakte über Integrine führt (42).

Es gibt verschiedene Integrine, die zusätzlich zu Fibronectin andere ECM-Bindungspartner haben, die in ihrer Zusammensetzung über die beschriebenen Signalwege die Zellaktivität beeinflussen (20). Hier zeigt sich eine wichtige Funktion des Tenascins, das zum einen FAK-unabhängige Signalwege stimuliert, wie zum Beispiel die Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und zum anderen durch die Bindung an die Integrine die FAK-Aktivität vermindert (6). Dadurch werden die folgenden Signalketten unterdrückt und die abhängigen GTP-asen und Kinasen inhibiert (6). Daraus resultiert der integrinabhängige dynamische Prozess zur Organisation von Zellkontakten, der Beeinflussung der Zellform und die Steuerung der Überlebensfähigkeit sowie des Zellzyklus der Blastemzellen, was zu der Regenerationsfähigkeit des Molches von entscheidender Bedeutung ist (6, 37, 36, 15, 39, 48). Hinzu kommt, dass Wachstumsfaktoren in ihrer Wirkung auf den Zellzyklus von dem Vorhandensein von Zellkontakten, wie die durch Integrine zur ECM, abhängig sind (1).

1.4.5 Histone und Proliferation

Neben der Migrationsfähigkeit sind Blastemzellen in der Lage, sich im undifferenzierten Zustand zu teilen und eine Wachstumsfront am Stumpfe des amputierten Hinterbeines des *Notophthalmus viridescens* zu bilden (3, 19).

Die integrininduzierte FAK-Aktivierung, der damit eingeschlagene *Ras-ERK*-Signalweg sowie über *Ras*-GTP-asen vermittelte Wachstumsstimuli aus der Blastemumgebung, führen zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren (1, 3, 15, 28, 30). Dadurch werden die ursprünglich adulten Zellen zur Dedifferenzierung und zur Proliferation veranlasst (1, 3, 15, 28, 30). Thrombin regt zum Beispiel Skelettmuskelzellen im Hinterbein des Molches dazu an, in den Zellzyklus neu einzutreten (3).

Die Signale, die über diesen Signalweg übermittelt werden, führen zur Bildung eines Cyclin-CDK-Komplexes wodurch Proteine aus der RB-Familie schrittweise phosphoryliert werden (1, 28). Dadurch werden Transkriptionsfaktoren aus der E2F - Familie freigesetzt, was zum Eintritt in die Synthesephase des Zellzyklus

führt (1, 28).

Um die DNS in der Synthesephase zu replizieren, muss sie entpackt werden (2, 43). Sie ist bei Eukarionten zur Stabilisierung in Nukleosomen-Einheiten verpackt, in denen sie an Histone gebunden ist (2, 43). Dabei liegt die DNS Abschnittsweise an einem Oktamer (je ca. 140 Basenpaare) aus je zwei H2A-, H2B-, H3- und H4-Histonen (Nukleosomenhistone) gewunden vor, während diese Einheiten durch das H1-Histon (engl. „linker histone“) perlschnurartig aufgereiht werden (2, 41). Die Histon-Proteine sind ebenfalls in ihrer Struktur evolutionär konserviert und unterscheiden sich nur sehr wenig zwischen den einzelnen Spezies (27). Bis auf das H2A, dessen mittlerer alpha-helikale Teil mit der DNS interagiert, sind vor allem die N-terminalen Teile der Nukleosomenhiston-Proteine mit der DNS gekoppelt (2, 27).

Neben ihrer wichtigen Verpackungsfunktion wird seit neuestem über den so genannten Histon-Code gesprochen. Die Aminosäurereste der Histon-Proteine können an verschiedenen Stellen azetyliert, ubiquitiert, poly-ADP-ribosyliert und methyliert werden (2, 30). Damit wird nicht nur die Verpackung der DNS organisiert, sondern kann auch die Aktivität von bestimmten DNS-Abschnitten mit den enthaltenen Genen gesteuert werden (2, 30). Am Menschen wurden mehrere Histon-Varianten eines Typs nachgewiesen, bei denen einzelne Aminosäuren ausgetauscht sind wie z. B. bei dem Histon H3 (H3.1; H3.2; H3.3), die unterschiedlich auf die assoziierte DNS wirken (15). Damit kann auch der jeweilige Aktivitätszustand eines Gens an die Tochterzellen nach einer Zellteilung vererbt werden (2).

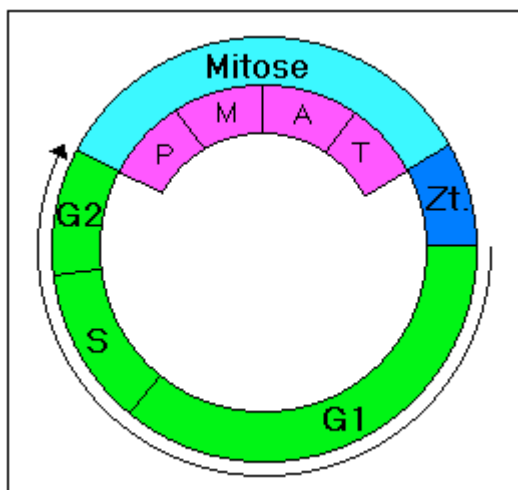


Abb. 5: Zellzyklus, G1=Proteinsynthese und Zellwachstum, S=Synthesephase mit Verdoppelung der DNS, G2=Kontrollphase mit Beginn der DNS-Kondensation, P=Prophase, M=Metaphase, A=Anaphase, T=Telophase, Zt.=Zellteilung, Verlauf in Pfeilrichtung, aus der G1-Phase gehen manche Zellen in die G0-Phase über oder treten hier aus der G0- über die G1 Phase in den Zellzyklus wieder ein

Zur Zellteilung der Blastemzellen muss die DNS zu sichtbaren Chromosomen kondensieren (44). Dies beginnt mit dem Verdichten der einzelnen Nukleosomen zu Chromatiden (30nm) (41, 43, 44).

Dabei werden die Histone auf die beschriebene Art und Weise in den Kondensationsprozess eingebunden. Das Histon-H3 spielt hierbei eine besondere Rolle (41). Mit der Aktivierung der *Ras*-Signalkette wird dieses an seinem N-terminalen Ende an den Serinresten 10 und 28 phosphoryliert und induziert gemeinsam mit der Phosphorylierung des Histon H1 die Kondensation der DNS (41).

1.4.6 Redifferenzierung

Aus der Wachstumsfront des sich regenerierenden Hinterbeinstumpfes des *Notophthalmus viridescens*, beginnen einzelne Blastemzellen zu redifferenzieren oder durch differenzielle Zellteilung bleibt eine der beiden resultierenden Tochterzellen als Stammzelle zurück während die zweite sich in eine spezialisierte Zelle differenziert (3, 19, 31, 44).

Die Redifferenzierung verläuft dabei in zwei Schritten: Zuerst beginnen diese Zellen ihre Blastemeigenschaften zu verlieren und für den jeweiligen ausdifferenzierten Typ spezifische Proteine zu produzieren und zu wachsen (17). Dann bilden sie zusammenhängende Gewebe und Funktionseinheiten wie Bindegewebe, Knochen oder Muskeln usw. (17). Während der erste Schritt vor allem von spezifischen Wachstumsfaktoren und -Stimuli abhängt, wird der zweite Schritt von der jeweiligen extrazellulären Umgebung und deren Zusammensetzung bestimmt (17, 25, 38).

Neben dem Fibronektin, den Integrinen und anderen Komponenten ist Laminin für die Gewebsorganisation während der Regeneration des *N. v.* von Bedeutung (17). Laminin ist wie Fibronektin ein wichtiger Bestandteil von Basalmembranen (17). Über Integrine ist es, wie auch Fibronektin mit der FAK und dem Cytoskelett vernetzt (17, 24, 25, 38).

Laminin besteht aus einer großen Kette (400 kDa) und zwei kleineren Ketten (je 200 kDa). Von jeder Kette gibt es verschiedene Vertreter, die in ihrer individuellen Zusammensetzung art- und gewebespezifisch sind (24, 25).

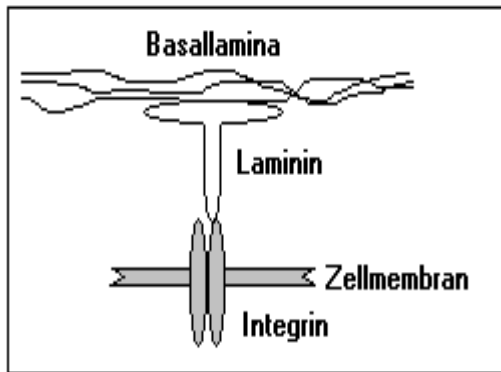
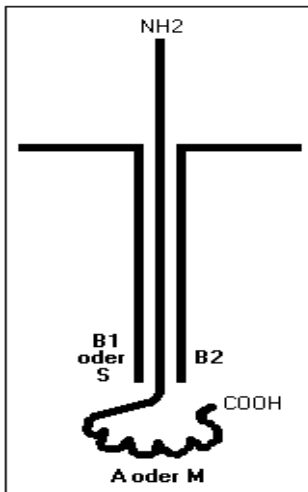


Abb. 6: Laminin und die Beziehung zu der Basalmembran und der Zelle, in Anlehnung an Abb. 6 aus 25, während der Muskelentwicklung wie bei der Regeneration des Hinterbeines des *Notophthalmus viridescens* moduliert es die Integrinbindung

Das Laminin dient hier als Vermittler zwischen der jeweiligen Basallamina und den Integrinen (25). So wird es den Zellen zum einen ermöglicht auf die oben beschriebene Weise zu überleben und zum anderen werden Signalwege initialisiert, die sie zur Reorganisation, z.B. zu einer Muskelfaser, befähigen (25, 38).



Name	Kette 400 kDa	Kette 200 kDa	Kette 200 kDa
Laminin	alpha (A)	B1	B2
Merosin	alpha-2 (M)	B2	B2
S-Laminin	alpha (A)	S	B2
S-Merosin	alpha-2 (M)	S	B2

Laminin	Merosin	S-Laminin	A-Merosin
glatte Muskulatur	quergestreifte Muskulatur	Synapsen	Sehnenansätze
Endothel			Trophoblasten
Epithelien	periphere Nerven		

Abb. 7 (oben): Verschiedene Lamininabkömmlinge und die bestimmenden Ketten, die einzelnen Ketten werden je nach Autor unterschiedlich bezeichnet, bei den kleinen Ketten wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Bezeichnungen aus 24 aufgeführt / **Abb. 8** (links): Laminin-Proteinstruktur mit den einzelnen Ketten, zu sehen sind die drei kleinen Arme oben und der lange Arm der durch die Zusammenlagerung entsteht, in Anlehnung an Abb.1 aus 24 / **Abb. 9** (unten): nach Abb. 1 aus 24, typisches Vorkommen der einzelnen Lamininabkömmlinge aus Abb. 7

Es gibt insgesamt fünf bekannte Ketten, die durch die Zusammenlagerung der kleinen an die große Kette einen langen Arm und drei kurze Arme bilden (24). Die große alpha-Kette des Laminins ist bei Merosin durch eine alpha-2-Kette ausgetauscht (24, 25). An diese lagern sich die verschiedenen leichten Ketten an und bestimmen so die jeweiligen Laminin-Untergruppen (24, 25). Je nach Art unterscheiden sich nochmals die einzelnen Ketten in ihrer Proteinstruktur (24). Die Hauptinteraktionspunkte befinden sich am langen Arm und an dem durch die Zusammenlagerung entstandenen Kreuzungspunkt (24).

Je nach Laminin-Typ binden verschiedene Integrine und beeinflussen die Überlebens-, Migrations- und Differenzierungseigenschaften (17, 24, 25, 38). Für die hier betrachteten quergestreiften Herzmuskelzellen des *Notophthalmus viridescens* könnte Merosin (= alpha-2-Laminin) von entscheidender Bedeutung sein (17, 25). Fehlt dieses z.B. Blastemzellen im Hinterbeinstumpf, können sich diese zwar durch die Anwesenheit von spezifischen Wachstumsfaktoren zu Muskelzellen differenzieren, sie sind aber nicht in der Lage, durch Zellverschmelzung eine Myotube (Synzytium aus mehreren Zellen = Muskelfaser) zu bilden und sind nicht vor Apoptose geschützt (25, 38). Laminin ist deshalb für die Redifferenzierungsphase der Hinterbein-Stumpffzellen ein unerlässlicher Mediator für die blastemabhängigen Vorgänge (17).

Somit resultiert die blastemabhängige Regenerationsfähigkeit aus dem regulierten Zusammenwirken von ECM-Komponenten wie Laminin und Fibronectin, über zellgebundene Integrine mit der Fokalen-Adhäsions-Kinase, wodurch spezifische Signaltransduktionswege ausgelöst und zelluläre Eigenschaften ausgebildet werden (15, 17, 39, 48).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung von Molch-Cardiomyozyten, mittels Immunhistochemie, die in ein Blastemgebiet eines sich regenerierenden Molch-Hinterbeinstumpfes implantiert wurden. Dabei sollten Veränderungen der Extrazellulärmatrix analysiert werden, um Hinweise auf die Rolle des Empfängerblastems zu gewinnen.

Es wurde untersucht, ob die Zellen eines anderen Organs mit den Eigenschaften von Herzmuskelgewebe in der Lage sind, in dem neuen Umfeld des Hinterbeines zu überleben und welchen Einfluss das Blastem auf die Implantate hat. Weiterhin wurde untersucht, ob die Molch-Cardiomyozyten in der Lage sind, sich an dem Regenerationsprozess zu beteiligen.

Besonderes Augenmerk lag bei den Implantatzellen auf deren Erlangung von Blastemzelleigenschaften, die ECM-Organisation für Überleben und Migration sowie deren Proliferationsverhalten.

Zu diesem Zweck wurde die Verteilung der ECM-Komponenten Tenascin und Fibronectin sowie der Blastemzellmarker 22/18 und Vimentin in Gewebeschnitten untersucht. Es wurde die apoptotische Aktivität der in den Gewebeschnitten enthaltenen Transplantate dokumentiert.

Außerdem wurden die Blastemzellmarker Vimentin und 22/18 in ihrem Vorkommen bei

den Blastemzellen miteinander verglichen, um die Ergebnisse für die Charakterisierung der Implantate zu verwenden.

Die Fokale-Adhäsions-Kinase wurde zur Betrachtung ihrer Rolle bei der integrinabhängigen Outside-In-Signaltransduktion und Phospho-Histon-H3 (pSer28) zur Feststellung des Proliferationsverhaltens herangezogen. Damit wurde untersucht, ob *FAK*-abhängige Signaltransduktionsvorgänge bei den Implantaten in der Wachstumsfront eine Rolle spielen und diese Einflüsse das weitere Regenerationsverhalten mitbestimmen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Als Untersuchungsobjekt diente im Rahmen dieser Arbeit der *North American red spotted Notophthalmus viridescens* (9). Es handelt sich hierbei um eine Unterart des Grünlichen Wassermolches, der aus seinem natürlichen Umfeld, USA, Bundesstaat Tennessee, direkt stammt und nach Deutschland in das *Institut für Physiologische Chemie* der MLU – Halle importiert wurde. Diese Art gehört zur Ordnung der Schwanzlurche (Caudata) aus der Klasse der Amphibien aus dem Stamm der Rückensaitentiere (Chordata) aus der Familie der Salamandridae (23, 34).

Der *Notophthalmus viridescens* lebt teils an Land mit einem rötlichen Hautkolorit und teils im Wasser worin sich seine Haut grünlich verfärbt und sich auf den Seiten rote Flecken ausbreiten (9, 23). Sein natürliches Verbreitungsgebiet (*Red spotted N. v.*) ist der nord-östliche Teil Nordamerikas (9).

Direkt nach dem Eintreffen der Molche, wurden die Tiere über Nacht in ein Sulfamerazin – haltiges Wasserbad (0,5 %-ig) verbracht, um die Keimkonzentration auf und in den Molchen zu reduzieren, um so möglichen Krankheiten vorzubeugen. Gehalten wurden sie in mit Wasser gefüllten Terrarien, in der ein Stück Treibholz für den Landgang gelegt wurde. Die Wassertemperatur betrug 19° bis 20° Celsius (thermostatreguliert).

Das Wasser wurde ständig über eine Filteranlage umgewälzt. Der Filter bestand aus einem Schwammfilter für die Partikelabsorbition und einer UV-Filteranlage, die zur Keimabtötung diente. Verfüttert wurden rote und weiße Mückenlarven und Arthemiakrebse, mindestens zweimal pro Woche.

2.2 Cardiomyozyten - Gewinnung und Zellkultur

Zur Vorbereitung der Herzentnahme wurden die Tiere (für 1 – 2 Stunden in eine 3 %-ige Penicillin – Streptomycin – Lösung gelegt, um die Bakterien - Hautflora der Molche zu reduzieren. Danach wurden pro Arbeitsgang drei bis vier Molche in ein Narkosebad mit 0,1 %-iger Tricaine-Lösung (Firma *Sigma*, Ethyl-3-aminobenzoate methane-sulphonate salt) in sterilem Leitungswasser gelegt, mindestens fünf Minuten, bis diese alle Bewegungen einstellten und narkotisiert waren. Die Entnahme der Herzen erfolgte unter aseptischen

Bedingungen. Die einzelnen Instrumente wurden nach jeder Benutzung in 70 %-igen Ethanol desinfiziert und anschließend über dem Bunsenbrenner abgeflammt. Zur Entnahme wurde ein Aufsichtsmikroskop verwendet, das ebenfalls desinfiziert wurde.

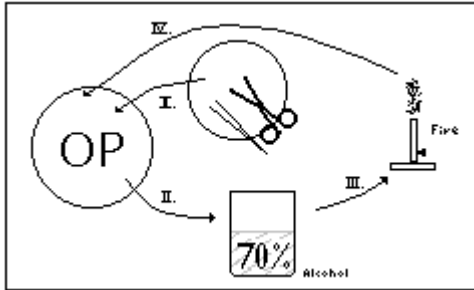


Abb. 10: Verwendung und Desinfektionsschema des Operationsbesteckes, Ablegen des sterilen Besteckes auf steriler Unterlage, I. Arbeitsschritt, II. Desinfektion mit Ethanol, III. Abflammen des Instrumentes direkt vor Benutzung, IV. erneute Benutzung, danach erneut Schritt II. usw.

Nach der Narkose wurde jeder Molch dreimal in jeweils frischem, sterilen Leitungswasser gespült. Zur Entnahme der Herzen wurden die Molche (am Schwanz mit steriler Pinzette) in eine sterile Kulturschale überführt, und die Haut im Bereich der Entnahme mit Jodobac (Jod-Lösung zur Desinfektion) behandelt. Danach wurden die ganzen Herzen mittels Schere und Pinzette entnommen, und in steriler 70% *L-15* Nährlösung (serumfrei) gesammelt. In dieser Nährlösung blieben die 30-35 Herzen über Nacht im Brutschrank bei 26°C stehen. Vor der Zellvereinzlung wurden die Herzen zweimal mit frischem Medium gewaschen. Die Zellseparation erfolgte bei 27°C über 12 Stunden mit einer Trypsin/Collagenase-Lösung (Zusammensetzung siehe unten). Die nach den ersten 2-4 Stunden erhaltene Zellsuspension wurde verworfen. Danach wurde in gleichmäßigen Abständen (1-2 Stunden) nach Zugabe von jeweils frischer Trypsin/ Collagenaselösung die erhaltenen Zellsuspensionen mit serumhaltigem *L-15*-Medium versetzt, die Zellen 10 min bei 500 U/min abzentrifugiert und in frischem Medium resuspenziert. Die so erhaltenen Zellfraktionen wurden gesammelt und in Kulturschalen ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubation bei 26°C setzten sich vor allem Nicht-Herzmuskelzellen in den Kulturschalen ab und der Überstand konnte anschließend mit den fast ausschliesslich enthaltenen Herzmuskelzellen in Laminin beschichtete Kulturschalen überführt werden.

Nach einer Kultivierungszeit von 12-14 Tagen wurden die Cardiomyozyten mit *CM-DiI* markiert, geerntet und schließlich transplantiert. *CM-DiI* ist ein lipophiler, rot fluoreszierender Farbstoff, der in die Zellmembran der Cardiomyozyten eingelagert wird. Dadurch können die Zellen nach der Implantation vom Umgebungsgewebe unterschieden und in Gewebeschnitten wiedergefunden werden.

2.3 Hinterbeinamputation und Zelltransplantation

Um den Molch zur Gliedmaßenregeneration zu bringen, wurde ein Hinterbein kurz unterhalb des Kniegelenks amputiert.

Fünf Tage nach der Amputation wurde ein Teil der hergestellten Zellsuspension aus Herzmuskelzellen mit ca. zwei bis vier Injektionen in das Blastemgebiet des Stumpfes oder zur Kontrolle in den distalen Bereich eines ungeschädigten Hinterbeines eines *Notophthalmus viridescens* mittels Feinnadel und steriler Einwegspritze injiziert.

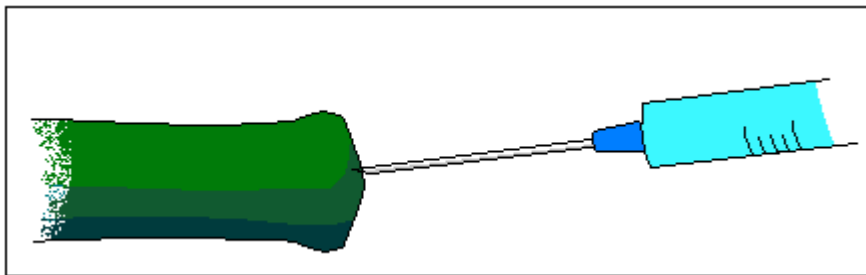


Abb. 11: Feinnadelinjektion der Molchcardiomyozyten in ein sich regenerierendes Hinterbeinstumpf, die Injektionsmenge ist individuell nur so gross, dass das Gewebe geschont wird

Die Vorbereitung, die Narkose, die Desinfektion und die Instrumentenpräparation, wurden wie bei den Herzentnahmen durchgeführt. Allerdings wurden die Molche nach erfolgter Hinterbeinamputation für 20-30 min auf eine Kulturschale gelegt, die mit Eis gekühlt wurde, um Nachblutungen zu vermeiden. Anschließend wurden sie für 24 Stunden in Sulfamerazinlösung (0,5 %-ig) gehalten und danach in die Aquarien überführt.

2.4 Herstellung der Gewebeschnitte

Zur Gewinnung von Gewebe für die Herstellung von Gewebeschnitten wurden die Molche wie oben beschrieben narkotisiert. Es wurden die kompletten Hinterbeine für die Kontrolluntersuchung distal des Kniegelenkes bzw. die Stumpfpräparate ca. zwei bis drei Millimeter proximal des Stumpfendes amputiert.

Die Amputation erfolgte jeweils einen Tag, 15 Tage und 30 Tage nach Zelltransplantation, also zu unterschiedlichen Regenerationszeitpunkten (bei den Stumpfpräparaten).

Die in dieser Arbeit festgelegte Bezeichnung der gewonnenen Präparate richtete sich nach dem Stadium der 1. Amputation (5 Tage, s.o.) zur Schaffung eines Regenerates mit enthaltenem Blastemgebiet, und dem 2. Amputationszeitpunkt zur Regeneratgewinnung (1, 15 und 30 Tage).

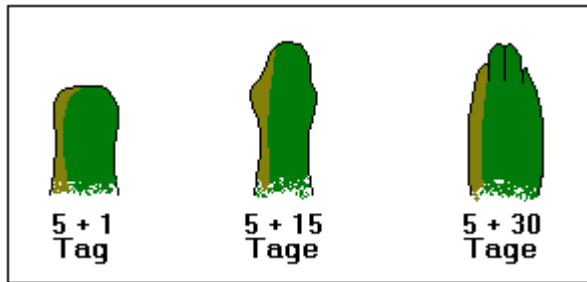


Abb. 12: Aussehen der amputierten Hinterbeinstümpfe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten, das Aussehen variierte je nach Molch aufgrund individueller Unterschiede und Amputationslängen

Ist ein Stumpf nach „5 + 1“ Tag gewonnen worden, ist dieser am 6. Tag der Hinterbeinregeneration gewesen und die Implantate waren 1 Tag darin implantiert, dementsprechend befanden sich die eingebrachten Herzmuskelzellen bei den mit „5 + 15“ Tagen bezeichneten Präparaten 15 und bei „5 + 30“ genannten 30 Tage in der Umgebung des neu wachsenden Hinterbeines. Die mit Implantation versehenen kompletten Hinterbeine, für die Kontrolluntersuchungen, wurden dem entsprechend einen Tag, 15 und 30 Tage nach Injektion amputiert. Zusätzlich wurden Stümpfe aus den entsprechenden Zeiträumen ohne Implantate für Vorbereitungsuntersuchungen und für die Vergleichsuntersuchung mit Vimentin und 22/18 gewonnen.

Zur Vorbereitung der Anfertigung von Gewebeschnitten, wurden die abgetrennten Hinterbeine und Stümpfe für jeweils zwei Stunden mittels 4% -iger PFA in PBS bei 4°C (Zusammensetzung s.u.) fixiert, was zu einer Proteinvernetzung in den Geweben führt und somit die Strukturen stabilisiert, um später eine saubere Schnittführung ohne Auffaltungen zu ermöglichen. Für die Gefrierkonservierung der Präparate wurden diese für mindestens 15 Stunden bei 4°C in 30%-ige Saccharoselösung (Zusammensetzung s.u.) gebracht. Dabei wurde durch die hochosmolare Lösung der Flüssigkeitsgehalt in den Stümpfen und kompletten Hinterbeinen reduziert und ein Entstehen von gewebsschädigenden Eiskristallen durch die anschließende Gefrierbettung verhindert.

Die Einbettung der Präparate erfolgte mit Gelfrierschnittmedium (*TFM, Polyscience Inc.*). Diese wurden anschließend mit einem *Leica* – Kryotom in 10 µm dicke Gewebeschnitte geschnitten und auf handelsübliche Objektträger übertragen (sechs bis acht Schnitte pro Slide). Pro Stumpf oder Hinterbein konnten so ca. 10 bis 15 Objektträger (*Vectabond*-beschichtet, *Vector Lab.*) gewonnen werden, die markierte Herzmuskelimplantate enthielten. Die Aufbewahrung erfolgte bei –20°C unter Lichtabschluss, um die DiI-Markierung vor dem Ausbleichen zu schützen.

2.5 TUNEL-Assay

Zum Nachweis von Apoptose wurde das *TUNEL Enzyme-Testkit Cat. No. 1767305* von der Firma Roche verwendet. Mit diesem sind DNS-Doppelstrangbrüche, wie sie bei dem apoptotischen Zellabbau entstehen, nachweisbar. Mittels der *TdT* werden hierbei an die Enden der Doppelstrangbrüche *fluorescein-dUTP*- Moleküle gekoppelt, die direkt mit dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden können.

Ablauf: Das Gefrierschnittmedium wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um die DNS-Strangbrüche mit dem Testkit nachweisen zu können, wurden die Zell- und Kernwände mittels zweiminütiger Inkubation, bei 4°C, in einer Permeabilisierungslösung durchlässig gemacht. Diese Lösung wurde durch zweimaliges Waschen der Slides in PBS (je 5 Minuten) wieder entfernt. Für die Positivkontrolle wurden Gewebeschnitte des *Notophthalmus viridescens* verwendet, bei denen mittels DNase in 15-minütiger Reaktion, Doppelstrangbrüche geschaffen wurden. Die anschließende Entfernung erfolgte wie bei der Permeabilisierung.

Daraufhin wurden alle Gewebeschnitte, inklusive Kontrollen, mit Reaktionsmischung versehen, je ein Tropfen auf einen Gewebeschnitt. Die Objektträger wurden so, für die enzymatische Markierung der DNA-Brüche, unter Lichtschutz für 60 Minuten, bei 37°C (optimale Arbeitstemperatur der *TdT*) in einer feuchten Kammer behandelt. Anschliessend wurde die Reaktionslösung durch viermaliges Waschen entfernt und die Zellkerne mit *Hoechst 33258*-Kernfarbstoff (10 µl in 100 ml PBS, emittiert blaues Licht unter Anregung) in einer Reaktionskammer, ebenfalls unter Lichtschutz, markiert (fünf Minuten). Nach weiterem zweimaligen Waschen, wie oben, wurden die Objektträger vorsichtig von überschüssigem Puffer befreit und mittels Mowiol 4-88 von Calbiochem (mind. 30 Minuten Trocknungszeit) und Deckgläsern eingedeckelt und bei 4°C bis zur Fotodokumentation mittels Fluoreszenzmikroskop zwischengelagert. Die TUNEL-markierung emittiert unter Anregung grünes Licht (515 – 565 nm).

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Durchführung

Alle anderen immunhistochemischen Nachweise wurden nach folgendem Schema, zum Schutz der DiI-Zellmarkierung unter Lichtschutz, durchgeführt:

- Entfernen des Gefrierschnittmediums durch dreimaliges Waschen der Objektträger mit PBS bei Raumtemperatur
- Vorsichtiges Abtupfen der Slides und tropfenweises Aufbringen einer Blockierungslösung, um unspezifische Bindungen der anschließend verwendeten Antikörper zu reduzieren
- Blockierung 30 Minuten in feuchter Kammer, anschließendes Abpipettieren der Blockierungslösung
- tropfenweises Aufbringen der jeweiligen spezifischen Antikörperlösungen (ca. 30 µl pro Gewebeschnitt, Zusammensetzung s.u. Punkt 2.7.2)
- Inkubation über Nacht bei 4°C in feuchter Kammer (Antigen-Antikörper-Reaktion)
- dreimaliges Waschen der Objektträger (s.o.)
- Aufbringen der jeweiligen Konjugate (Fluoreszenz markierte Sekundärantikörper)
- Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur (Antikörper-Sekundärantikörperreaktion) in feuchter Kammer
- einmaliges Waschen (s.o.) und Kernfärbung mittels *Hoechst 33258*, wie bei *TUNEL-Assay* beschrieben, anschließendes zweimaliges Waschen
- Einbettung mit Mowiol 4-88 (mind. 30 Minuten Trocknungszeit)
- Dokumentation mit Fluoreszenzphotographie.

Zum Nachweis von Proteinen innerhalb der Zellen wie FAK und Phospho-Histon H3 wurden die Zellen der Gewebeschnitte, einschließlich der Kontrollen, nach dem Entfernen des Gefriermediums und vor der Blockierung mittels *Triton-X-100* (1 ml in 100 ml PBS) in einer Entwicklerkammer permeabilisiert.

2.6.2 Verwendete Antikörper und Konjugate

Die verwendeten Antikörper und Konjugate sind in den folgenden Tabellen mit den zugehörigen Eigenschaften aufgeführt. Die verwendeten Antikörper-Produktbeschreibungen

sind im Literaturverzeichnis mit angegeben.

Die einzelnen eingesetzten Konzentrationen ergaben sich aus den herstellerepezifischen Empfehlungen. Hierzu wurden Positivkontrollen angefertigt, um die empfohlene Konzentration am Untersuchungsobjekt *Notophthalmus viridescens* zu überprüfen und anzupassen, um falsch positive oder falsch negative Ergebnisse zu vermeiden. Die Konjugate wurden bei jeder Testreihe als Kontrolle ohne Primärantikörper auf den verwendeten Gewebeschnitten geprüft. Bei der Vergleichsreihe 22/18 und Vimentin bei Blastemzellen wurden die benötigten Konjugate zusammen, ohne die Primär-Ak. zur Kontrolle auf *N.v.*-Präparaten getestet. Bei allen Kontrollen war keine signifikante Fluoreszenz erkennbar. Es gab keine unter sonst gleichen Bedingungen mit den verwendeten Belichtungszeiten quantitativ erfassbare unspezifische Konjugatbindung.

Antikörperbezeichnung und Klasse	Hersteller	eingesetzte Verdünnung (in PBS)	Antigen	Konjugat/Sekundär-Ak.
22/18 IgM Maus	J.P. Brockes Ludwig Inst. for Cancer Resarch	1 : 20	22/18-Ag. auf Blastemzellen des <i>Notophthalmus viridescens</i>	Anti-Maus-IgM
Vimentin IgG Maus (Hybridomüberstand)	BD Biosciences	1 : 2	Vimentin Zytoskelett - Protein	Anti-Maus-IgG
MT1 IgM Maus	Roy A. Tassava Department of Molecular Genetics	1 : 30	Tenascin des <i>Notophthalmus viridescens</i>	Anti-Maus-IgM
MT4	Roy A. Tassava Department of Molecular Genetics	1 : 30	Fibronectin des <i>Notophthalmus viridescens</i>	Anti-Maus-IgG
Anti-FAK, Phospho-Specific (Tyr397) IgG Kaninchen	Calbiochem	1 : 25	Fokale-Adhäsions-Kinase intrazellulär	Anti-Kaninchen-IgG
Anti-Phospho-Histone H3 (pSer28) IgG Ratte	Sigma-Aldrich, INC.	1 : 50	poshoryliertes Histon H3 an Serinrest 28 intrazellulär	Anti-Ratte-IgG
Laminin alpha-2 (C-20): sc-16582 IgG Ziege	Santa Cruz Biotechnology, INC.	1 : 20	Laminin alpha-2	Anti-Ziege-IgG

Abb. 13: Verwendete Antikörper und die dazugehörigen Sekundärantikörper, mit verwendeter Verdünnung und zur Herstellung verwendete Spezies

Bezeichnung/ Spezies/ Immunglobulinklasse	Antigen	Hersteller	emittiertes Licht unter Fluoreszenz- anregung	eingesetzte Verdünnung
Ziege Anti-Maus IgM Alexa-Fluor-488 markiert	(H+L) Maus-IgM	Molecular Probes Inc.	grün (max. bei 519 nm)	1 : 50
Ziege Anti-Maus IgG Alexa-Fluor-594 markiert	(H+L) Maus-IgG	Molecular Probes Inc.	rot (max. 594 nm)	1 : 500
Ziege Anti-Maus IgG Alexa-Fluor-488 markiert	(H+L) Maus-IgG	Molecular Probes Inc.	grün (max. 519 nm)	1 : 500
Ziege Anti-Kaninchen- IgG FITC-markiert	F(ab') ₂ -Teil des Ratten IgG	Jackson Immuno Resarch Lab. Inc.	grün (max. 525 nm)	1 : 20
Kaninchen Anti-Ratte- IgG FITC-markiert	F(ab') ₂ -Teil des Ratten IgG	Jackson Immuno Resarch Lab. Inc.	grün (max. 525 nm)	1 : 50
Schaf Anti-Ziege IgG FITC-markiert	(H+L) Ziege IgG	Jackson Immuno Resarch Lab. Inc.	grün (max. 525 nm)	1 : 20

Abb. 14: Verwendete Sekundärantikörperpräparate, Verwendung gemäß der jeweiligen Spezifität

2.7 Fluoreszenzphotographie

Sämtliche Fluoreszenzuntersuchungen wurden mit den Fluoreszenzmikroskopen *Axioplan 2* und *Stemi 2000-C* (beide *Zeiss-Optik*) durchgeführt. Um die jeweilige Fluorochromemission (*FITC*, *Fluoreszin* oder *AlexaFluor*) zu untersuchen, wurden die dafür vorgesehenen Filter für das Anregungslicht des Mikroskopes verwendet. Je nach Gewebeschnitt wurde das 10er, 20er und das 40er Objektiv verwendet. Die Photographie erfolgte mittels Digitalphotooperat (*Nikon Coolpix 990*). Dieser verfügt über eine Zoomfunktion, die zum Einsatz kam, um die Bildausschnitte zu optimieren.

Die Nachbearbeitung erfolgte mit *CorelDraw®* von *Mikrosoft*. Dabei wurden störende Schmutzpartikel, gefaltete und überbelichtete Bereiche retuschiert. Bei den Aufnahmen mit dem 20er und 40er Objektiven wurden die Rotfluoreszenzen, wie bei DiI und für Vimentin (rot), mit maximal 1/8 Sekunde, die Grünfluoreszenzen mit maximal 1/4 Sekunde und die Kernaufnahmen (blau) ebenfalls mit maximal 1/4 Sekunde belichtet, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die durch eine Überbelichtung entstehen könnten. Für das 10er Objektiv wurde eine maximale Belichtungszeit von 1/4 Sekunde für alle Fluoreszenzen benutzt. Für die Bildunterschriften wurde „NS“ als Synonym für Hinterbeinstumpf (engl., newt stump) und „HB“ als Bezeichnung für ungeschädigtes Hinterbein verwendet.

2.8 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Lösung	Bestandteile	Menge	Verwendung
Blocklösung	Pferdeserum	3ml	Absättigung unspezifischer Antigenoberflächen
	BSA (Bovines Serum Albumin)	500mg	
	PBS	100ml	
Kollagenaselösung	PBS	8,4 ml	Enzymverdaulösung für die Zellvereinzellung
	BSA (Bovines Serum Albumin)	15 mg	
	Kollagenase	10,5 mg	
	D-Glukose	30 mg	
	Gentamycin (50mg/ml)	10 µl	
	2,5% Trypsin	2,1ml	
Mowiol	Mowiol 4-88 von <i>Calbiochem</i>	4,4 g	Einbetten der bearbeiteten Gewebeschnitte zum Eindeckeln für die Fluoreszenzphotographie
	Glycerol	6 g	
	H ₂ O	6 ml	
	0,2M Tris/HCl-Puffer pH 8,5	12 ml	
PBS (enl. Phosphat-Buffer-Saline) = Phosphatpufferlösung, Posm und PH des <i>N.v.</i>	KH ₂ PO ₄	0,108 g/Liter*	Waschen der Slides, Lösung der Antikörper- und Konjugatlösungen sowie Hoest- Farbstoff, Zellkultivierung
	NaCl	6,752 g/Liter*	
	Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	0,396 g/Liter*	
	* Zellkulturwasser	1 Liter	
PFA (4%-ig)	Paraformaldehyd	40 g	Vorbereitung der Gefrierbettung der Hinterbeinstümpe
	PBS	1000 ml	
	1 N NaOH	2-3 Tropfen	
Zellkulturwasser	zweifach destilliertes		Bestandteil der PBS, Feuchtigkeitsträger in feuchter Kammer
	Wasser, autoklaviert zur		
	Sterilisation		

Abb. 15: Verwendete selbst hergestellte Lösungen

3 Ergebnisse

3.1 Transplantierte Zellen zeigen keine ausgeprägte Apoptosebereitschaft

In den beobachteten transplantierten Zellen und Zellkernen, waren zu den ausgewählten Zeitpunkten: einen Tag, 15 Tage und 30 Tage nach Transplantation, keine apoptotischen Zellen nachweisbar. Dies war in allen untersuchten Gewebeschnitten, bei Transplantat-Zellen in Molchstümpfen und auch bei den Transplantat-Zellen in ungeschädigten Hinterbeinen der Fall. D.h. die injizierten Zellen zeigten keine erhöhte Bereitschaft für einen programmierten Zelltod. Dieses spricht dafür, dass zum Überleben der transplantierten Zellen allein keine blastemzellgeprägte Umgebung erforderlich war.

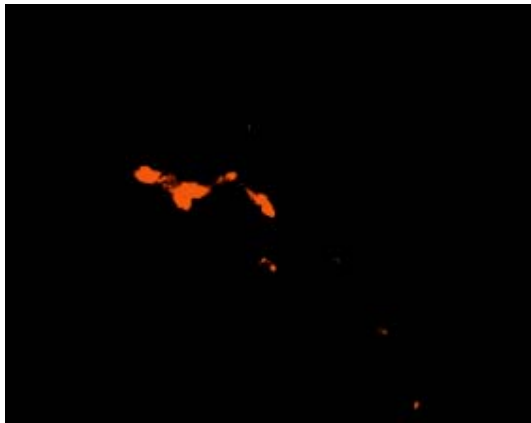


Abb. 16: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 20er, DiI- Markierung der transplantierten Zellen

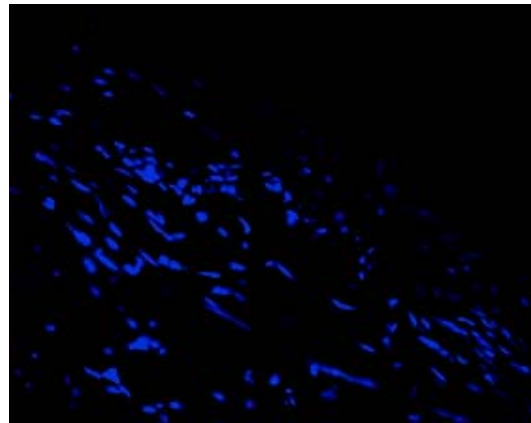


Abb. 17: 5 + 1 Tag, NS, 20er, Blaufilter, Kerne angefärbt, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 16

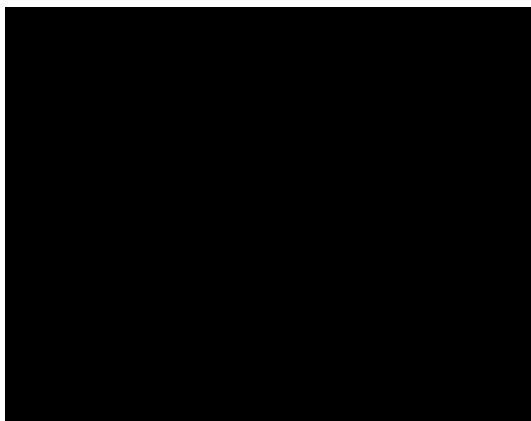


Abb. 18: 5 + 1 Tag, Grünfilter, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 16, keine signifikante Grünfluoreszenz erkennbar

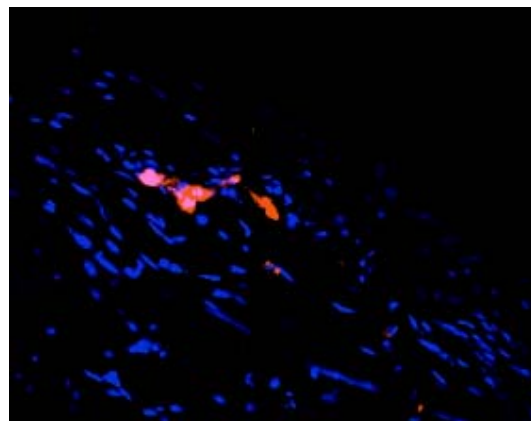


Abb. 19: 5 + 1 Tag, Rot- und Blaufilter-Aufnahme übereinander gelegt



Abb. 20: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der transplantierten Zellen

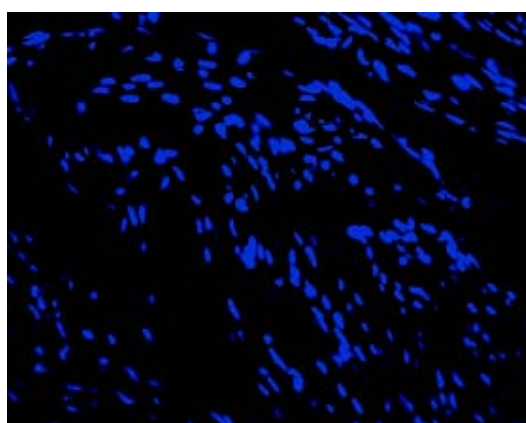


Abb. 21: 5 + 15 Tage, Blaufilter, 20er, Kerne angefärbt, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 20

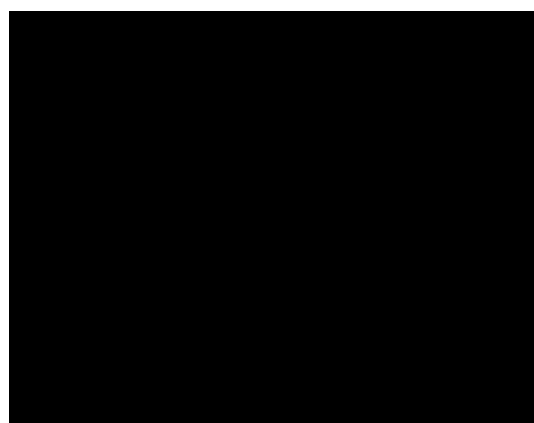


Abb. 22: 5 + 15 Tage, Grünfilter, 20er, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 20, keine signifikante Grünfluoreszenz erkennbar

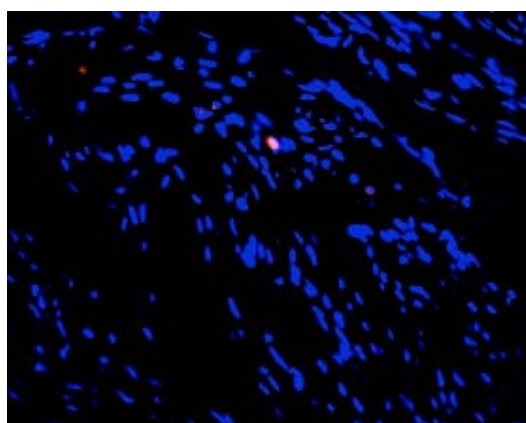


Abb. 23: 5 + 15 Tage, Abb. 20 und 21 kombiniert

Auch 30 Tage nach Transplantation war mittels des TUNEL-Assay in den transplantierten Zellen bzw. Zellkernen keine Apoptose erkennbar.

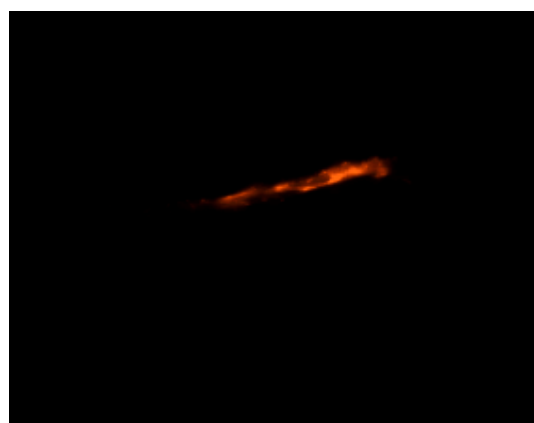


Abb. 24: 5 + 30 Tage, Rotfilter, 20er, Markierung der transplantierten Zellen mittels DiI

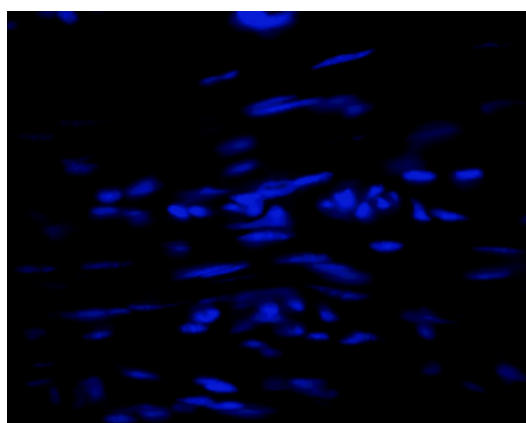


Abb. 25: 5 + 30 Tage, Blaufilter, 20er, Kerne angefärbt, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 24



Abb. 26: 5 + 30 Tage, Grünfilter, 20er, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 24, ebenfalls keine signifikante Grünfluoreszenz erkennbar

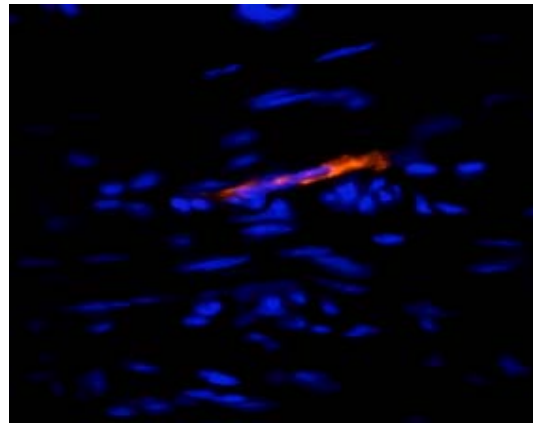


Abb. 27: 5 + 30 Tage, Abb. 24 und 25 kombiniert

In der angefertigten Positivkontrolle, in der DNA-Doppelstrangbrüche in einem Hinterbeinstumpfpräparat eines *Notophthalmus viridescens* provoziert wurden, zeigte sich dagegen in jedem Zellkern der behandelten Gewebeschnitte eine starke Grünfluoreszenz mittels TUNEL-Assay.

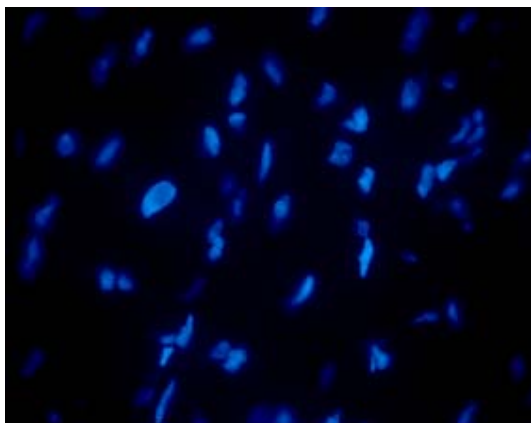


Abb. 26: Positivkontrolle Hinterbeinstumpf, Blaufilter, 20er, normale Zellkernfärbung

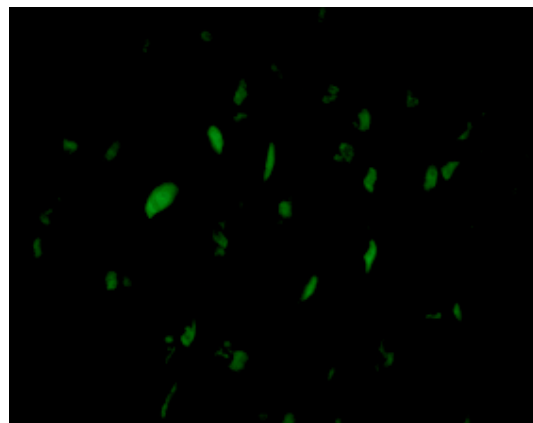


Abb. 27: Positivkontrolle Hinterbeinstumpf, Grünfilter, 20er, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 26, Darstellung der provozierten DNA – Strangbrüche, in nahezu jedem Zellkern findet sich Grünfluoreszenz

Dabei wurde bei allen angefertigten Testreihen für diese Grün-Fluoreszenz-Aufnahmen die selbe Belichtungszeit von $\frac{1}{4}$ Sekunde verwendet.

3. 2 Vimentin und 22/18

3. 2. 1 Vimentin- und 22/18-Expression bei Blastemzellen treten gleichzeitig auf

In allen untersuchten Gewebeschnitten, zu den Zeitpunkten 6, 20 und 35 Tage nach Amputation der distalen Enden der Molchhinterbeine, waren im Bereich der Wachstumsspitze der entstandenen Stümpfe Blastemzellen mittels 22/18-Detektion nachweisbar. Diese Zeitpunkte sind analog zu 5 + 1, 5 + 15 und 5 + 30 Tage bei den Implantatpräparaten. Dabei zeigte sich, dass nahezu alle Blastemzellen die 22/18-positiv getestet wurden ebenfalls Vimentin-positiv waren. In den Kontrollen fanden sich keine Kreuzreaktivitäten zwischen den Sekundärantikörpern und den jeweiligen anderen Primärantikörpern und auch keine zwischen den Sekundärantikörpern.

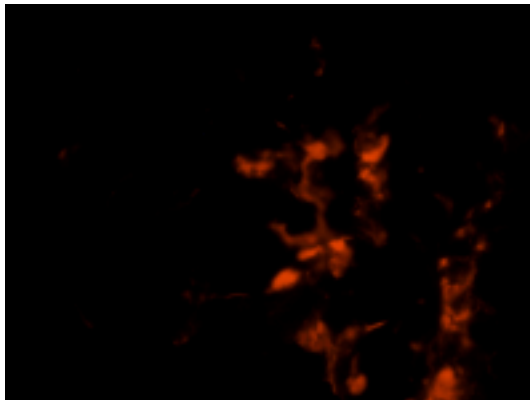


Abb. 28: 6 Tage nach Amputation, Rotfilter, 40er, Vimentin-positive Zellen im Blastemgebiet

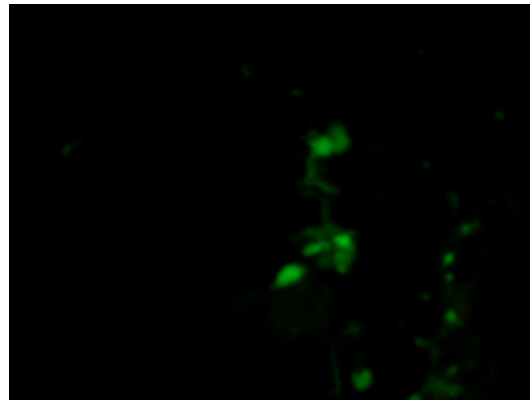


Abb. 29: 6 Tage nach Amputation, Grünfilter, 40er, 22/18-positive Blastemzellen, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 28

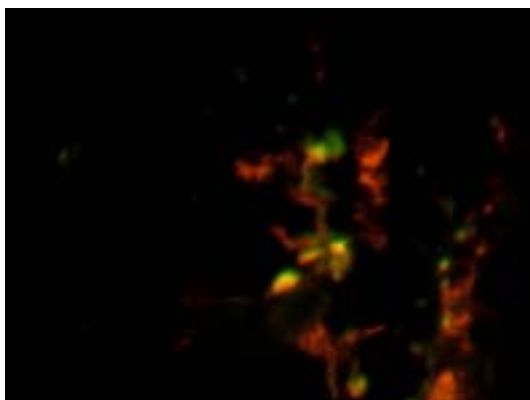


Abb. 30: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 28 und 29, Rot und Grünfilter übereinander gelegt, 22/18-positive Blastemzellen sind auch Vimentin-positiv

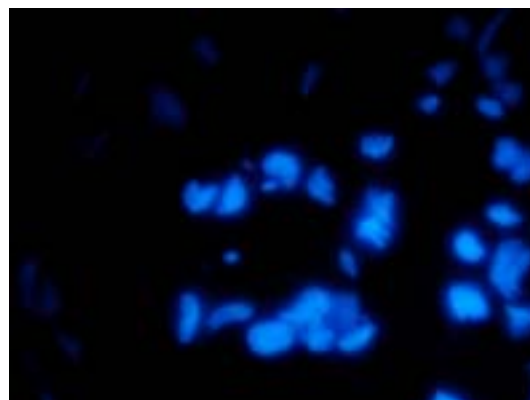


Abb. 31: 6 Tage nach Amputation, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 28 und 29

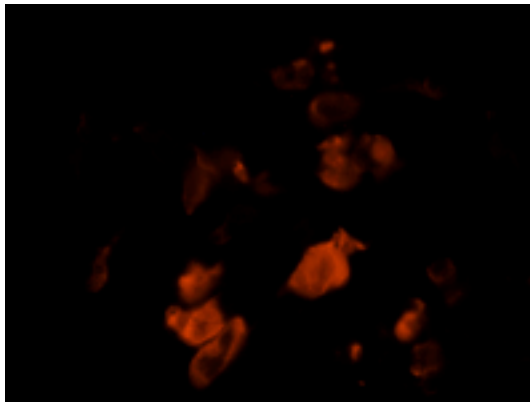


Abb. 32: 20 Tage nach Amputation, Rotfilter, 40er, Vimentin-positive Zellen im Blastemgebiet

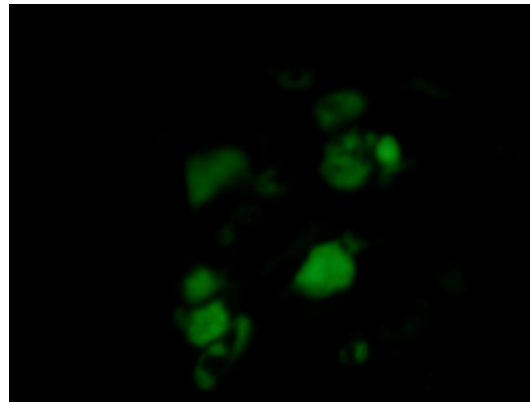


Abb. 33: 20 Tage nach Amputation, Grünfilter, 40er, 22/18-positive Blastemzellen, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 32

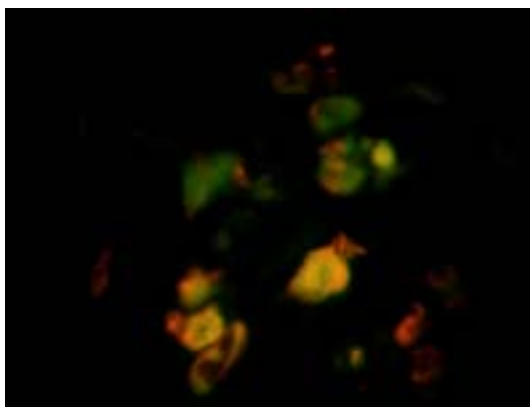


Abb. 34: Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 32 und 33, Rot- und Grünfilter übereinander gelegt, 22/18-positive Blastemzellen sind auch Vimentin-positiv

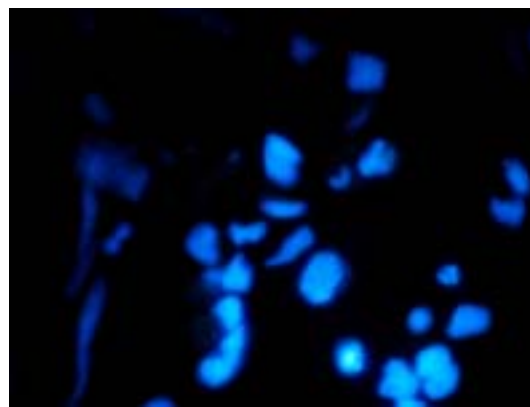


Abb. 35: 20 Tage nach Amputation, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 32 und Abb. 33

3. 2. 2 Molchcardiomyozyten dedifferenzieren innerhalb des Hinterbeinstumpfes

Anhand der Untersuchung der implantierten Molchcardiomyozyten wurde nachgewiesen, dass die meisten dieser Zellen einen Tag nach Implantation in einen Molch-Hinterbeinstumpf 22/18- und Vimentin-positiv waren. Sie dedifferenzierten unter dem Einfluss der Wachstumsspitze zu Blastemzellen. Die Zellen hingegen, die zuvor in ein komplettes Hinterbein implantiert wurden, waren weder 22/18- noch Vimentin-positiv. Dies bedeutet, dass der Einfluss des Blastemgewebes innerhalb der Wachstumsspitze eines Molch-Hinterbeinstumpfes bestimmt ob die implantierten Zellen zu Blasten dedifferenzieren können oder nicht. Dies spricht dafür, dass es auch hier Unterschiede zwischen einer normalen Wundheilung (Injektionsstichwunde) und einer kompletten Extremitäten - Regeneration bei dem *Notophthalmus viridescens* gibt.

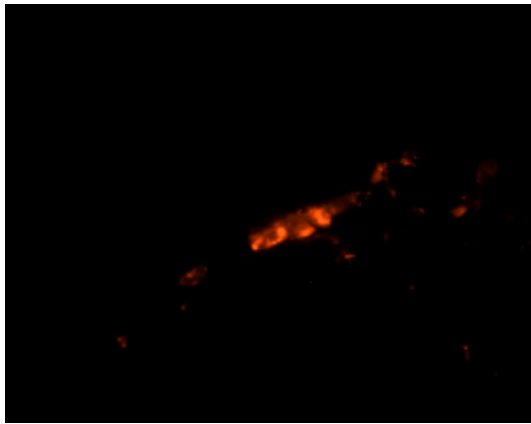


Abb. 36: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der implantierten Zellen, mehrere Zellen innerhalb der Wachstumsspitze

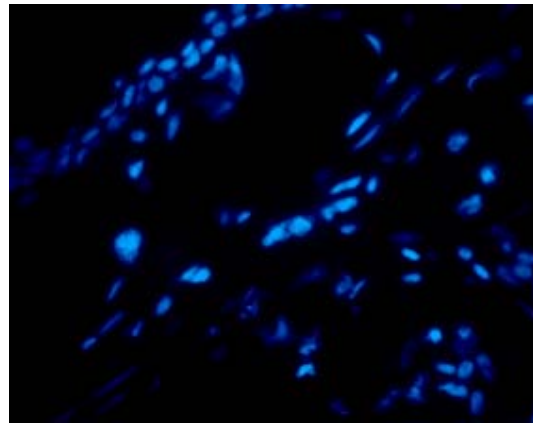


Abb. 37: 5 + 1 Tag, NS, 40er, Blaufilter, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 36

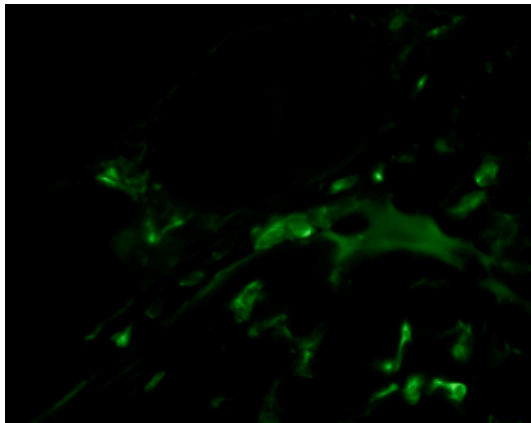


Abb. 38: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 40er, Vimentin-Nachweis, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 36 und Abb. 37

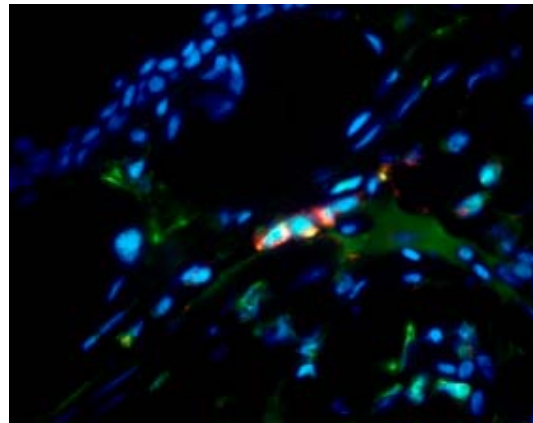


Abb. 39: Abb. 36, 37, und 38 kombiniert



Abb. 40: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der implantierten Zellen, Zellgruppe kurz nach Injektion ins Blastemgebiet

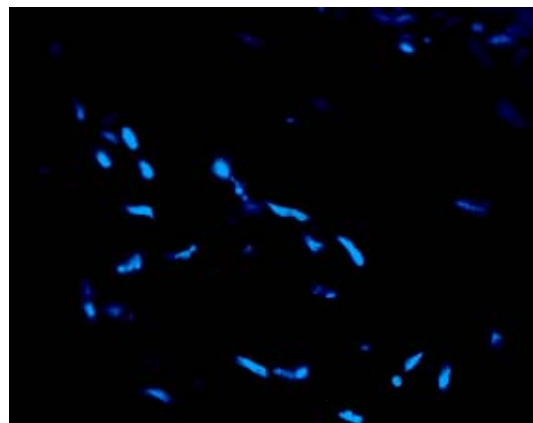


Abb. 41: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 40

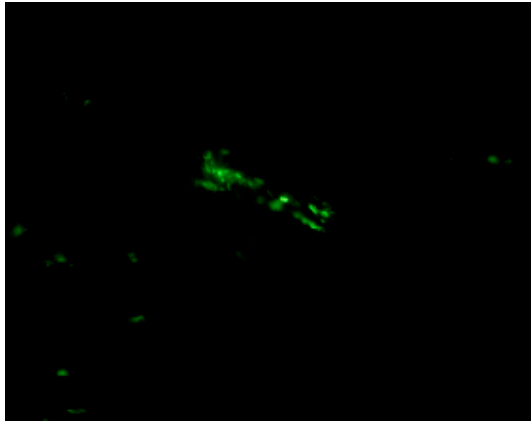


Abb. 42: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 40er, 22/18-Nachweis, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 40 und 41

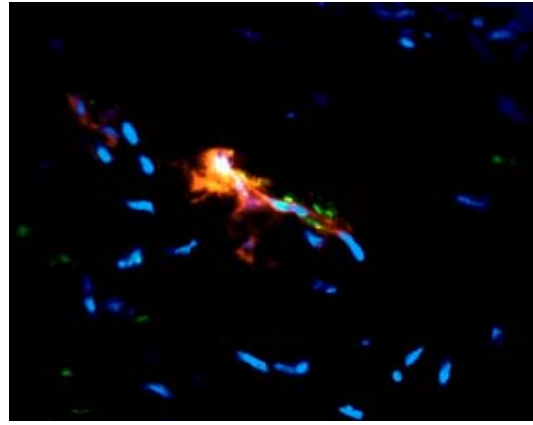


Abb. 43: Abb. 40, 41, und 42 kombiniert

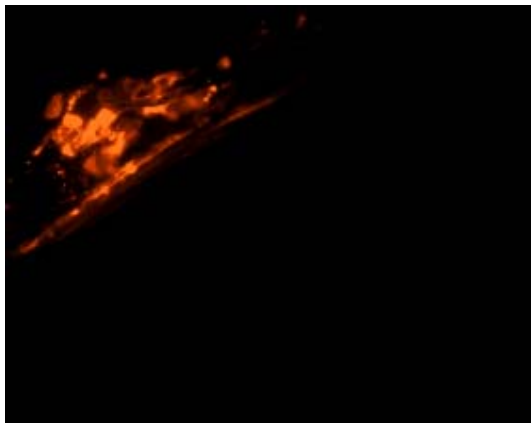


Abb. 44: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Rotfilter, 40er, DiI – Markierung der implantierten Zellen, Zellgruppe

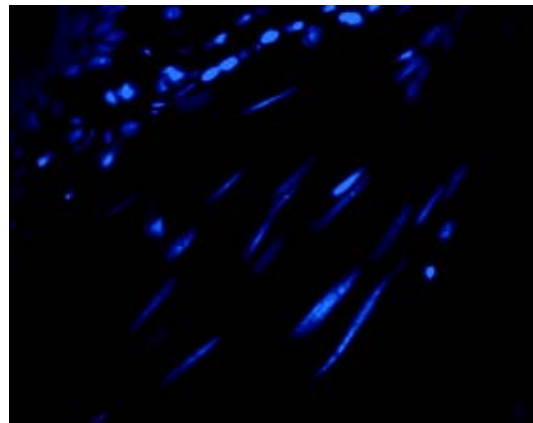


Abb. 45: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Blaufilter, 40er, Normale Kernfärbung gleicher Bildausschnitt wie Abb. 44

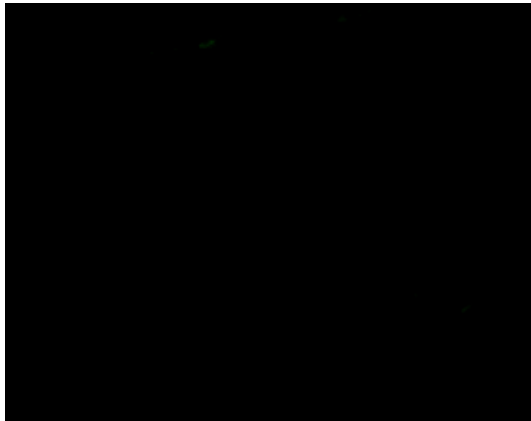


Abb. 46: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Grünfilter, 40er, 22/18 - Nachweis keine Fluoreszenz erkennbar, d.h. 22/18 - negativ

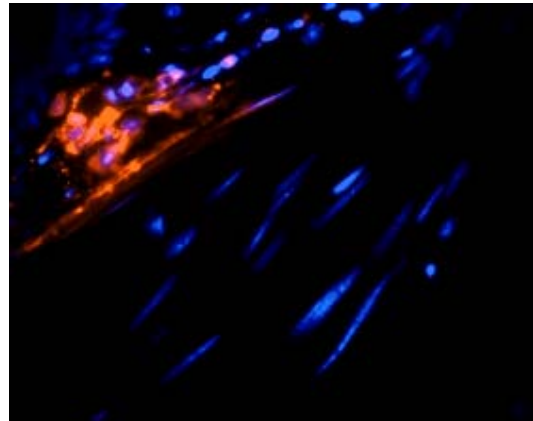


Abb. 47: Abb. 44 und 45 kombiniert

15 Tage nach der Injektion der Herzzellen, in einen sich regenerierenden Hinterbeinstumpf, konnte kein 22/18 mehr nachgewiesen werden. Allerdings gab es aus den Regeneraten Gewebeschnitte, die durchaus Vimentin – positive Implantate enthielten. Diese Implantate befanden sich in einer späten Blastemzellphase.

Nach 30 Tagen gab es keine positiven Vimentin- oder 22/18 Nachweise mehr. Es befand sich keine transplantierte Zelle mehr im Blastemzellstadium (s.u.).

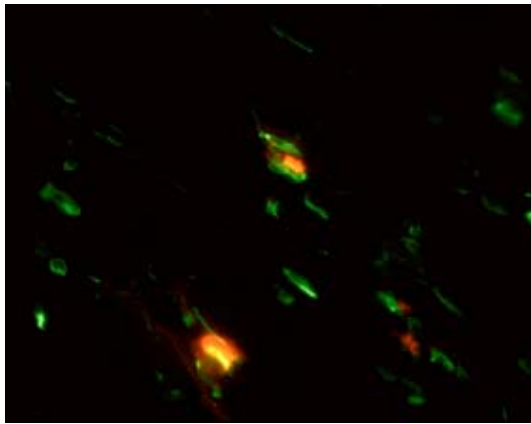


Abb. 48: 5 + 15 Tage, NS, 40er, Rot- und Grünfilteraufnahmen übereinander gelegt, rote DiI - Markierung der Implantate sowie Grünfluoreszenz durch die Vimentin-Detektion

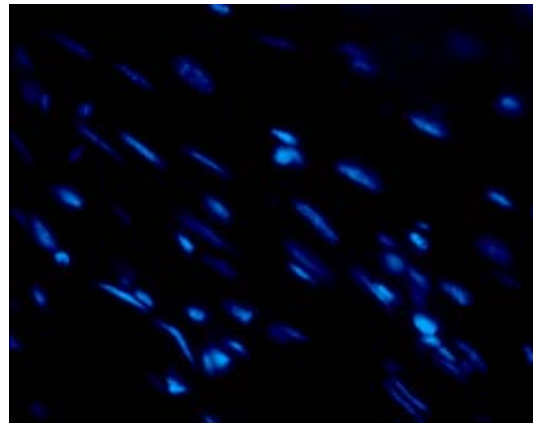


Abb. 49: gleicher Bildausschnitt wie Abb. 48, normale Kernfärbung

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Implantate in den Regeneraten sich vor dem Zeitpunkt 5+15 Tage am Ende der Blastemzellphase befanden, die vor dem Zeitpunkt 5+30 Tage abgeschlossen war. Damit war die Voraussetzung geschaffen, dass diese Zellen sich redifferenzieren konnten und in die Struktur des neu gebildeten Hinterbeines als ausdifferenzierte Gewebebestandteile integriert werden konnten.

3.3 Nur im Hinterbeinstumpf ist Tenascin in der ECM der Implantate nachweisbar

Bei der Immunhistochemie mittels MT1 (Anti-Molch-Tenascin) fand sich im Bereich der meisten implantierten Molchcardiomyozyten im Blastengebiet nach einem Tag eine signifikante und nach 15 Tagen eine sehr starke Grünfluoreszenz bei gleicher Belichtungszeit. Festzuhalten ist weiterhin, dass nach der Implantation in ein ungeschädigtes Hinterbein keine optisch erfassbare Grünfluoreszenz nachzuweisen war.

Es wurde also, im Gegensatz zu der schwachen Fibronektin – Expression um die implantierten Molchcardiomyozyten im ungeschädigten Molchhinterbein kein erfassbares MT1-Antigen innerhalb der ECM der Implantatzellen und der umgebenden Wunde durch die Injektionsnadel nachgewiesen.

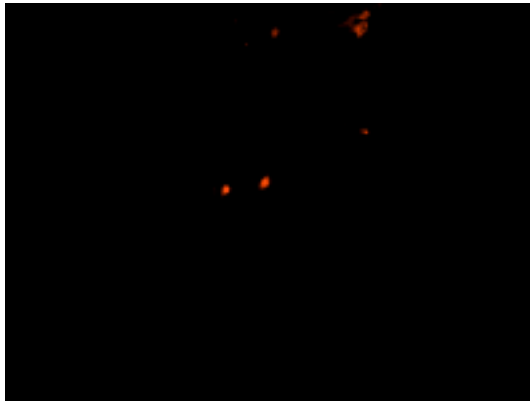


Abb. 50: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der implantierten Zellen

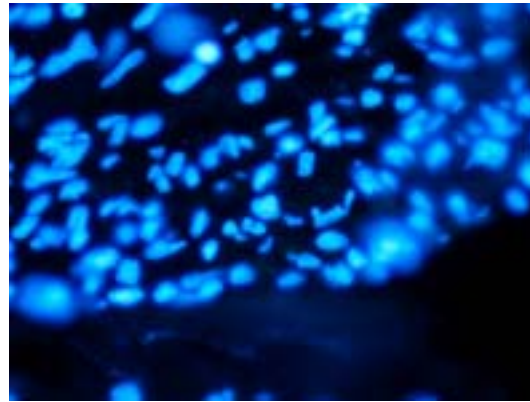


Abb. 51: 5 + 1 Tag, NS, 20er, Blaufilter, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 50

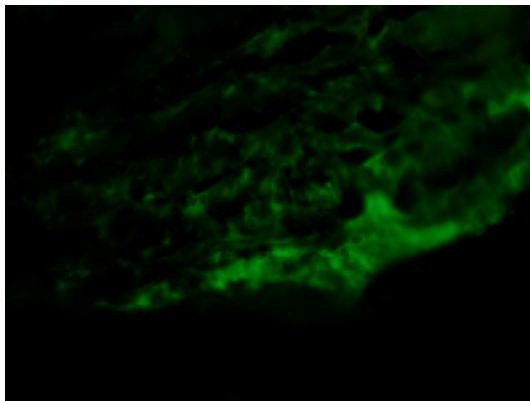


Abb. 52: 5 + 1 Tag, NS, 20er, Grünfilter, MT1-Detektion, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 50 und Abb. 51

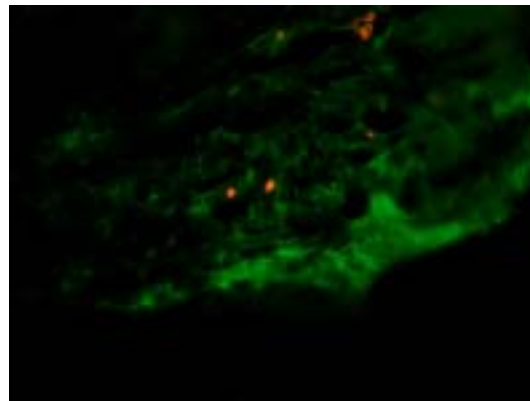


Abb. 53: Kombination von Abb. 50 und Abb. 52

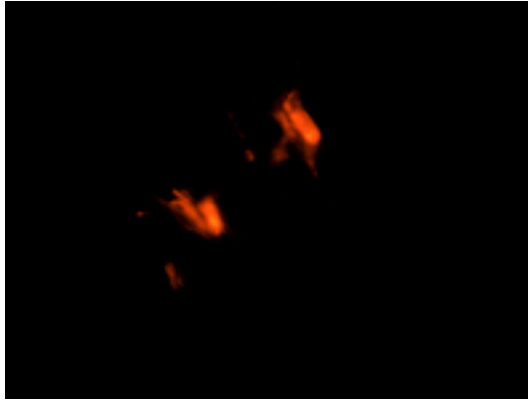


Abb. 54: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 20er, DiI - Markierung der implantierten Zellen, Gruppe von mehreren implantierten Zellen

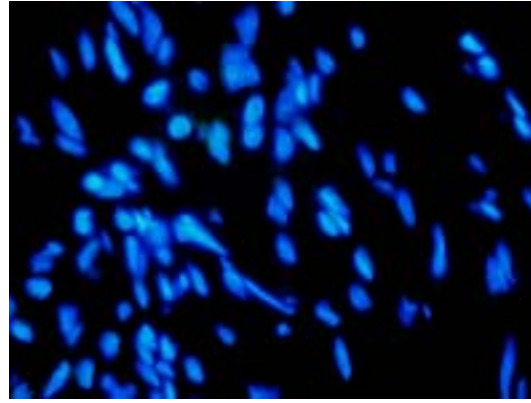


Abb. 55: 5 + 15 Tage, NS, Blaufilter, 20er, Normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 54

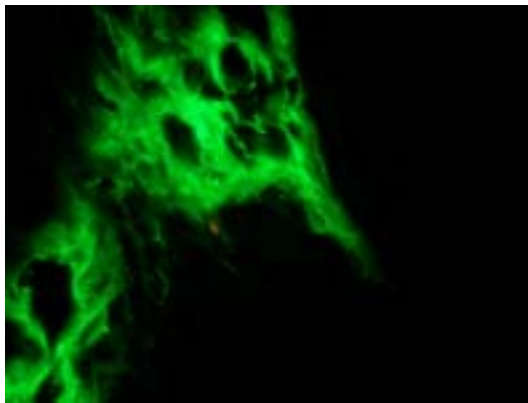


Abb. 56: 5 + 15 Tage, NS, Grünfilter, 20er, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 54 und Abb. 55, MT1-Antigennachweis im Blastemgebiet

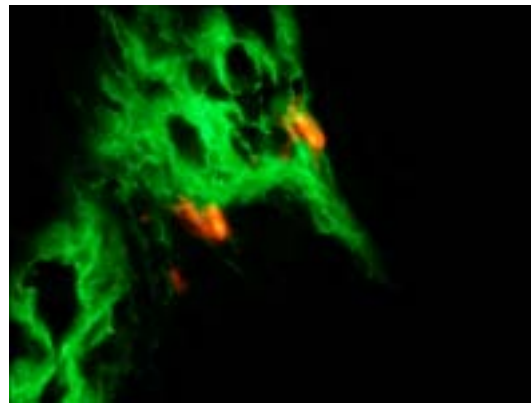


Abb. 57: Kombination von Abb. 54 und Abb. 56

Zu dem Zeitpunkt 5 + 30 Tage fanden sich nur in wenigen Gewebeschnitten injizierte Zellen, die in ihrer Umgebung eine sehr schwache Grünfluoreszenz aufwiesen. Die meisten Implantate waren bei der angegebenen Belichtungszeit komplett ohne signifikante Grünfluoreszenz. Das bedeutet, dass nach 30 Tagen kein oder nur sehr wenig Tenascin um die injizierten herum Zellen vorhanden war.

Die transplantierten Molchcardiomyozyten zeigten somit eine weitere Eigenschaft von Blastemzellen. Neben den nachgewiesenen Blastemzellmarkern 22/18 und Vimentin bildet das Tenascin in ihrer Umgebung eine der Grundlagen für ihre längerfristige Überlebensfähigkeit und der Teilnahme am Regenerationsprozess, in den sie eingebracht wurden. Das Verschwinden des Tenascins nach dreissig Tagen in der Implantatumgebung, das mit dem gleichzeitigen Rückgang der Tenascinexpression in der Wachstumszone des *N.v.* einher ging, bedeutet, dass sie ihren Blastenstatus am Ende des Blastemzellstadiums verlieren.

3. 4 Viel Fibronectin in der ECM der Implantate in Hinterbeinstümpfen

Bei der indirekten Immunfluoreszenz zeigte sich innerhalb des Blastemgebiets der Wachstumsspitze der Hinterbeinstümpfe zu den ausgewählten Zeitpunkten 1, 15 und 30 Tage nach der Implantation ein Verteilungsmuster für Fibronectin in der Umgebung der Blastemzellen wie es andere Autoren bereits beschrieben haben. Die eingebrachten Implantatzellen waren bereits einen Tag nach ihrer Injektion in ihrer unmittelbaren Umgebung von einem Netzwerk an Fibronectin (MT-4) umgeben wie es sich schon bei den endogenen Blastemzellen darstellte. Dies traf aber wiederum nur für die Zellen zu, die in einen Hinterbeinstumpf implantiert wurden. Die Zellen, die in ein ungeschädigtes Hinterbein verbracht wurden, waren zwar zum Zeitpunkt einen Tag nach Injektion von detektierbarem Fibronectin umgeben. Dieses erschien aber bei keiner der gewonnen Gewebeschnitte so stark fluoreszierend, also weniger fibronectinhaltig wie bei den zuvor beschriebenen, welche in einen regenerierenden Hinterbeinstumpf implantiert wurden.

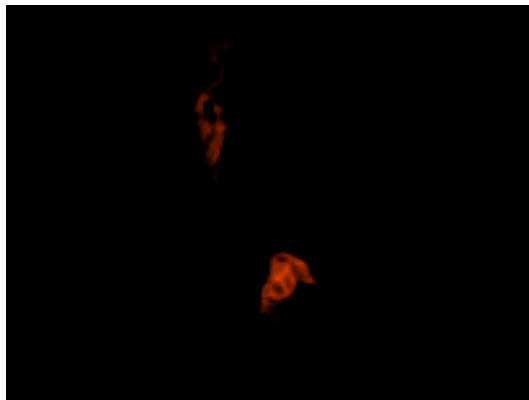


Abb. 58: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 20er, DiI – Markierung der implantierten Zellen, zwei Zellgruppen

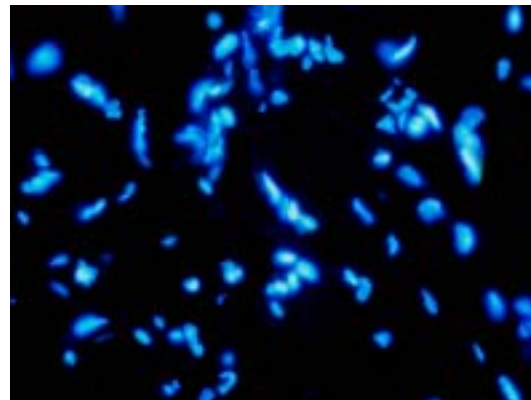


Abb. 59: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, 20er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 58

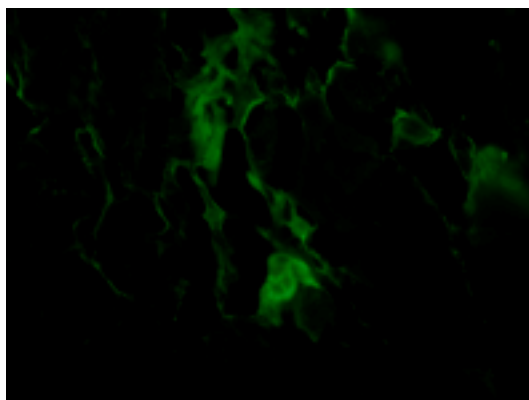


Abb. 60: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 20er, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 58, Fibronectindetektion

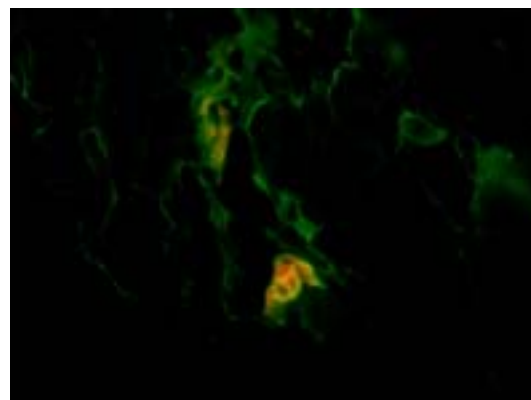


Abb. 61: Abb. 58 und Abb.60 kombiniert, beachte die Beziehung des Fibronectins zur Zellmembran

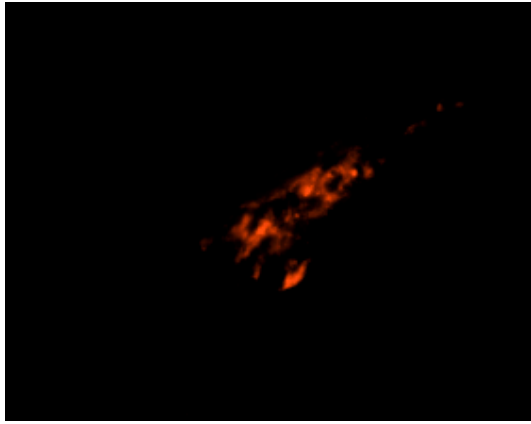


Abb. 62: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Rotfilter, 20er, DiI - markierte implantierte Zellen

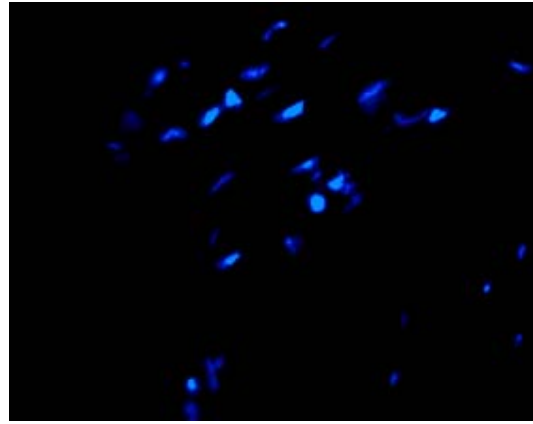


Abb. 63: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Blaufilter, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 62

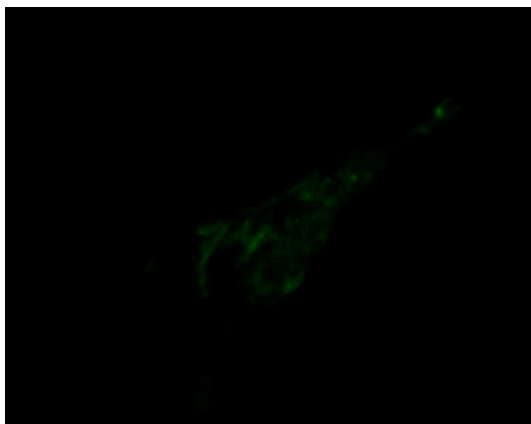


Abb. 64: 1 Tag nach Implantation, komplettes Hinterbein, Grünfilter, 20er, Fibronektindetektion

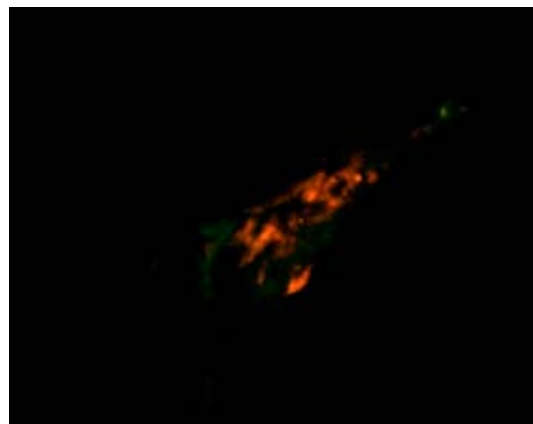


Abb. 65: Abb. 62 und Abb. 64 kombiniert

Zum Zeitpunkt 5 + 15 Tage wurden in sämtlichen untersuchten Gewebeschnitten von Hinterbeinstümpfen viele Implantatzellen beobachtet und dokumentiert, die sich ebenfalls in einer fibronektinhaltigen ECM befanden, neben solchen die kein Fibronectin mehr aufzeigten.

Die in komplette Hinterbeine injizierten Zellen zeigten nach 15 Tagen dagegen keine zu beobachtende Grünfluoreszenz bei der Fibronektin-Detektion mehr. Das heisst, dass die in einen Hinterbeinstumpf verbrachten Implantat-Zellen nicht nur, wie bei den Untersuchungen zu 22/18 und Vimentin gezeigt, bereits nach einem Tag dedifferenziert waren, sondern auch in Hinblick auf die Proliferationsuntersuchungen, einige Implantat-Zellen 15 Tage nach Injektion in einen Hinterbeinstumpf weiterhin Blastem-Charakter besaßen. Sie waren bereit, im Rahmen der Hinterbeinregeneration zu proliferieren und sich zu redifferenzieren. Das gänzliche Fehlen von Fibronectin nach 15 und 30 Tagen, bei den in komplette Hinterbeine implantierten Zellen, zeigt zudem den entscheidenden Einfluss des Blastemgebiets auf die weitere Entwicklung der implantierten Zellen.

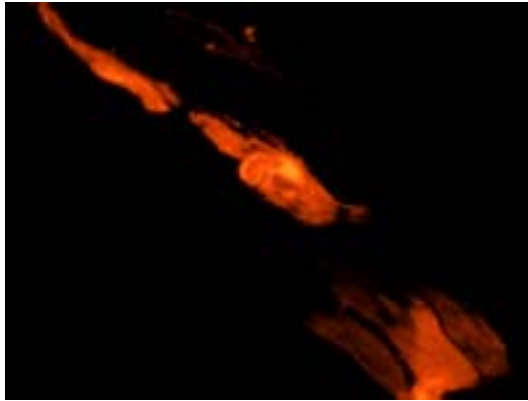


Abb. 66: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 40er, DiI - Markierung der implantierten Zellen, Zellgruppe mit strangartiger Anordnung

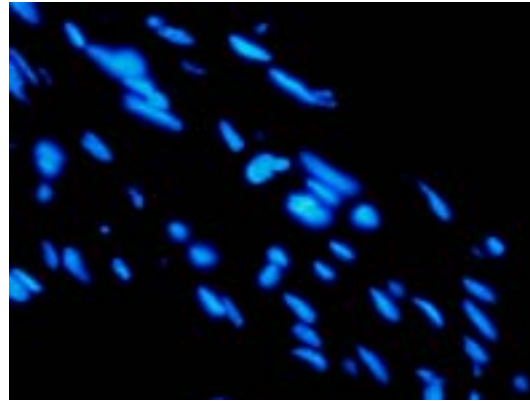


Abb. 67: 5 + 15 Tage, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 66

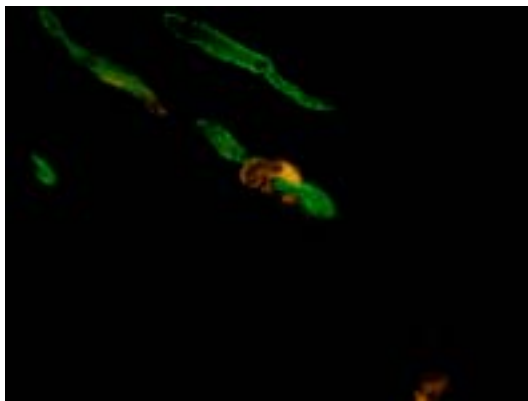


Abb. 68: 5 + 15 Tage, NS, Grünfilter, 40er, Fibronectin - Expression, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 66

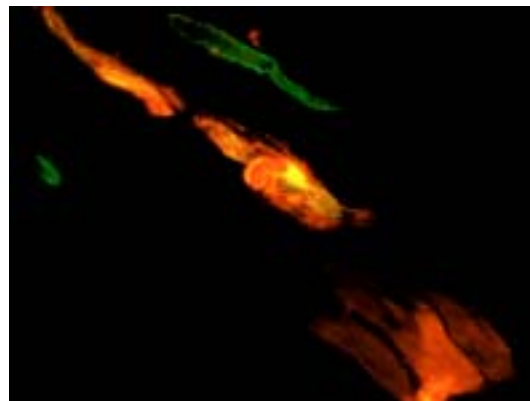


Abb. 69: Kombination von Abb. 66 und Abb. 68 unten rechts sind Fibronectin - negative Implantatzellen zu erkennen.

30 Tage nach Zelltransplantation (5 + 30 Tage) konnte in den angefertigten Versuchsreihen, auch im sich regenerierenden Hinterbeinstumpf, keine fibronectinhaltige ECM um Implantatzellen herum mehr nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass die eingebrachten Zellen nicht apoptotisch waren, ihren Blastemcharakter aufgaben, sich weiterentwickelten und sich redifferenziert haben.

Zusammen mit den Ergebnissen zu Tenascin, diente hier das Fibronektingerüst des Blastemgebietes den Implantaten als Überlebensgrundlage und bildete die Voraussetzung für diese Zellen, sich durch Migration und Proliferation an dem Regenerationsprozess des Hinterbeines zu beteiligen.

3. 5 Nachweisbares FAK P-Tyr-397-Vorkommen in Implantaten in Hinterbeinstümpfen

In den aus regenerierenden Hinterbeinstümpfen angefertigten Gewebeschnitten zeigte sich eine signifikante Grünfluoreszenz mittels *Anti-FAK Phospho - Specific (Tyr-397)* –Detektion bei den meisten aus implantierten Cardiomyozyten hervorgegangenen Zellen. Zu den Zeitfenstern 5 + 1 und 5 + 15 Tage zeigten die meisten Implantatzellen ein hochgradiges Vorkommen von FAK P-Tyr-397. Mit dem Zurückgehen der Blastemzellmarker sowie von Tenascin und Fibronectin wurde nach 5 + 30 Tagen in wenigen Gewebeschnitten eine geringere Grünfluoreszenz, bei gleicher Belichtungszeit und somit eine geringere aber signifikante *FAK P-Tyr-397*-Expression nachgewiesen.

In Korrelation zu den Blastemzellen des Stumpfes hatte die Fokale-Adhäsions-Kinase einen ähnlichen Stellenwert für die Implantate. Der Initiationsphosphorylierungsschritt am Tyrosinrest Tyr-397 der FAK sicherte den Implantaten das Überleben in der Regenerationszone in die sie eingebracht wurden und zeigt über Integrine den intensiven Kontakt zur umgebenden ECM mit dem enthaltenen Fibronectin-Gerüst. Zudem ist mit der FAK-Aktivierung die Grundlage geschaffen, durch weitere Phosphorylierungsschritte die in der Einleitung beschriebenen Signalkaskaden in Gang zu setzen, die die Implantate befähigen in den Zellzyklus einzutreten. Somit sind diese in die Lage versetzt worden als dedifferenzierte Blasten nach Migration und Proliferation an der Regeneration des Hinterbeines teilzunehmen.

Im Gegensatz dazu war das Vorhandensein der Fokalen-Adhäsions-Kinase P-Tyr-397 bei den in ungeschädigte Hinterbeine eingebrachten Cardiomyozyten sehr gering und nur im Bereich weniger Zellen nachweisbar, was wie schon bei anderen in dieser Arbeit untersuchten Markern für die Inaktivität der Implantate innerhalb ungeschädigter Hinterbeine spricht. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass die transplantierten Zellen eine geringe FAK-Aktivität benötigen, um auch im nicht regenerierenden Gewebe überleben zu können.

Mit den untersuchten Blastemzellmarkern und Charakteristika deuten die Ergebnisse aus der FAK-Detektion auf eine Korrelation zwischen der Expressionsstärke der Fokalen-Adhäsions-Kinase und den ausgebildeten Zellkontakten zur ECM hin. Außerdem sprechen die Ergebnisse dafür, dass die aus den transplantierten Cardiomyozyten hervorgegangenen Zellen die Fähigkeit zur Proliferation und nachfolgenden Redifferenzierung erworben haben.

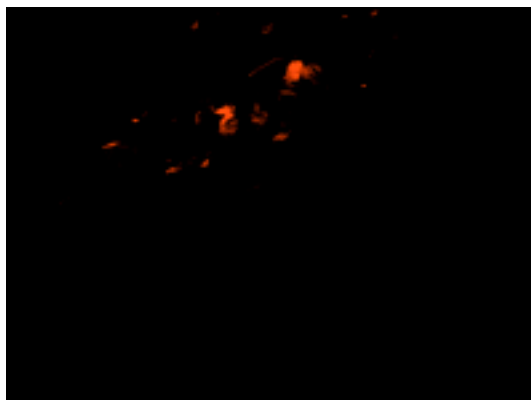


Abb. 70: 5 + 1 Tag, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der Transplantatzellen in Hinterbeinstumpf

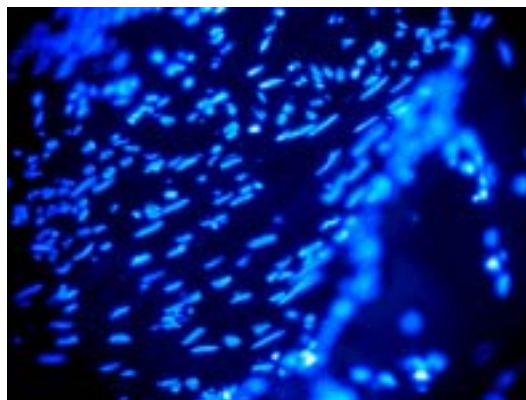


Abb. 71: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, 20er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 70

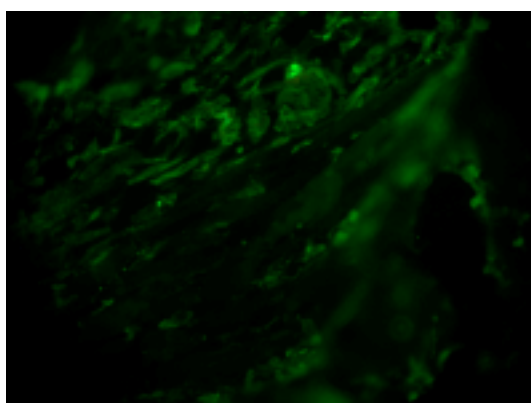


Abb. 72: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 20er, FAK-Detektion, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 70

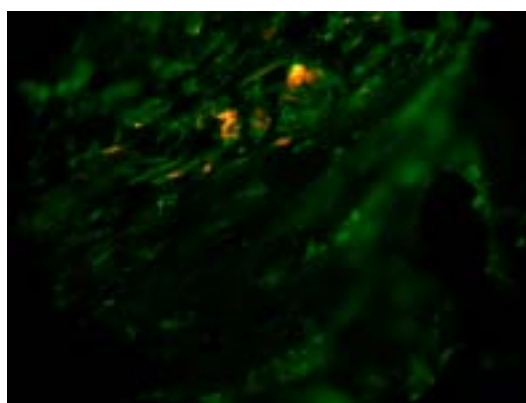


Abb. 73: 5 + 1 Tag, Abb. 70 und 72 kombiniert

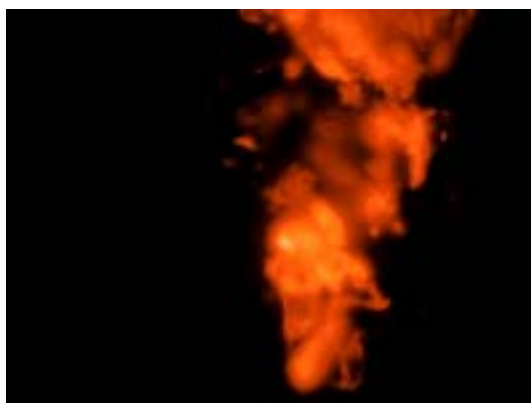


Abb. 74: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 40er, DiI - Markierung der Implantatzellen im Hinterbeinstumpf, zu beachten ist die injektionsbedingte Schädigung einiger randständiger Zellen (Membranfetzen)

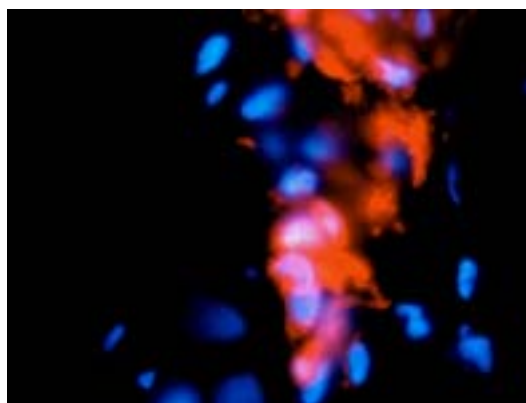


Abb. 75: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 74, mit Rotfilter kombiniert

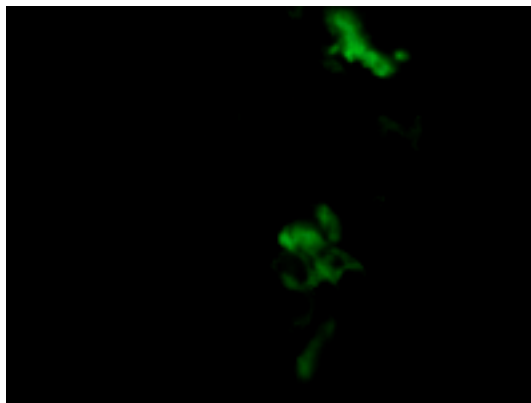


Abb. 76: 5 + 1 Tag, Grünfilter, 40er, FAK-Detektion, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 74

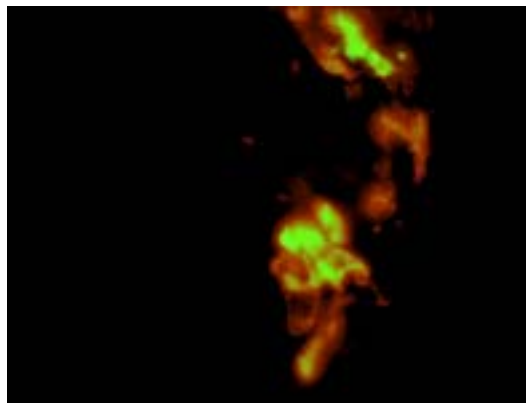


Abb. 77: 5 + 1 Tag, Abb. 74 und 76 kombiniert, es sind auch wenige Implantate zu sehen, die nicht FAK-Tyr-397-positiv sind

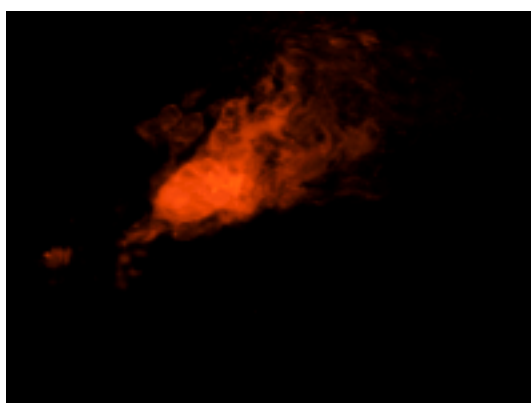


Abb. 78: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Transplantatzellen in Hinterbeinstumpf

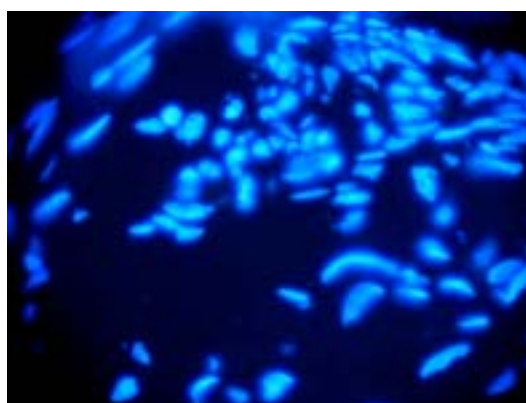


Abb. 79: 5 + 15 Tage, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 78

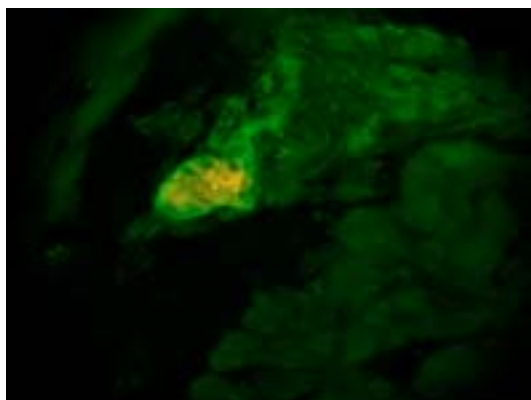


Abb. 80: 5 + 15 Tage, NS, Grünfilter, 40er, FAK-Tyr-397-Detektion, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 78

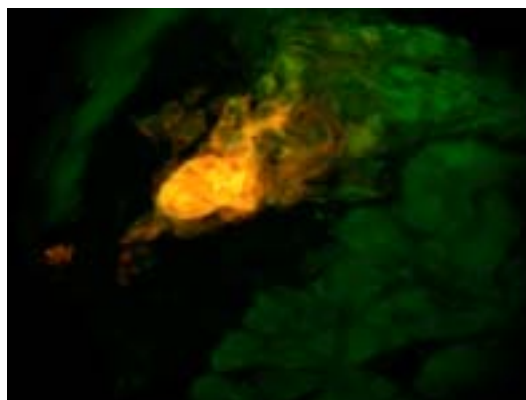


Abb. 81: 5 + 15 Tage, Abb. 78 und Abb. 80 kombiniert

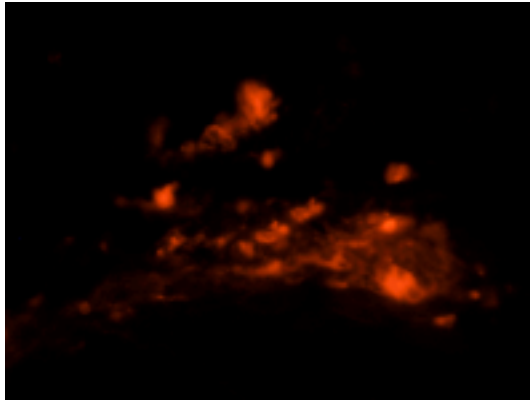


Abb. 82: 5 + 30 Tage, NS, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der Implantatzellen im Hinterbeinstumpf

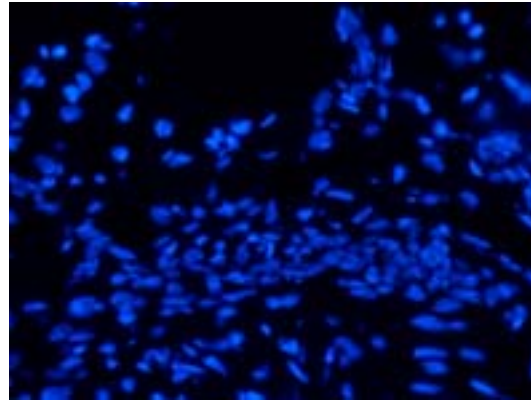


Abb. 83: 5+30 Tage, NS, Blaufilter, 20er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 82

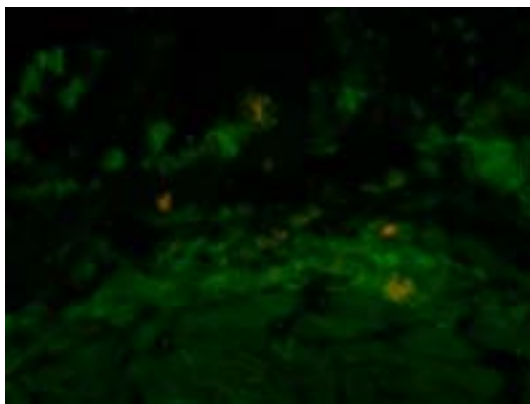


Abb. 84: 5 + 30 Tage, NS, Grünfilter, 20er, FAK-Tyr - 397 - Detektion, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 82, erkennbar ist die schwächere Grünfluoreszenz im Vergleich zu 5+1 und 5+15 Tagen mit gleicher Belichtungszeit

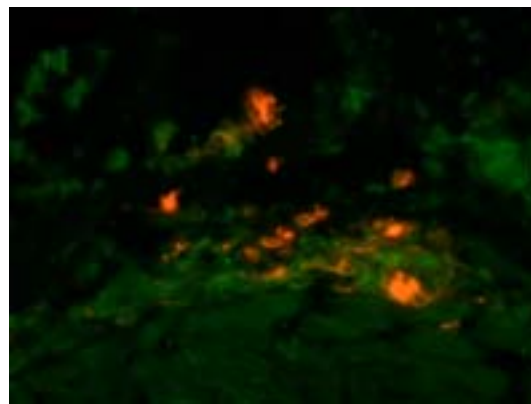


Abb. 85: 5 + 30 Tage, Abb. 82 und Abb. 84 kombiniert

Dennoch deutet das Ergebnis nach 30 Tagen für die in regenerierende Hinterbeinstümpfe eingebrachten Molchcardiomyozyten darauf hin, dass die Fokale-Adhäsions-Kinase mit neuen Integrinen und der unten beschriebenen Komponente Laminin-alpha-2 neue Signalwege initialisiert, um die spätere Reorganisation regulieren zu können.

3.6 Implantatzellen im Hinterbeinstumpf proliferieren

Bei der unter Verwendung von Molchdarm erhaltenen Referenzdarstellung zeigten sich mehrere fluoreszierende Zellkerne von mitotischen Zellen. Pro angefertigtem Foto von unterschiedlichen Darmabschnitten und unterschiedlichen Schnittbereichen konnten mindestens ein oder zwei Zellkerne mit dieser Eigenschaft dokumentiert werden.

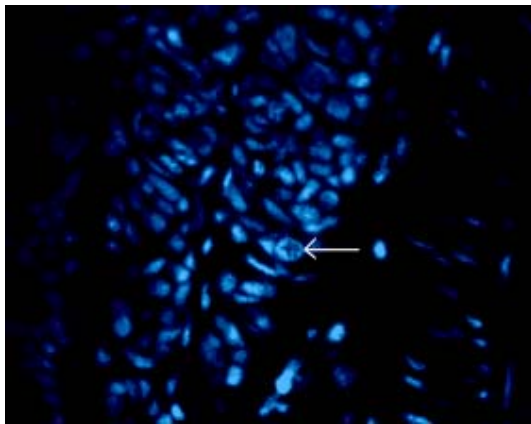


Abb. 86: Positivkontrolle Molchdarm, 40er, Blaufilter, normale Kernfärbung, Darstellung von Mukosa und Submukosa, der Pfeil zeigt auf den gleichen Kern wie in Abb. 87

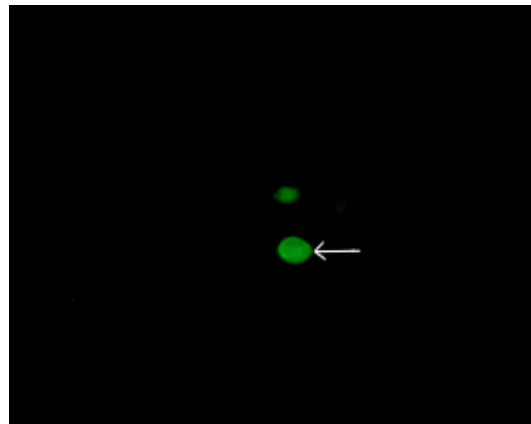


Abb. 87: Positivkontrolle Molchdarm, Grünfilter, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 86, fluoreszierende Zellkerne zweier proliferierender Zellen, Pfeil zeigt auf den Kern wie bei Abb. 86

Bei der Phospho-Histon H3 (pSer₂₈) – Detektion in sich regenerierenden Molchhinterbeinstümpfen wurden nach einem Tag fluoreszierende Kerne von Implantatzellen, welche auf einen Proliferationsvorgang hindeuten, und solche mit Zellkernen die Phospho-Histon H3 (pSer₂₈) – negativ waren nachgewiesen. Daneben waren auch Zellen innerhalb des Blastembereichs bzw. in der Hinterbeinstumpfspitze als mitotisch mittels Phospho-Histon H3 – Detektion (pSer₂₈) erkennbar.



Abb. 88: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Transplantatzellen, Zellverband, beachte die Markierung der Zellmembran und die Aussparung im Zellinnern (Pfeil)

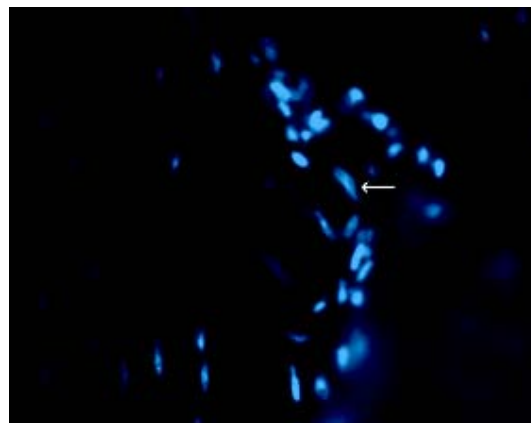


Abb. 89: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 88, der Pfeil zeigt auf den Zellkern der in Abb. 88 die Aussparung verursacht

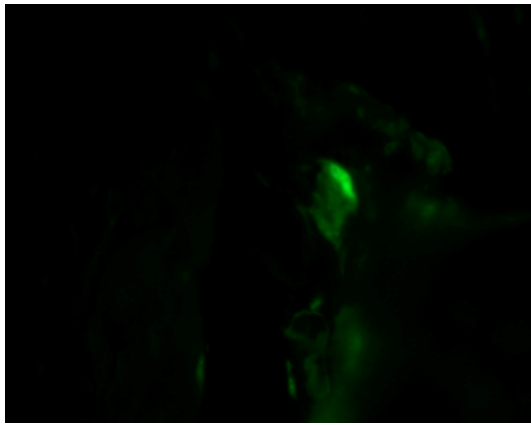


Abb. 90: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 40er, Phospho-Histon H3 (pSer28), ein einzelner positiver Implantat-Zellkern

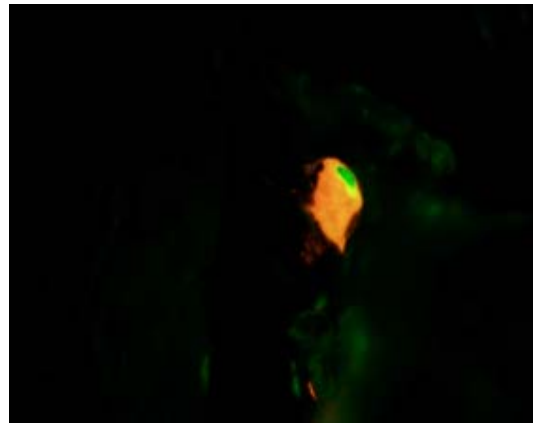


Abb. 91: 5 + 1 Tag, Abb. 88 und Abb. 90 übereinander gelegt

Zu den Zeitpunkten 15 Tage und 30 Tage nach Transplantation wurden in keiner der angefertigten Gewebeschnitte mitotische Implantat-Zellen gefunden.



Abb. 92: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Transplantat-Zellen, zwei Zellen (die untere Zelle nur teilweise angeschnitten)

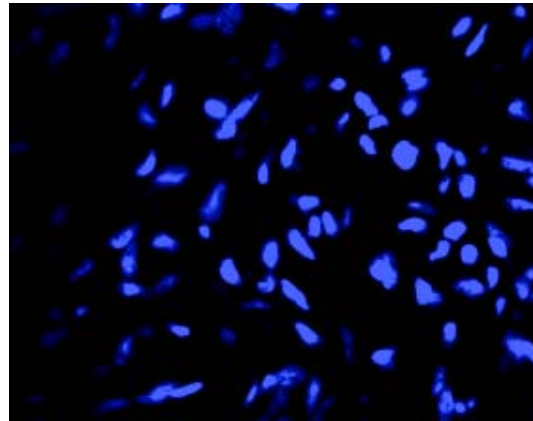


Abb. 93: 5 + 15 Tage, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 92

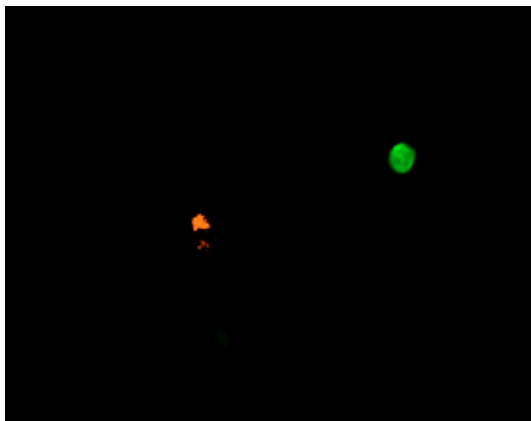


Abb. 94: 5 + 15 Tage, Rot- und Grünfilteraufnahme übereinander gelegt, 40er, Transplantat-Zellen und proliferierende Zelle nebeneinander

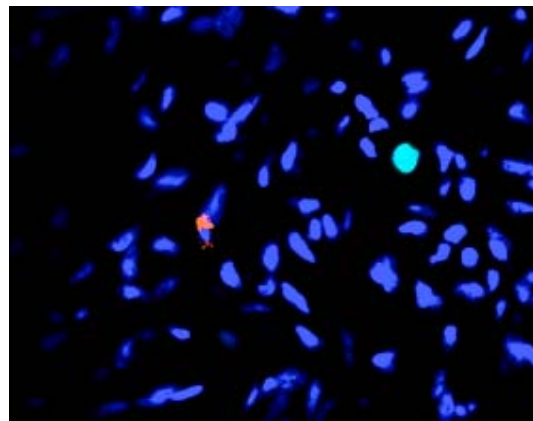


Abb. 95: 5 + 15 Tage, Rot-, Grün- und Blaufilteraufnahmen kombiniert

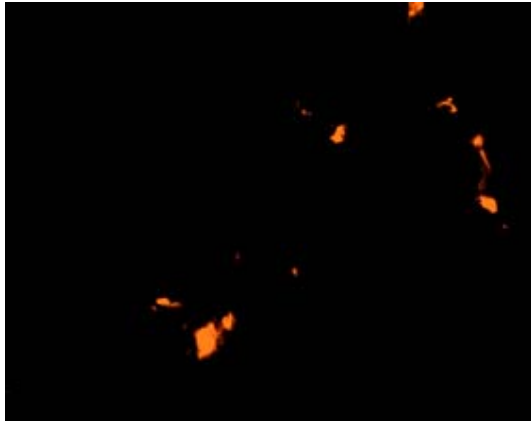


Abb. 96: 5 + 30 Tage, NS, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der Transplantatzellen, Zellgruppe mit mehreren implantierten Zellen

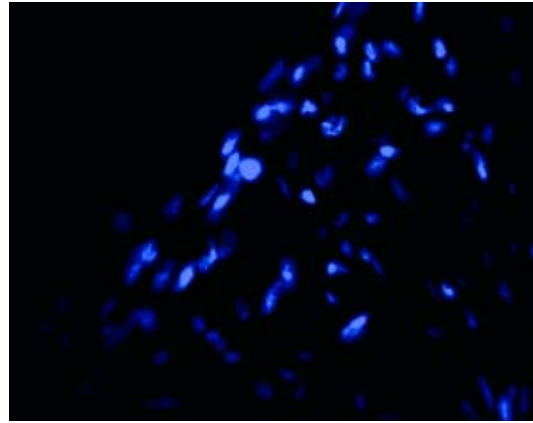


Abb. 97: 5 + 30 Tage, NS, Blaufilter, 20er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 96

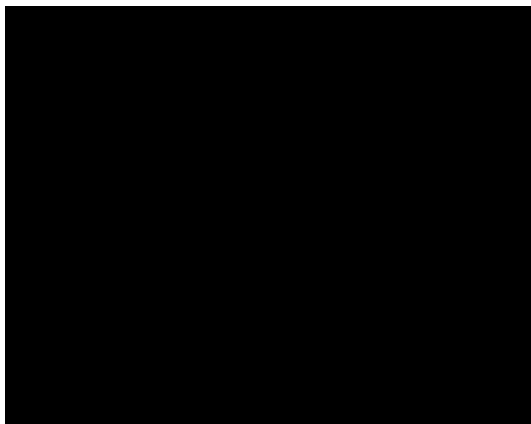


Abb. 98: 5 + 30 Tage, Grünfilter, 20er, Phospho-Histon H3 (pSer28)-Detektion, keine mitotischen Zellkerne, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 94

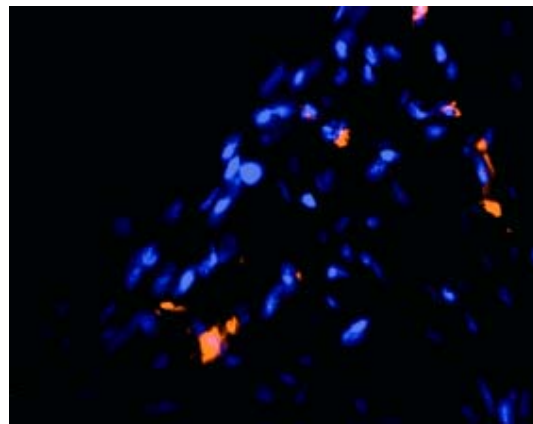


Abb. 99: 5 + 30 Tage, Abb. 96 und Abb. 97 übereinandergelegt

Aus den Beobachtungen der Gewebeschnitte der Molchhinterbeinstümpfe war erkennbar, dass die transplantierten Zellen dann proliferierten, wenn sie sich unter dem Einfluss des Blastemgebiets der Wachstumsspitze befanden. Denn bei der Untersuchung der in komplette Hinterbeine eingebrachten Molchcardiomyozyten wurden keine proliferierenden Zellen gefunden.

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, waren die in ein Blastemgebiet eingebrachten Zellen durch ihren erworbenen eigenen Blastemcharakter in der Lage zu proliferieren und sich an der Regeneration des *Notophthalmus viridescens* zu beteiligen. Dies deutet darauf hin, dass sich die Dedifferenzierung dieser Zellen unter dem Einfluss des umgebenden Blastemgebietes innerhalb eines Tages abgespielt haben könnte.

3.7 Unterschiedliche Laminin – alpha 2 - Verteilung

Anhand des immunhistochemischen Nachweises mittels Anti-Laminin-alpha-2-Antikörpern und zugehörigem Konjugat wurde dokumentiert, dass die meisten Implantatzellen nach einem Tag Laminin-alpha-2-positiv waren. Die Lokalisation entsprach allerdings eher einer schleierförmigen Anordnung um die jeweiligen Zellen herum, im Vergleich zu den in manchen Aufnahmen sichtbaren quergestreiften Muskeln, die sich in der Nähe der Regenerationszone befanden. Bei diesen zeigte sich eine regelmäßige, eng anliegende und der Eigenkontur folgende Laminin-alpha-2-Verteilung.

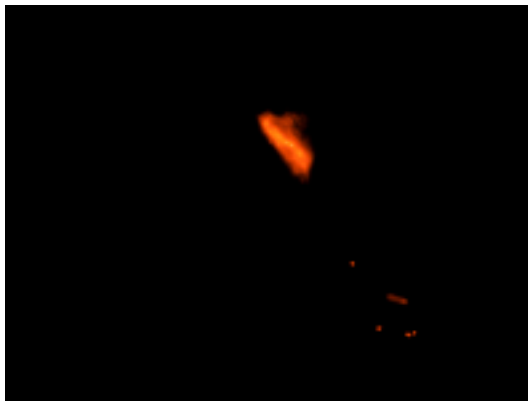


Abb. 100: 5 + 1 Tag, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Implantatzellen in Hinterbeinstumpf, abgebildet sind mehrere Zellen

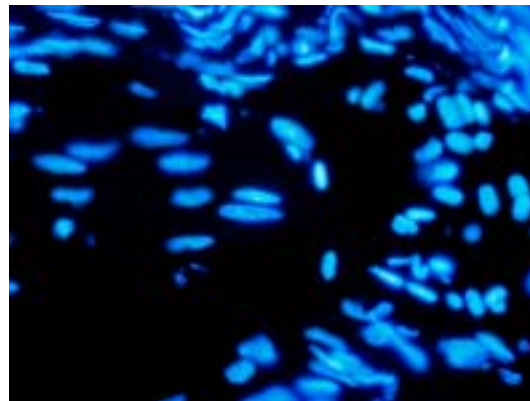


Abb. 101: 5 + 1 Tag, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 100

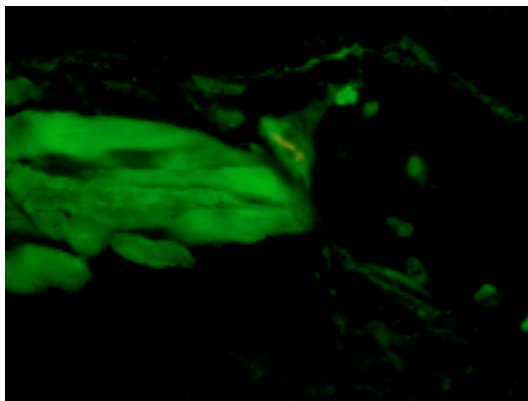


Abb. 102: 5 + 1 Tag, NS, Grünfilter, 40er, Laminin-alpha-2, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 100, Blastemgebiet rechts, links normale Skelettmuskulatur, mitte Implantatzellen

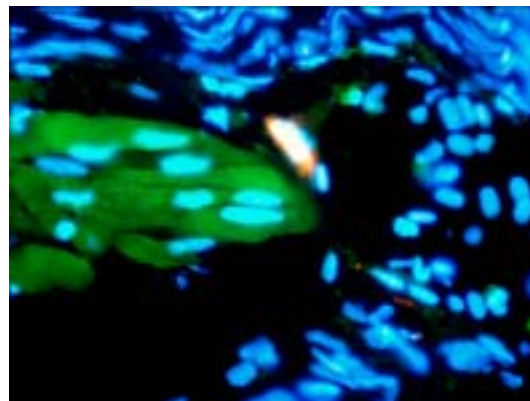


Abb. 103: 5 + 1 Tag, Abb. 100, 101 und 102 kombiniert

Die in komplette Hinterbeine implantierten Molchcardiomyozyten behielten ihre für quergestreifte Muskulatur typische Merosin-Verteilung, in Bezug auf Begrenzung und Nähe zur Zellwand, welche also nicht der Verteilung bei den oben beschriebenen Zellen im Hinterbeinstumpf entspricht. Auch nach 15 und nach 30 Tagen veränderten sich die

Merosinverteilungsmuster in kompletten Hinterbeinen nicht.

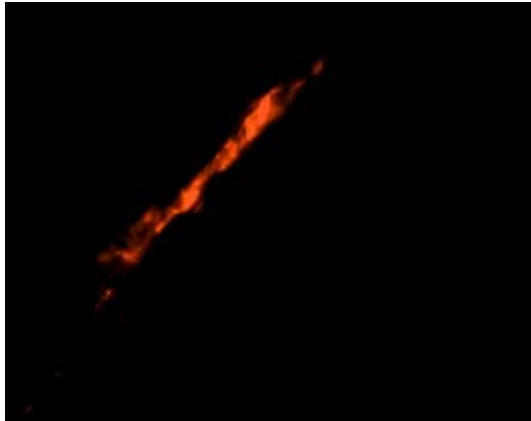


Abb. 104: 1 Tag, HB, Rotfilter, 20er, DiI-Markierung der Implantatzellen im kompletten Hinterbein, strangartige Anordnung

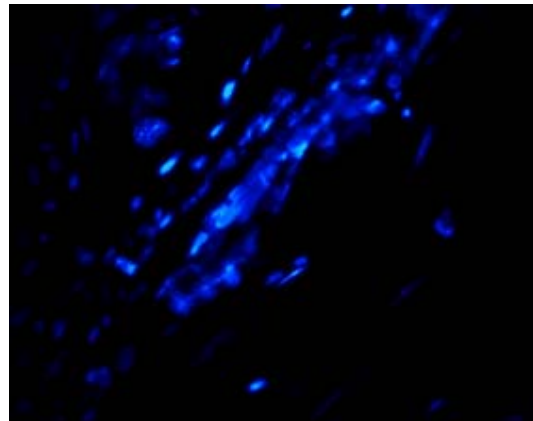


Abb. 105: 1 Tag, HB, Blaufilter, 20er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 104

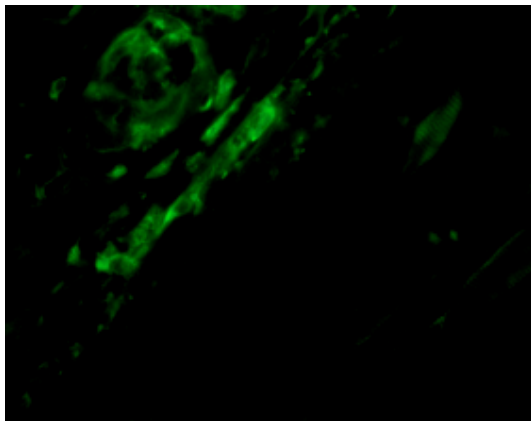


Abb. 106: 1 Tag, HB, Grünfilter, 20er, Laminin-alpha-2 - Nachweis, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 104

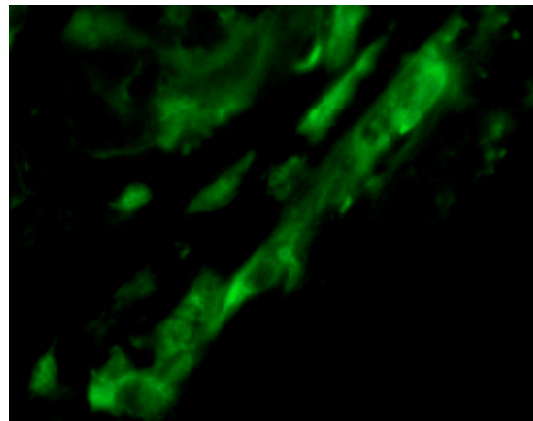


Abb. 107: 1Tag, HB, Ausschnitt aus Abb. 106 mit 40-facher Vergrößerung und Zoom, die Merosinanordnung ähnelt der der nativen quergestreiften Molchskelettmuskulatur (siehe Abb.102)

Bei den Cardiomyozyten, die in regenerierende Hinterbeinstümpfe transplantiert wurden, änderte sich die Merosinverteilung bei einigen Zellen nach 15 Tagen. Sie ähnelte der begrenzten Verteilung wie sie bei den in komplette Hinterbeine eingebrachten Zellen beschreiben wurde. Bei anderen Zellen fand sich mit der verwendeten immunhistochemischen Methode wenig oder kein quantitativ nachweisbares Laminin-alpha-2-protein mehr. Nach 30 Tagen zeigte sich bei den Implantaten im Hinterbeinstumpf ein ähnliches Bild.

Anhand dieser Ergebnisse könnten sich einige implantierte Molch-Herzzellen nach dem Blastemzellstadium zu neuen Skelettmuskelzellen redifferenziert haben. Es wäre möglich, dass sich andere Zellen zu weiteren Zelltypen spezialisiert haben.



Abb. 108: 5 + 15 Tage, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Transplantatzellen im Hinterbeinstumpf

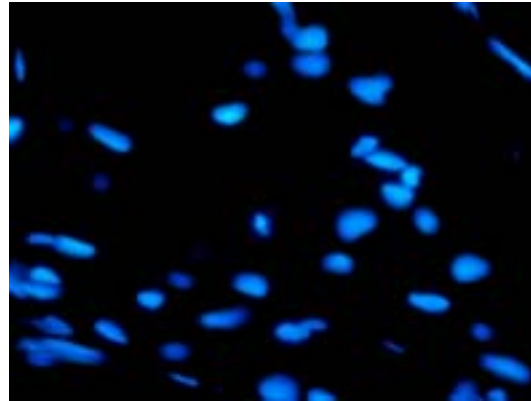


Abb. 109: 5 + 15 Tage, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 108

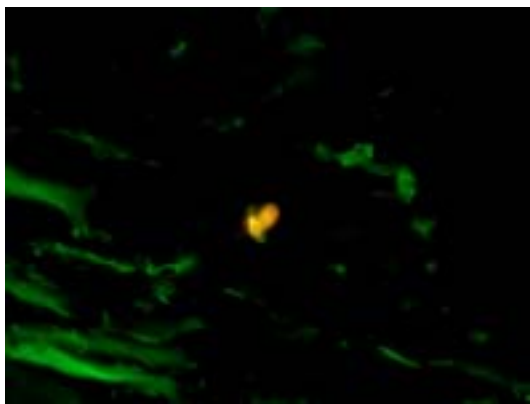


Abb. 110: 5 + 15 Tage, NS, Grünfilter, 40er, Laminin-alpha-2 Nachweis, es lässt sich nur noch ein schmaler gürtelartiger Merosinrest an dem Implantat erahnen, vergleiche die angeschnittenen Muskelzellen links

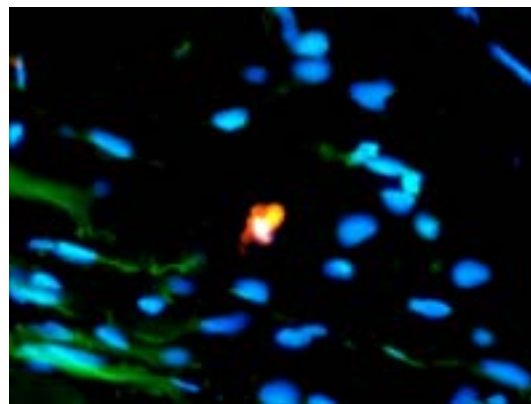


Abb. 111: Kombinationsaufnahme von Abb. 108, Abb. 109 und Abb. 110



Abb. 112: 5 + 30 Tage, NS, Rotfilter, 40er, DiI-Markierung der Transplantatzellen in Hinterbeinstumpf

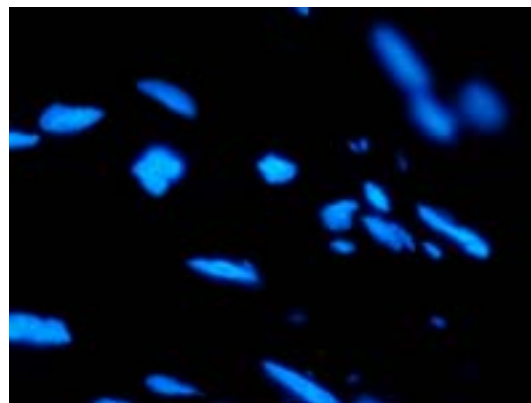


Abb. 113: 5 + 30 Tage, NS, Blaufilter, 40er, normale Kernfärbung, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 112

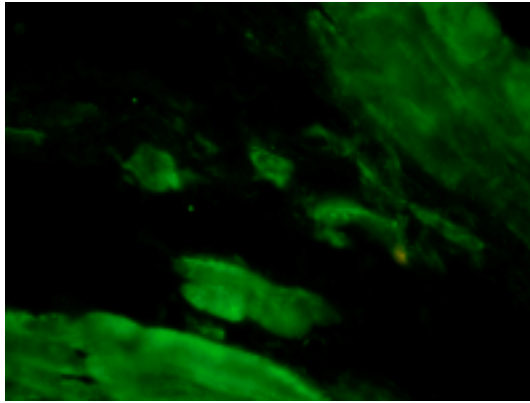


Abb. 114: 5 + 30 Tage, NS, Grünfilter, 40er, Laminin- alpha- 2 - Nachweis, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 112, schräg angeschnittene Implantat-Zellgruppe

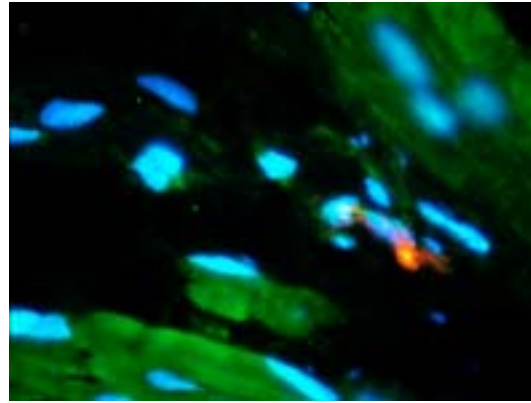


Abb. 115: 5 + 30 Tage, Kombinationsaufnahme von Abb. 112, 113 und 114

Da die schleierartigen Reste des untersuchten Merosins mit dem gleichzeitigen Auftreten der betrachteten Blastemzellmarker einherging, deutet dies darauf hin, dass die injizierten Herzzellen in den Blastemgebieten tatsächlich dedifferenzierten und ihre herzmuskelspezifischen Eigenschaften verloren. Nach der Proliferation redifferenzieren diese zu unterschiedlichen Zelltypen, wie zum Beispiel zu neuen Skelettmuskelzellen.

Es ist möglich, dass Laminin-alpha-2 ebenfalls an der Signaltransduktion zwischen ECM und Zellinnerem beteiligt war wie es verschiedene Autoren für normale Blastemzellen beschrieben haben. Die Implantate wären so zum Beispiel in der Lage, neue Muskelfasern zu bilden und somit bei der Neuentstehung eines kompletten Hinterbeines mitzuwirken. Es ist wahrscheinlich, dass sie sich den gleichen Kontaktmechanismen bedienen wie es die Blastemzellen des Ursprungsblastems taten.

4. Diskussion

4.1 Diskussion Material und Methoden

4.1.1 Untersuchungszeitpunkte

Die festgelegten Untersuchungszeitpunkte, wie in der Einleitung beschrieben, entsprechen bestimmten Regenerationsstadien des *Notophthalmus viridescens*. Eine tägliche Untersuchung würde die Aussagekraft der Ergebnisse verbessern. Dieses hätte allerdings einen enorm größeren Bedarf an Molchen zur Folge gehabt und in Anbetracht der Rationalität und der Tiere mussten die Untersuchungszeitpunkte möglichst effektiv reduziert werden, um trotzdem eine möglichst hohe Aussagefähigkeit beizubehalten.

Dies bedeutet allerdings, dass die angefertigten Aufnahmen nur Momentaufnahmen darstellen, worauf später noch eingegangen wird. Auf die Ereignisse zwischen den jeweiligen Zeitpunkten konnte nur aus den erzielten Ergebnissen geschlossen werden. Zusätzlich orientierte sich die Ergebnisinterpretation an den Publikationen der in der Einleitung zitierten Autoren über die Blastemzeleigenschaften und Regenerationsstadien.

4.1.2 Tierhaltung

Die Tierhaltungsbedingungen resultierten aus den Erfahrungen des Instituts mit diesen Tieren und den Haltungsempfehlungen aus verschiedenen Quellen (9, 13, 34). Kranke Tiere wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen und separat gehalten.

4.1.3 Operationsbedingungen und Kultur

Die Vorbereitung der Transplantation mit Penicillin – Streptomycin ist aus der Literatur übernommen worden, um die Molche möglichst frei von Fremdkeimen zu halten (29). Die Entnahme, Amputationen und Injektionen erfolgten in Anlehnung an die Literatur (29) und wurden nach eigenen Erfahrungen modifiziert. Bei den Vorexperimenten stellte sich heraus, dass nach der beschriebenen *Jodobac* - Desinfektion fast kein Tier mehr an Wundinfektionen an den Hinterbeinen erkrankte, wie dies bei der mit Ethanol durchgeführten Reinigung des Operationsgebiets häufiger vorkam (Voruntersuchungen).

Bei der Entnahme der Herzen wurde so effektiv eine Keimverunreinigung der angefertigten Kulturen vermieden, da anschließend keine einzige Kulturtrübung mehr auftrat. Die Temperatur des Brutschrankes wurde aus der Literatur entnommen, um durch Angleichung an die Tierhaltungstemperatur möglichst optimale Kulturbedingungen zu erhalten.

4.1.4 Implantation

Aufgrund der individuellen Unterschiede der einzelnen Tiere, der jeweiligen Länge und Beschaffenheit und der angewandten Technik entstanden Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Implantate (siehe „2 Material und Methoden“). Daraus ergaben sich die Abweichungen in der Anzahl der injizierten Herzzellen pro Gewebeschnitt und die Gestalt der einzelnen Zellgruppen. Dies kam vor allem nach einem Tag zum Tragen.

Nach 15 und nach 30 Tagen veränderte das Wachstumsverhalten des Stumpfes die Verteilung der einzelnen Zellen zusätzlich (17, 29, 33). Zudem waren die Ergebnisse in dieser Arbeit von qualitativer Natur. Die Mengenverteilung der Zellen wurde hier wenig berücksichtigt.

4.1.5 Verwendung der Gewebeschnitte

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden nur solche Gewebeschnitte verwendet, die keine Auffaltungen vor und nach der Behandlung mit den Lösungen und Antikörpermedien aufwiesen. Damit wurde Artefakten vorgebeugt, die durch diese Gewebekonglomerate entstehen könnten.

Alle Objektträger, einschließlich der zur Kontrolle mitgeführten, wurden entsprechend des beschriebenen und je nach Versuch typischen Behandlungsablaufes identisch behandelt. Sie wurden unter Lichtschutz, mit gleicher Waschlösung und in gleicher Arbeitsschrittfolge verwendet.

Dennoch ist nicht auszuschließen, dass es auch nicht offensichtliche Auffaltungen und durch eventuelle Verunreinigungen falsch positive Fluoreszenzen gegeben hat. Deshalb wurden sämtliche Versuchsreihen, exklusive der Vorversuche, mindestens dreimal durchgeführt. Die einheitliche Belichtungszeit half zusätzlich stark fluoreszierende Artefakte zu identifizieren, den betroffenen Gewebeschnitt zu verwerfen oder diese mittels Computernachbearbeitung zu korrigieren.

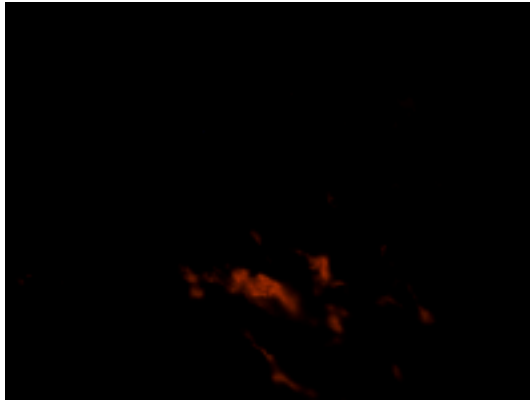


Abb. 116: Rotfilter, NS, verunreinigter Gewebeschnitt einer mitgeführten Negativkontrolle, ohne DiI-Markierung und ohne Antikörper- und Konjugatbehandlung, keine echte Rotfluoreszenz

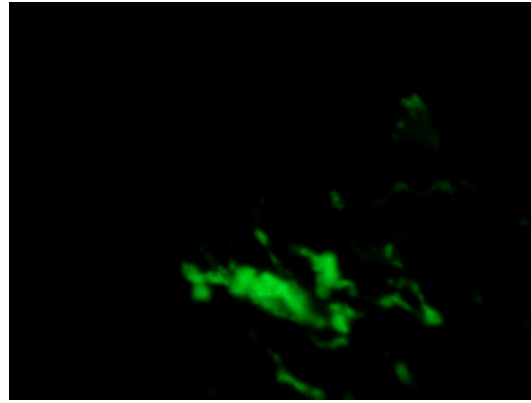


Abb. 117: Grünfilter, NS, gleicher Bildausschnitt wie Abb. 116, hier tritt der Effekt noch deutlicher zutage, es ist hier kein Antikörper oder Konjugat eingesetzt worden, solche Aufnahmen wurden nicht zur Auswertung herangezogen

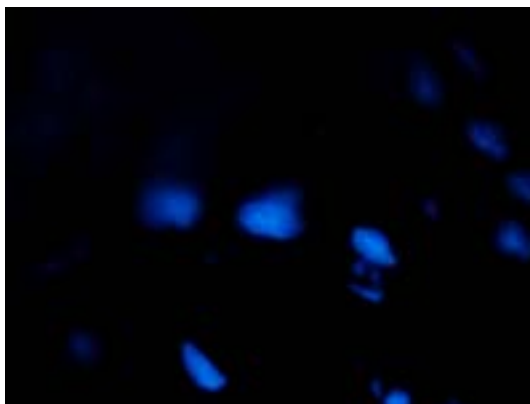


Abb. 118: Blaufilter, NS, gleicher Bildausschnitt wie die Abb. 116, Kernfärbung, man sieht die durch Auf-faltungen entstandenen unscharfen Bereiche

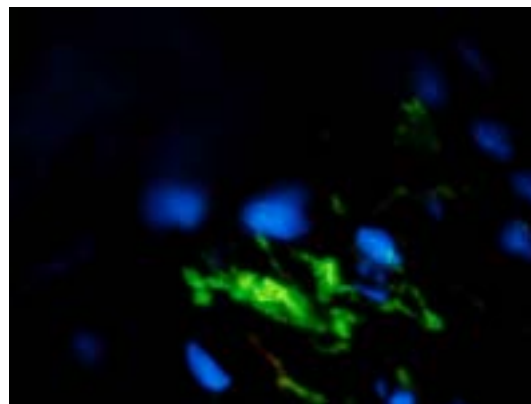


Abb. 119: Kombination aus Abb. 116, 117 und 118, man sieht die zwischen den Zellkernen liegende Verunreinigung, Rot- und Grünfluoreszenz sind identisch platziert

Daneben können bei der angewandten immunhistochemischen Methode Fluoreszenzunterschiede durch minimale Unterschiede in der jeweiligen Antikörper- und Konjugatlösungskonzentration entstanden sein. Diese waren jedoch ausserordentlich klein. Durch die lange Inkubationszeit der Primärantikörperlösung (über Nacht) und die exakte Einhaltung der Sekundär-Antikörperreaktion (2 Stunden +/-10 min) wurden annähernd gleiche Bedingungen für alle verwendeten Gewebeschnitte geschaffen.

Die Temperaturbedingungen wurden wie beschrieben konstant gehalten und unterlagen so nur den technisch bedingten Schwankungen der Kühlanlage usw.

4.1.6 Diskussion der Dokumentation und Nachbearbeitung

Neben dem Entfernen und nicht berücksichtigen ungeeigneter Gewebeschnitte, wurden die Aufnahmen mittels der Kamerazoomfunktion und dem Computer in eine sinnvolle Vergrößerung gebracht, um möglichst die wichtigen Details zu zeigen. Deshalb sind die angefertigten Aufnahmen zusätzlich zu den verwendeten Objektiven (10er, 20er und 40er) unterschiedlich vergrößert dargestellt.

Je nach Aufnahme wurden augenscheinliche Artefakte und Schmutzpartikel mittels Fotobearbeitung ausschließlich durch Schwärzen entfernt. Nur bei den Zellkernaufnahmen sind teilweise der Kontrast oder die Schärfe mit *CorelDraw*® verändert worden, um die einzelnen Kerne besser abgrenzen zu können. Die erhaltenen Fluoreszenzstärken durch die jeweiligen Konjugate wurden so wie gesehen photographiert und dokumentiert.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Transplantierte Zellen zeigen keine ausgeprägte Apoptosebereitschaft

Die gemachten Untersuchungen zu den gewählten Zeitpunkten stellen nur Momentaufnahmen dar. Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine apoptotischen Zellen nach ihrer Implantation in Hinterbeine oder Stümpfe gefunden wurden, schließt somit nicht aus, dass es apoptotische Vorgänge gegeben hat. Es ist sogar davon auszugehen, dass einige Implantate, die sich in den Regeneraten befanden, für die Gliedmaßenbildung ebenfalls den programmierten Zelltod durchliefen.

Außerdem wurden vor allem nach einem Tag, bei den immunhistochemischen Untersuchungen mittels der DiI-Markierung, Zellmembran- und bei der Kernfärbung Kernfragmente gefunden. Die betroffenen Zellen könnten neben der Nekrose ebenfalls durch Apoptose abgebaut worden sein, nachdem sie durch die Injektion geschädigt wurden, sofern die Schädigung nicht nach der Einbettung oder der Präparation aufgetreten sind. Die Nekrosen wurden zudem mit dem TUNEL-Assay nicht erfasst.

Die wichtige Aussage ist aber, dass zu allen Untersuchungszeitpunkten in Stümpfen und kompletten Hinterbeinen, also nach einem, 15 und nach 30 Tagen nach Implantation, keine apoptotischen, somit ausschliesslich vitale Zellen nachgewiesen wurden. Dies spricht gegen ein massives Absterben der transplantierten Molchcardiomyozyten.

4.2.2 Transplantierte Cardiomyozyten nehmen im Hinterbeinstumpf Charakteristika von Blastemzellen an

Nach der Dedifferenzierung bzw. zu dem untersuchten Zeitpunkt 5+1 Tag ist die Umgebung der Implantate innerhalb des Hinterbeinregenerates von einer blastemzelltypischen fibronectin- und tenascinhaltigen ECM geprägt. Dieser Umstand erhärtet die Ergebnisse für Vimentin und 22/18, wonach die Implantate dort selbst diese blastemzelltypischen Marker aufwiesen. Die in regenerierende Hinterbeinstümpfe eingebrachten ehemaligen Cardiomyozyten exprimierten bzw. besaßen zudem zu diesem Zeitpunkt bereits die beschriebene aktivierte Fokale-Adhäsions-Kinase, was das intensive Vorhandensein von integrinvermittelten Zell-ECM-Kontakten zeigte. Das ermöglichte die Einleitung sowie Aufrechterhaltung der Informationskaskaden, die unter anderem zur Proliferation, Migration und zum Zellwachstum nötig sind.

Wie bei den Blastemzellen einer normalen Wachstumsfront war Vimentin und 22/18 auf die Implantate verteilt. Vimentin trat auch hier während eines späten Blastemstadiums bei einigen Zellen auf. Dies lässt den Schluß zu, dass die Implantate um den Zeitpunkt 5+15 Tage spätestens anfangen sich zu redifferenzieren. Wann dieser Prozess genau begann, kann somit nicht auf den Tag genau festgesetzt werden. Andererseits sind diese Implantate auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Abschluß der Blastemzellphase, da nicht alle Zellen mit Vimentin nach 15 Tagen noch als Blastemzellen erkennbar waren.

Wie lange die Blastemzellphase also genau dauert, hängt von verschiedenen Faktoren ab, die auch den Zeitraum bei den endogenen Blastemzellen bestimmen. Hinzu kommt auch, dass nicht genau festzulegen ist wie nah oder an welcher Stelle die Implantate in das Blastem injiziert wurden. Denn trotz genauester Arbeit gab es individuelle Unterschiede zwischen den Molchen hinsichtlich Amputationsstelle, Stumpfdicke, Blastemgröße und Stärke der begleitenden Wundreaktion. Zudem sind aufgrund der technischen Ausführung, unterschiedliche Mengen an Molchcardiomyozyten injiziert worden.

Der Rückgang von Fibronectin und Tenascin 15 Tage nach der Implantation in ein Regenerat verdeutlicht den Abschluß der Blastemzellphase der Implantate. Sie benötigten also weniger oder gar keine Kontakte zu dem Fibronectingerüst um Beweglichkeit und Überlebensfähigkeit zu sichern. Das Fortbestehen der *FAK*-Aktivierungen deutet auf einen Wechsel der Integrinklasse in der integrinvermittelten Signaltransduktion und somit dem Beginn der Redifferenzierung hin.

Die Aussagekraft der *FAK*-Detektion ist auf die Feststellung der initialen Aktivierung der *Fokalen-Adhäsions-Kinase* beschränkt, da die weiteren Phosphorylierungsschritte nicht untersucht wurden. Dass diese aber durchlaufen wurden, ist trotzdem anzunehmen, da Zellen gefunden wurden, die sich eindeutig in der Mitosephase befanden. Dies resultiert unter anderem aus der *FAK*-Phosphorylierung an dem Tyrosinrest Tyr-925 mit der anschließenden *Ras* - Aktivierung, worauf hin der *MAP – Kinase- Signalweg* durchlaufen wird. Am Ende kommt es zur Freisetzung der Transkriptionsfaktoren für die Mitose (15).

Zudem folgt die *FAK*-Aktivierung durch die Signalübermittlung von den an die fibronectinhaltige ECM gebundenen Integrinen, was in einer weiteren Integrinrekrutierung resultiert (42). Dies verstärkt die Outside-In-Signaltransduktion mit den beschriebenen Phosphorylierungsschritten wiederum (42).

4.2.3 Das Wiederauftreten von Merosin deutet auf Redifferenzierung der Implantate hin

Anhand der Resultate aus den durchgeführten Versuchsreihen begannen die Implantate in den Hinterbeinstümpfen am Ende der Blastemzellphase mit der Redifferenzierung. Hier wurde allerdings nur ein Marker, der für quergestreifte Muskulatur typisch ist, das Laminin-alpha-2 (Merosin) untersucht. Marker für andere Gewebetypen wie Bindegewebe oder Knochen wurden nicht berücksichtigt. Deshalb konnte nur festgestellt werden, ob die Implantate beginnen sich überhaupt zu redifferenzieren. Es wurden dabei nur die Zellen erfasst, die zu quergestreiften Muskelzellen redifferenzierten. Die merosinnegativen Implantate wiesen nach 30 Tagen allerdings keine Blastemzellmarker mehr auf.

Inwieweit und zu welchem Zeitpunkt das Ursprungsgewebe den Redifferenzierungsweg der Implantate beeinflusst, ist für die Implantation von Herzzellen des *Notophthalmus viridescens* in einen sich regenerierenden Stumpf nicht geklärt. Fest steht aber, dass die unterschiedlichen Gewebe dieses Molches unterschiedliche Regenerierungswege gehen (3). Klar ist weiterhin, dass bereits gebildete Blastemzellen sich in Zelltypen ihres Ursprungsgewebes redifferenzieren (3). Ob dies auch für Zellen gilt, die transplantiert wurden und im Zielgewebe erst dort dedifferenzieren und in das Blastemzellstadium eintreten, ist von keinem der zitierten Autoren erörtert worden. In dieser Arbeit wurden Zellen beobachtet, die nach 30 Tagen in der Phase der Redifferenzierung kein Laminin-alpha-2 in ihrer Umgebung aufwiesen, das ja für quergestreifte Muskelzellen,

wie Herz- und Skelettmuskel, typisch wäre. Es könnte sein, dass diese ähnlich wie die Implantate in ungeschädigten Hinterbeinen einfach nach der Dedifferenzierung inaktiv verharren. Gegen eine generelle G0-Phase spricht allerdings die Tatsache, dass keine Apoptosen mittels TUNEL-Assay bei den Implantaten nachgewiesen wurden und diese Zellen auch augenscheinlich weder nekrotisch fragmentiert (ab 15 Tagen) noch blastenartig abgerundet waren. Es wurden, auch keine Implantate nach 30 Tagen gefunden, die 22/18-, Vimentin- oder massiv Fibronectin - positiv waren, was für ein Fortbestehen der Blastemphase dieser Implantate weit über den 15 Tag nach Implantation hinaus sprechen würde. Dieses schließt aber auch nicht aus, dass diese andere ausdifferenzierte Zelltypen bilden können.

Die in ungeschädigte Hinterbeine eingebrachten Implantate wiesen zu den untersuchten Zeitpunkten einen Tag, 15 Tage und 30 Tage nach Injektion keine Blastemzellmarker auf und die ECM war nicht wie die der Regenerat-Implantate strukturiert. Sie blieben in einer Form, die aus der Injektion resultieren könnte, liegen und zeigten nach 15 Tagen keine diffuse Verteilung, wie die Implantate im regenerierenden Hinterbein.

Da allerdings nur die angesprochenen Zeitpunkte untersucht wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Implantate im kompletten Hinterbein, zwischen den Untersuchungszeitpunkten, zu einem Teil ebenfalls in ein Blastemstadium eintraten oder sich in Hinterbeingewebe direkt transdifferenzierten. Bei Augenlinsenzellen des *N.v.* ist dies zu beobachten, sie überspringen das Blastemzellstadium (3). Dagegen spricht allerdings, dass die ECM nicht dem Aufbau in einem Blastemgebiet entsprach wie es bei den anderen Implantaten in Stümpfen der Fall war. Zudem benötigen Zellen zur Regeneration, inklusive der Dedifferenzierung, Blastemorganisation und anschließender Redifferenzierung oder der Transdifferenzierung einige Zeit (3, 13, 19). Das gleichzeitige Auftreten von Transdifferenzierung und Blastemregeneration ist nicht publiziert worden (3).

5 Zusammenfassung

Der *Notophthalmus viridescens* hat mit seiner Fähigkeit, Blastemzellen zu bilden, ein vielseitiges Instrument zur Verfügung. Es ermöglicht ihm, verlorene Strukturen im großen Umfang neu zu bilden. Viele adulte Zellen dieses Molches können sich dedifferenzieren und auf diese Weise in den Wachstumsprozeß eines sich neu bildenden Organs oder eines neu wachsenden Hinterbeins einfügen, um später zu neuen Zelltypen zu redifferenzieren.

Auch aus dem Herzmuskel des *Notophthalmus viridescens* entnommene Zellen sind in der Lage diesen Weg zu gehen. Sie entwickeln die gleichen Überlebensstrategien, um zum einem der Apoptose zu entgehen und zum anderen ihre angestammte Umgebung zu verlassen um sich zu neuen Strukturen wie Skelettmyotuben zusammen zu lagern. Die Fokale-Adhäsions-Kinase (FAK) scheint bei diesem Prozeß eine wichtige Rolle zu spielen. Dadurch waren die Implantate in der Lage neue Kontakte zu der ECM herzustellen und aus den über Integrine und später auch über das Laminin-alpha-2 geformten, mit der FAK entstandenen, Rezeptoren zu schaffen. Damit wurde es diesen ermöglicht, in den Zellzyklus einzutreten, zu migrieren, zu proliferieren und später zu redifferenzieren.

Die Extrazellulärmatrix war bereits nach wenigen Stunden aus einem Fibronectin – Gerüst aufgebaut, an dem die dedifferenzierten ehemaligen Herzzellen, im Zusammenspiel mit dem auftretenden molchspezifischen Tenascin Kontakte herstellten, Informationen ablesen und entlangmigrieren konnten.

Zu diesem Zeitpunkt wiesen alle beobachteten Implantate in den sich regenerierenden Hinterbeinstümpfen den Blastemzellmarker 22/18 auf. Vimentin, das ebenfalls für Blastemzellen typisch ist und auch in Blasten zu finden ist, die im Begriff sind, sich zu adulten Zelltypen zu redifferenzieren, wurde bei einigen Implantaten auch noch nach 15 Tagen nachgewiesen. Somit befanden sich die meisten injizierten Zellen in dem Zeitraum einen Tag bis 15 Tage nach Transplantation im Blastemzellstadium.

Während dieser Zeit verloren alle eingebrachten ehemaligen Molchcardiomyozyten ihre für quergestreifte Muskulatur typische Laminin-alpha-2 Verteilung. Die bei adulten Herz- und Skelettmuskelzellen auf die angrenzende Zellmembran beschränkte Laminin-alpha-2-Verteilung wurde durch eine schleierartige bis kaum nachweisbare ersetzt. In dieser Zeit, einen Tag bis 15 Tage nach Injektion, befanden sich einige der transplantierten Zellen in der Mitose. Sie waren somit in der Proliferationsphase wie es für Blastemzellen ebenfalls typisch ist.

Das bis über den 30. Tag hinaus bestehende Vorkommen der aktivierten Fokalen-Adhäsions-Kinase (p-Tyr-397) zeigt die ebenfalls für die Redifferenzierung und Gewebereorganisation wichtige Funktion dieser nicht membrangebundenen Tyrosinkinase.

Das deutet, mit dem gleichzeitigen Verschwinden der Blastemzellmarker und der blastemtypischen Fibronectin-Tenascin-geprägten ECM, auf einen Wechsel des Integrintyps hin. Hinzu kommt das bei einigen Implantaten wieder aufgetretene Laminin-alpha-2 in für quergestreifte Muskulatur spezifischer Anordnung.

Das Blastemgebiet der Stümpfe selbst scheint der Auslöser dafür zu sein, dass die implantierten Zellen ihre differenzierten Eigenschaften verlieren. In der Gegenprobe, in der Molchcardiomyozyten in ungeschädigte Hinterbeine ohne Blastemgebiet transplantiert wurden, zeigte sich ein völlig anderes Bild: Keine der Implantatzellen verlor ihre anliegende Laminin-alpha-2-haltige ECM. Sie dedifferenzierten nicht und exprimierten auch keine Blastemzellmarker wie 22/18 oder Vimentin. Die FAK-Detektion zeigte ein wesentlich geringeres Auftreten der aktivierten Fokalen-Adhäsions-Kinase. Diese Zellen hatten deshalb deutlich weniger solcher Zell-ECM-Kontakte, um in den Zellzyklus neu einzutreten, zu migrieren, zu proliferieren oder neue Strukturen zu bilden. Trotz fehlender Dedifferenzierung überlebten diese Zellen und konnten auch 30 Tage nach der Implantation in den ungeschädigten Hinterbeinen nachgewiesen werden.

Die Immunhistochemischen Untersuchungen erwiesen sich als sehr aussagekräftig, da die kompletten Gewebestrukturen zusammen untersucht werden konnten und die Vorkommen der einzelnen Proteine bzw. charakteristischen Antigene miteinander direkt verglichen wurden. Die Implantate lagen dabei unmittelbar neben den Blastemzellen der einzelnen Stümpfe, wodurch vor allem die Blastemzellmarker in ihrer Expressionsstärke, unmittelbar in ihrem Vorkommen bei Implantaten und endogenen Blastemzellen, miteinander verglichen werden konnten.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Bennett J. S.: Integrins and Signal Transduction. In: Cell Adhesion Molecules and Matrix Proteins: Role in Health and Diseases, S. A. Mousa, Springer-Verlag Berlin, 1998, S. 29 - 40
- 2) Benson L. J., Gu Y., Yakovleva T., Tong K., Barrows C., Strack C. L., Cook R. G., Mizzen C. A., Annunziato A. T.: Modifications of H3 and H4 during chromatin replication, nucleosome assembly, and histone exchange. [http:// www.jbc.org](http://www.jbc.org), 2006
- 3) Brockes J. P., Kumar A.: Plasticity and reprogramming of differentiated cell in amphibian regeneration. In: On Growth, Form and Computers. Elsevier, 2003, S. 92-106
- 4) Brockes J. P., Produktbeschreibung: 22/18. Ludwig institute for Cancer Resarch, Middlesex Hospital, University College Branch, 2003
- 5) Brudzynski K., Carlone R.: Satge-dependent modulation of limb regeneration by caffeic acid phenethyl ester (CAPE)-immunocytochemical evidence of a CAPE-evoked delay in mesenchyme formation and limb regeneration. *Journal of Experimental Zoology* (2004) May 1;301(5), S. 389-400
- 6) Chiquet-Ehrismann R., Tucker R. P.: Connektive tissues: signalling by tenascins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004), S. 1085-1089
- 7) Darribere T., Schwarzbauer J. E.: Fibronectin matrix composition and organisation can regulate cell migration during amphibian development. *Mechanisms of Development* (2000) 92, Elsevier, S. 239-250
- 8) Donaldson D. J., Mahan J.T., Yang H., Crossin K. L.: Tenascin localization in skin wounds of the adult newt *Notophthalmus viridescens*. *Anatomical record* Aug; 230(4) (1991), S. 451-459
- 9) Eastern Newt, *Notophthalmus viridescens*. Northern Prairie Wildlife Resarch Center, [http:// www.npwrc.usgs.gov/narcam/idguide/rsnewt.htm](http://www.npwrc.usgs.gov/narcam/idguide/rsnewt.htm), 2005
- 10) Fekete D. M., Brockes J. P: A monoclonal antibody detects a difference in the cellular composition of developing and regenerating limbs of newts. *Development*. (1987) Apr;99(4), S. 589-602
- 11) Ferretti P., Brockes J. P.: Culture of newt cells from different tissues and their expression of a regeneration-associated antigen. *J Exp Zool*. (1988) Jul;274(1), S. 77-91

- 12) Ferretti P., Brockes J. P.: The monoclonal antibody 22/18 recognizes a conformational change in an intermediate filament of the newt, *Notophthalmus viridescens*, during limb regeneration. *Cell Tissue Res.* (1990) Mar;259(3), S. 483-493
- 13) Ferretti P., Corcoran J. P.: Myogenetic cells in regeneration. In: *Journal of Cell Science*, 112(Pt 9) (1999), S. 1385-1394
- 14) Fürst D. O., Osburn M., Weber K.: Myogenesis in the Mouse Embryo: Differential Onset of Expression of Myogenetic Proteins and the Involvement of Titin in Myofibril Assembly. *The Journal of Cell Biology* (1989) Vol. 109, The Rockefeller University Press, S. 517-527
- 15) Gomperts B. D., Kramer I. M., Tatham P. E. R.: *Signal Transduktion*, Elsevier, Academic Press, Amsterdam, 2003, S. 325-331
- 16) Goussia A. C., Ioachim E. E., Peschos D., Assimakopoulos D. A., Skevas A., Agnantis N. J.: Expression of the extracellular matrix protein tenascin in laryngeal epithelial lesions: correlation with fibronectin, CD44, cathepsin D and proliferation indices. *Virchows Arch* (2000), Springer-Verlag, S. 579-584
- 17) Gulati A. K., Zaleski A. A., Reddi A. H.: An Immunofluorescent Study of the Distribution of Fibronectin and Laminin during Limb Regeneration in the Adult Newt. In: *Developmental Biology* 96, 1983, 355-365
- 18) Irvin B. C., Tassava R. A.: Effects of peripheral nerve implants on the regeneration of partially and fully innervated urodele forelimbs. *Wound reg* 1998;6, The Wound Healing Society (1998), S. 382-387
- 19) Iten L. E., Bryant S. V.: Forelimb Regeneration from Different Levels of Amputation in the Newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, Rate, and Stages. *Wilhelm Roux' Archiv* 173, Springer-Verlag, 1973, S. 263-282
- 20) Johansson S., Svineng G., Wennerberg K., Armulik A., Lohikangas L.: Fibronectin-integrin interactions. *Frontiers in Bioscience* 2 (1997), S. 126-146
- 21) Kintner C. R., Brockes J. P., *J Embryol Exp Morphol.* (1985) Oct;89, S. 37-55
- 22) Klatt K. P., Yang E. V., Tassava R. A.: Monoclonal antibody MT2 identifies an extracellular matrix glycoprotein that is co-localized with tenascin during adult newt limb regeneration. In: *Differentiation, Ontogeny, Neoplasia and Differentiation Therapy*, Springer-Verlag (1992), S. 133-140
- 23) Klein M.: Echte Salamander. [http:// www. das-tierlexikon.de/echte_salamander.htm](http://www.das-tierlexikon.de/echte_salamander.htm), 2000

-
- 24) Kreis T., Vale R. (eds.): Laminin. In: Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins, Oxford University Press, 1993, S. 66-68
 - 25) Kunihiro S., Ryuta N., Shuichiro I., Miyuki H., Toshikazu K. Masahiro Y.: Marked reduction of focal adhesion kinase, serum response factor and myocyte enhancer factor 2C, but increase in RhoA and myostatin in the hindlimb of mouse muscles. , Springer-Verlag, [http:// www.springerlink.com/media/](http://www.springerlink.com/media/), 2004
 - 26) Lo D. C., Allen F., Brockes J. P.: Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, Developmental Biology, S. 7230-7234
 - 27) Löffler, Petrides: Biochemie & Pathobiochemie. 7. Auflage, Springer-Verlag, 1998, S. 149-152
 - 28) Lohse: Molekularbiologie. Tumorzentrum München, [http:// www.krebsinfo.de](http://www.krebsinfo.de), 1989
 - 29) Maier C. E., Miller R. H.: In Vitro and In Vivo Characterisation of Blastemal Cells From Regenerating Newt Limbs. Journal of Experimental Zoology (1992) 262, S. 180-192
 - 30) MAP-Kinase-Weg. <http://www.de.wikipedia.org/wiki/MAP-Kinase-Weg>, 2006
 - 31) McGann C. J., Odelberg S. J., Keating M. T.: Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. [http:// www.pnas.org](http://www.pnas.org), cell biology, 2001
 - 32) Midwood K. S., Williams L. V., Schwarzbauer J. E.: Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2004) 36, S. 1031-1037
 - 33) Nace J. D., Tassava R. A.: Examination of Fibronectin Distribution and its Sources in the Regenerating Newt Limb by Immunocytochemistry and In Situ Hybridization. Developmental Dynamics (1995) 202, S. 153-164
 - 34) Notophthalmus viridescens dorsalis. AG Urodela, [http:// www. ag-urodela.de/mpkt_8_Haltungsrichtlinien.htm](http://www.ag-urodela.de/mpkt_8_Haltungsrichtlinien.htm)
 - 35) Notophthalmus viridescens (Grünlicher Wassermolch), [http:// www.schlangenland.de/notophthalmus.htm](http://www.schlangenland.de/notophthalmus.htm), 2005
 - 36) Onda H., Goldhamer D. J., Tassava R. A.: An extracellular matrix molecule of newt and axolotl regenerating limb blastemas and embryonic limb buds: immunological relationship of MT1 antigen with tenascin. In: Development 108. The Company of Biologists Limited 1990 (1990), S. 657-668

-
- 37) Onda H., Poulin M. L., Tassava R. A. Chiu I. M.: Characterization of newt tenascin cDNA and localisation of tenascin mRNA during newt limb regeneration by in situ hybridization. *Developmental biology* New York Nov; 148(1) (1991), S. 219-232
 - 38) Osses N., Brandan E.: ECM is required for skeletal muscle differentiation independently of muscle regulatory factor expression. [http:// www.ajpccell.org](http://www.ajpccell.org), 2002
 - 39) Parsons J. T., Martin K. H., Slack J. K., Taylor J. M., Weed S. A.: Focal adhesion kinase: a regulator of focal adhesion dynamics and cell movement. *Oncogene* (2000) 19, Macmillan Publishers Ltd., S. 5606-5613
 - 40) Produktbeschreibung: Purified mouse anti-vimentin monoclonal antibody. PD PharMingen Technical Data Sheet, Transduction Laboratories PharMingen, 2004
 - 41) Produktbeschreibung von: Monoclonal anti-phospho-histone H3 (pSer28) clone HTA28, Sigma-Aldrich, Inc., <http://www.sigma-aldrich.com>, 2004
 - 42) Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K., Firtel R. A., Ginsberg M. H., Borisy G., Parsons J. T., Horwitz A. R.: *Science* (2003) Vol. 302, S. 1704-1709
 - 43) Rippe K.: Die Sprache der Histon-Proteine. [http:// www.uni-heidelberg.de](http://www.uni-heidelberg.de), 2006
 - 44) Schiebler T. H., Schmidt W.: *Anatomie*. 8. Aufl. , Springer-Verlag, 1999, S. 29-32
 - 45) Spector D. L., Goldman R. D., Leinwand L. A.: *Culture and Biochemical Analysis of Cells*. In: *Cells a laboratory manual*, 1998, Cold Spring Harbur Laboratory Press, S. 15.1-15.7
 - 46) Tassava R. A., Produktbeschreibung: MT1. Department of Molecular Genetics, Ohio State University, 2004
 - 47) Walder S., Zhang F., Ferretti P.: Up-regulation of neural stem cell markers suggests the occurrence of dedifferentiation in regenerating spinal cord. *Dev Genes Evol.* (2003) Dec;213, S. 625-630
 - 48) Wennerberg K., Armulik A., Sakai T., Karlsson M., Fässler R., Schaefer E. M., Mosher D. F., Johansson S.: The cytoplasmic tyrosines of integrin subunit $\beta 1$ are involved in fokal adhesion kinase activation. *Molecular and Cellular Biology* (2000) Vol. 20, American Society for Microbiology, S. 5758-5765

7 Thesen

1. Molchcardiomyozyten des *Notophthalmus viridescens* sind grundsätzlich in der Lage, nach ihrer Implantation in ein Hinterbein eines anderen *Notophthalmus viridescens*, zu überleben.
2. Die Umgebung des Blastemgebietes eines sich regenerierenden Hinterbeinstumpfes des *Notophthalmus viridescens* veranlasst die injizierten Molchcardiomyozyten selbst innerhalb von 24 Stunden zu de-differenzieren.
3. Die de-differenzierten, in ein Blastemgebiet eingebrachten, Implantate weisen nach einem Tag die Blastemzellmarker Vimentin und 22/18 auf.
4. Die umgebene Extrazellulärmatrix (ECM) ist wie bei normalen Blastemzellen des *Notophthalmus viridescens* im Bereich der in ein Stumpfgebiet injizierten Molchcardiomyozyten von einem Fibronektingerüst und reichlich Tenascin (molchspezifisches) umgeben.
5. Durch die mit Fibronectin und Tenascin geprägte ECM haben die implantierten Herzzellen des *Notophthalmus viridescens* die Möglichkeit, wie normale Blastemzellen zu überleben, zu migrieren, zu proliferieren und neue Ordnungen in der sich regenerierenden Gewebestruktur zu bilden.
6. Die Fokale-Adhäsions-Kinase ist bei den Implantaten, in sich regenerierenden Hinterbeinstümpfen des *Notophthalmus viridescens*, quantitativ aktiviert und steuert die Rekrutierung von durch Integrin vermittelten Zell-ECM Kontakten, die dadurch beginnende Signaltransduktion für den Wiedereintritt dieser Zellen in den Zellzyklus und die weitere Aktivierung von Signalkaskaden.
7. Die Implantate beginnen unter dem Einfluss des Empfängerblastems des *Notophthalmus viridescens* zu proliferieren.
8. Die Fokale-Adhäsions-Kinase reguliert in dieser Formation durch das zusätzliche Einwirken des für quergestreifte Muskulatur spezifische Laminin-alpha-2, bei den in ein Blastemgebiet injizierten ehemaligen Herzmuskelzellen, die Reorganisation zu Muskelfasern.
9. Das Auftreten von Laminin-alpha-2 deutet auf einen Wechsel der Integrinklasse, bei den an der Regenerierung beteiligten Implantate hin.

10. Vimentin und 22/18 sind in ihrer Beurteilung für frühe und mittlere Blastemzellen in ihrer Aussagekraft für das jeweilige Blastemzellstadium ähnlich, da die Verteilungen dieser Antigene fast deckungsgleich bei Blastemzellen des *N. v.* sind.
11. Bei den späten Blastemzellen ist nur noch Vimentin im Bereich der Blasten und auch bei einigen Implantaten in Hinterbeinregeneraten zu finden.
12. Die zur Kontrolle des Blastem-Einflusses auf Implantate, in komplette Hinterbeine injizierte Molhcardiomyozyten de-differenzieren nicht und bleiben in ihrer Position, in die sie durch die Injektion gebracht wurden liegen ohne sich durch Migration und Proliferation auszubreiten.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Matthias Heister
Wohnort: Rosental 3
06217 Merseburg
Geburtstag und – Ort: 01.10.1978 in Eisenach (Thüringen)
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Mutter: Diplom - Historikerin Elke Heister
Vater: Diplom - Historiker Peter Heister

Schulbildung

01.09.1985-27.01.1995 Grundschule und anschließende Realschule (Mühlhausen (Th.), Mertendorf (SA), Weißenfels (SA))
01.09.1995-16.07.1997 Schulische Ausbildung zum staatlich geprüften Wirtschaftsassistenten/ Informatik (Berufsbildende Schulen Weißenfels), mit bestandener Prüfung
01.09.1997-16.02.2000 Abitur, Schule des zweiten Bildungsweges (Weißenfels)

Wehrdienst

02.07.2000-30.04.2001 2. Fallschirmjägerbataillon 373, Lausitzkaserne Doberlug-Kirchhain (BB)

Medizinische Ausbildung

seit 01.10.2001 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität
Halle/Wittenberg
16.09.2003 Ärztliche Vorprüfung (Physikum), bestanden

Halle, 11.04.2006

Matthias Heister

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Matthias Heister

Erklärung

Hiermit erkläre ich, nur einen Antrag für diese Arbeit auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht zu haben. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Matthias Heister

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Dr. Braun für seine Begeisterung für meine Arbeit und seine unkomplizierte und schnelle Unterstützung sowie seine konstruktive Kritik, die er mir trotz seines Umzuges nach Bad Nauheim zukommen ließ.

Ich bin meinem Betreuer Dr. Laube sehr dankbar für die hervorragende Einweisung in die Laborarbeit, Tierhaltung und Benutzung der Technik. Ich danke ihm aber vor allem für sein ständig offenes Ohr, seinem Ansporn mir gegenüber und die langen Fachgespräche, die mich immer auf Kurs in dieser Arbeit hielten.

Ich danke meiner Frau Kathrin, die mich mit Liebe und viel Kaffee durch das Studium und die Computer-Nächte für diese Arbeit gebracht hat, sowie für Ihre Geduld und Verständnis für einen verwirrten Doktoranden.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern für ihre kompromißlose Unterstützung mit Finanzen und Büchern, ohne die ich aufgeschmissen gewesen wäre. Ohne Sie wäre diese Arbeit ebenfalls nie zustande gekommen.
