

Aus dem Institut für physiologische Chemie  
Hollystraße 1, 06114 Halle  
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(komm. Direktor Prof. Dr. rer. nat. T. Hollemann)



**Das Verhalten transplanteder Herzmuskelzellen im regenerierenden Hinterbein von  
Notophthalmus viridescens – Transdifferenzierung im Rahmen einer Regeneration**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Christian Günther Fritz Scholz  
geboren am 7.11.1981 in Karl-Marx-Stadt

Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Braun

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. B. Fischer  
2. Prof. Dr. T. Braun (Bad Nauheim)

Verteidigungsdatum: 05.05.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014258**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014258>]

## **Referat**

Grundlage dieser Arbeit war die Regenerationsfähigkeit des grünlichen Wassermolches, *Notophthalmus viridescens*. Es sollte geklärt werden ob während der Regeneration eine Transdifferenzierung stattfindet oder nicht. Zu diesem Zweck wurden Herzmuskelzellen in das regenerierende Hinterbein transplantiert und die Expression zellspezifischer Proteine durch die Immunhistochemie sichtbar gemacht. Der Beobachtungszeitraum der Herzmuskelzellen betrug bis zu 30 Tagen nach der Implantation. Dabei konnte gezeigt werden, daß die Herzmuskelzellen innerhalb von 24 Stunden ihre herzmuskelspezifischen Proteine verlieren. Danach exprimieren die transplantierten Zellen einen typischen Zellmarker für die so genannten Blastemzellen. Dies ist eine Zellpopulation die beim grünlichen Wassermolch bei durch Proliferation für den Ersatz der durch die Verletzung verloren gegangenen Zellen verantwortlich ist. Der Blastemzellcharakter bleibt ca. 7 Tage erhalten. Nach 30 Tagen lassen sich in den markierten transplantierten Herzmuskelzellen skelettmuskelspezifische Proteine nachweisen. Damit haben die transplantierten Herzmuskelzellen die Redifferenzierung zu Skelettmuskelzellen begonnen. Im ungeschädigten Hinterbein dagegen behalten die Herzmuskelzellen über 30 Tage ihre herzmuskelspezifischen Proteine und zeigen weder für Blastemzellen noch für Skelettmuskulatur spezifische Proteine. Beim grünlichen Wassermolch ist also während der Regeneration die Transdifferenzierung einer adulten Zelle zu einem anderen Zelltyp möglich.

Scholz, Christian: Das Verhalten von transplantierten Herzmuskelzellen im regenerierenden Hinterbein von *Notophthalmus viridescens* – Transdifferenzierung im Rahmen einer Regeneration

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 63 Seiten, 2007

## **Inhaltsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>2</b>
2.1. Zellzyklus	2
2.2. Zelldifferenzierung und Dedifferenzierung	2-3
2.2.1. Differenzierungsabhängige Expression typischer Skelettmuskelproteine	3-4
2.3. Regeneration beim Menschen	5
2.4. Regeneration beim Grünlichen Wassermolch	5
2.4.1. Regenerationsstadien des Vorderbeins	5-7
2.4.2. Regenerationsfähigkeit der verwendeten Kardiomyozyten	7-8
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>8-9</b>
3.1. Molchhaltung	9
3.2. Amputation des Hinterbeins	9-10
3.3. Immunhistochemie, Immunzytochemie	10
3.3.1. Funktionsweise und Aufbau von Antikörpern	10-11
3.3.2. Herstellung monoklonaler Antikörper	11-12
3.3.3. Ablauf der immunhistochemischen Untersuchungen	12
3.3.4. Ablauf der Immunzytochemie	13
3.3.5. Verwendete Antikörper	13-18
3.4. Verwendete Molchkardiomyozyten	18
3.4.1. Zellgewinnung	18-19
3.4.2. Zellkultur	19
3.4.3. Zellmarkierung mit DiI	19-20
3.4.4. Zelltransplantation	20-21
3.5. Geräte und Chemikalien	21
3.5.1. Geräte	21

3.5.2. Chemikalien	21-23
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>24</b>
4.1. Herzmuskelspezifische Antigene	24-25
4.2. Blastemzellspezifische Antigene	25-26
4.3. Skelettmuskelspezifische Antigene	26-29
4.4. Unspezifische Antigene	29-31
4.5. Kontrollgruppe der Zellmarkierung	31-32
<b>5. Diskussion</b>	<b>32</b>
5.1. Diskussion des Versuchsaufbaus	32-33
5.2. Diskussion der Ergebnisse	33-38
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>39</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>40-42</b>
<b>8. Anlagen</b>	<b>43-54</b>
<b>9. Thesen</b>	<b>55</b>

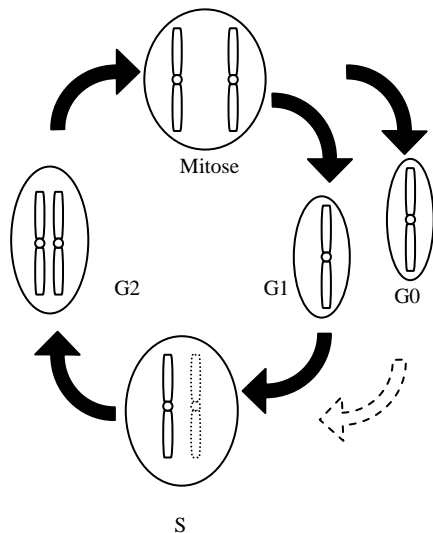


## 1. Einleitung

Die Medizin beschäftigt sich in vielen Bereichen mit Problemen, die mit einer Gewebeschädigung einhergehen. Solche Schäden an Geweben können makroskopisch sichtbar sein, wie es bei äußeren Verletzungen der Fall ist, oder aber auf zellulärer Ebene auftreten wie z.B. bei Zellschädigungen durch Infektionen. Ein wichtiger Aspekt dieser Schäden ist, dass sie nicht immer voll reversibel sind. Jede größere Gewebeschädigung geht mit einer Bildung von Narbengewebe einher, welches nicht mehr die funktionellen Eigenschaften des Ausgangsgewebes besitzt. Zum Beispiel wird das abgestorbene Gebiet des Herzens nach einem Infarkt nicht wieder anfangen zu kontrahieren. Dieses Problem der mangelhaften Regeneration besteht bei fast allen mehrzelligen Lebewesen. Allerdings gibt es auch Ausnahmen, wie z.B. den Grünlichen Wassermolch (*Notophthalmus viridescens*). Dieses Tier besitzt die Fähigkeit, Teile seines Körpers wie Beine, den Unterkiefer (35), die Augenlinse (9) oder Teile des Herzens (25) zu regenerieren, ohne dass zwischen dem regenerierten und dem natürlichen Gewebe ein funktioneller Unterschied zu erkennen ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die ausdifferenzierten Zellen dieses Molchs die Fähigkeit besitzen, sich im Zuge der Regeneration in komplett andersartige Zelltypen umzuwandeln, also zu transdifferenzieren. Die alternative Möglichkeit wäre, dass jede Zelle nur in der Lage ist, Zellen des eigenen Zelltyps nachzubilden. Wenn es gelänge, die der Regeneration zugrunde liegenden Abläufe vollständig zu erklären, würden sich völlig neue Möglichkeiten der Heilung durch Einleitung der körpereigenen Regeneration ergeben. Eine Dedifferenzierung von Muskelzellen der Maus unter dem Einfluss von Gewebeextrakten des Molchs wurde bereits von Ch. J. McGann et al. nachgewiesen (21). Zur Untersuchung der Frage, ob die Regeneration nur über eine Proliferation des erhaltenen Gewebes abläuft oder ob auch eine Transdifferenzierung stattfindet, wurden markierte Herzmuskelzellen in regenerierende Stümpfe von Molchbeinen verpflanzt und die Proteinausstattung der Herzmuskelzellen im Verlauf der Regeneration mit Methoden der Immunhistochemie verfolgt.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1. Zellzyklus



Der Zellzyklus, nach (34)

Der Zellzyklus stellt den Lebensablauf einer Zelle dar. Dieser lässt sich in zwei Abschnitte einteilen. In der Interphase wächst die Zelle und bereitet sich auf die nächste Zellteilung vor, während in der Mitosephase die eigentliche Zellteilung stattfindet. Die Interphase gliedert sich nochmals in drei einzelne Abschnitte. In der G<sub>1</sub>-Phase vollzieht sich die Proteinbiosynthese und die Durchführung der zellspezifischen Leistungen. Da diese Phase sich direkt an die Mitose anschließt, besitzt die Zelle nur einen einfachen Chromosomensatz. Das heißt, daß die Chromosomen in der Periode der Zellteilung in der Zentromerregion getrennt

wurden und nun nicht die typische Form eines X aufweisen. In der G<sub>1</sub>-Phase haben sie die Form eines I. In der darauf folgenden S-Phase wird die DNS synthetisiert, so daß danach jedes Chromosom aus zwei Chromatiden besteht. Diese werden bei einer Zellteilung in der Mitose wieder auf die beiden Tochterzellen verteilt. Die letzte Phase ist die G<sub>2</sub>-Phase. Sie dient der Überleitung in die Mitose. Zellen, die nicht proliferieren, gehen nach der Mitose in die G<sub>0</sub>-Phase über. In der G<sub>0</sub>-Phase vollzieht sich ähnlich wie in der G<sub>1</sub>-Phase die Proteinbiosynthese und die zellspezifischen Leistungen. Die Zellen von kaum regenerativen Geweben, wie zum Beispiel die Nervenzellen, befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase. Da diese Zellen nicht die S-Phase des Zellzyklus erreicht haben, besitzen sie nur einen einfachen Chromosomensatz. Sobald Zellen DNS synthetisieren stehen sie also kurz vor einer Mitose (34).

### 2.2. Zelldifferenzierung und Dedifferenzierung

Die Zelldifferenzierung ist die Entwicklung von einem unspezialisierten zu einem spezialisierten Zelltyp. Die unspezialisierten Zellen besitzen dabei eine relativ ähnliche Proteinausstattung und Genaktivität. Im Verlauf der Differenzierung werden verschiedene Gene durch Regulation der Transkription, der Translation oder durch die Vermehrung bzw.

die Repression von Genen aktiviert oder deaktiviert. Infolgedessen entstehen Zellen verschiedener Gewebe, die sich in ihrer Proteinausstattung, ihrer Morphologie und ihrer Teilungsfähigkeit stark unterscheiden. Durch diese Unterschiedlichkeit werden die spezifischen Leistungen unterschiedlicher Gewebe realisierbar. Die ausdifferenzierten Zellen haben je nach betrachteter Spezies auch unterschiedliche regenerative Fähigkeiten. Zum Beispiel menschliche Herzmuskelzellen besitzen nur sehr beschränkt die Möglichkeit sich zu teilen und beschädigtes Gewebe zu ersetzen (28). Die Skelettmuskulatur ist zur Regeneration fähig, allerdings nur aufgrund der in der Muskulatur ruhenden undifferenzierten Sattelitzellen (10). Die Herzmuskelzellen des Grünlichen Wassermolches sind jedoch teilungsfähig. Die Voraussetzung dafür bilden die so genannten Blastenzellen die in jedem geschädigten Gewebe des Molches entstehen. Hierbei handelt es sich um undifferenzierte, teilungsaktive Zellen. Der Molch benötigt also auch undifferenzierte Zellen zur Regeneration und kann nicht direkt aus dem ausdifferenzierten Gewebe neues Gewebe bilden. Von diesen Blastenzellen wird angenommen, dass sie entweder ähnlich wie die Sattelitzellen beim Menschen zwischen den Gewebezellen liegen, oder dass sie sich durch Dedifferenzierung aus den bereits vorhandenen ausdifferenzierten Zellen bilden. Unter dem Begriff der Dedifferenzierung versteht man den Prozess in dem die spezialisierte Zelle ihre typische Proteinausstattung verliert und sich zu einem unspezialisierten Zelltyp zurückbildet. Da die Blastenzellen nicht als Vorläuferzellen in den ausdifferenzierten und ungeschädigten Geweben des Molches nachgewiesen werden konnten, ist eine Dedifferenzierung hier wahrscheinlicher als die Ausdifferenzierung vorhandener Zellen (6).

### **2.2.1. Differenzierungsabhängige Expression typischer Skelettmuskelproteine**

Die vorliegende Arbeit soll den Prozess der Dedifferenzierung von Herzmuskelzellen des *Notophthalmus viridescens* zu Blastenzellen und deren Redifferenzierung zu Skelettmuskelzellen nachweisen. Dies geschieht über den Nachweis der für Herzmuskelzellen, Blastenzellen und Skelettmuskelzellen spezifischen Proteine durch Antikörper. Da die hierfür verwendeten Antikörper dabei jeweils nur ein bestimmtes Protein identifizieren können, sollte der Zeitpunkt der Synthese dieses Proteins bekannt sein, um bei der Untersuchung von mehreren Proteinen desselben Zelltyps Aussagen über das Stadium der Regeneration treffen zu können. Die eingesetzten Antikörper waren gegen Desmin, skelettales Troponin I, kardiales Troponin T und die schwere Kette von skelettalem in Sarkomeren angeordnetem Myosin gerichtet. Desmin ist ein Protein des Zytoskeletts, das hauptsächlich in Muskelzellen, aber auch in anderen Geweben vorkommt. In Muskelzellen findet es sich vor allem in den Z-Streifen zwischen den Sarkomeren (2). Myosin ist ein aus sechs

Untereinheiten aufgebautes Protein. Es besteht aus zwei schweren Ketten, die sich umeinanderwinden und jeweils einen Schaft und ein Köpfchen haben. In dem Bereich der Köpfchen liegen in jeder schweren Kette zwei leichte Ketten. Mehrere Myosinfilamente bilden gemeinsam die dicken Filamente der Muskulatur. Troponin bildet gemeinsam mit Tropomyosin und Aktin die dünnen Filamente. Die Aufgabe von Troponin ist die Blockierung der Bindungsstelle für das Myosin an den dünnen Filamenten. Der Troponinkomplex besteht aus Troponin T, C und I. Erst durch Bindung von Kalzium an Troponin C gibt der Troponinkomplex die Bindungsstelle für das Myosin frei. So kann durch die Kalziumkonzentration im Muskel die Muskeltätigkeit gesteuert werden (20). Durch die enge funktionelle Zusammenarbeit von Troponin und Myosin beeinflussen sich diese auch in ihrer Entwicklung. Normalerweise lassen sich Einflüsse einzelner Proteine auf die Entwicklung von Zellen und Organismen gut durch Nullmutationen untersuchen. Dabei wird das Gen für das interessierende Protein in einem Individuum so verändert, daß dieses Protein nicht mehr produziert wird oder das produzierte Protein nicht funktionstüchtig ist. Für Troponin sind die Nullmutanten jedoch meist nicht lebensfähig, da kein funktionierendes Muskelgewebe entsteht und somit das Herz-Kreislauf System nicht funktionieren kann. Wenn man aber nur einzelne Troponinisoformen ausschaltet, werden deren Funktionen von anderen Isoformen übernommen, so dass auch hier die Funktion des einzelnen Proteins nicht geklärt werden kann. Eine Ausnahme bildet hier die Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*. Ein Teil der Flugmuskulatur der Fruchtfliege, die indirekte Flugmuskulatur, enthält nur eine Isoform des Troponins. Bei der Mutation *hdp<sup>3</sup>* des Troponingens wird nur diese Isoform nicht gebildet. Die entstehende Flugmuskulatur enthält dann kein Troponin. Da die Flugmuskulatur nicht lebensnotwendig ist und in anderem Muskelgewebe andere Troponinisoformen gebildet werden, ist die Fruchtfliege lebensfähig und man kann an ihnen untersuchen, wie sich das Fehlen von Troponin auf die Muskulatur auswirkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Muskelfasern ohne Troponin keine Sarkomerstrukturen ausbilden, sondern zu verklumpten Faserbündeln degenerieren. Vor der Bildung sarkomerer Strukturen muss also Troponin in den Muskelzellen vorhanden sein. Erst dann können die hier verwendeten Antikörper das in der sarkomeren Struktur gebundene Myosin detektieren (23).

### **2.3. Regeneration beim Menschen**

Unterschiedliche humane Gewebe besitzen verschieden ausgeprägte regenerative Fähigkeiten. Sind in verletztem Gewebe Stammzellen vorhanden und ist die Verletzung nicht zu tief, kann eine vollständige Regeneration stattfinden (34). Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer Basalmembran, die als Leitschiene für die Einwanderung der regenerativen Zellen dient. Ist der Schaden jedoch so groß, daß die Basalmembran zerstört wurde oder besitzt das Gewebe keine oder nur sehr geringe regenerative Fähigkeiten, kommt es zur Narbenbildung. Dies trifft zum Beispiel für Herzmuskel- und Nervengewebe zu. Narbengewebe besteht zum größten Teil aus Fibroblasten und Kollagenfasern. Es stellt einen Defekt im Gewebeverband dar, da die für die Organfunktionen benötigten spezialisierten Zellen fehlen (24). Doch selbst bei sehr regenerationsarmen Geweben wie dem Herzmuskel kommt es nach Verletzung zu vereinzelt Zellteilungen (4,12), oder durch eingewanderte oder implantierte undifferenzierte Zellen teilweise zur Regeneration (3, 32).

### **2.4. Regeneration beim Grünlichen Wassermolch**

Einige Lebewesen besitzen die Fähigkeit, anstelle von Narbengewebe voll funktionsfähige Gewebeverbände aus spezialisierten und für das betroffene Organ typischen Zellen zu bilden. Der in dieser Arbeit betrachtete Grünliche Wassermolch (*Notophthalmus viridescens*) besitzt eben diese Fähigkeit (7).

#### **2.4.1. Regenerationsstadien des Vorderbeins**

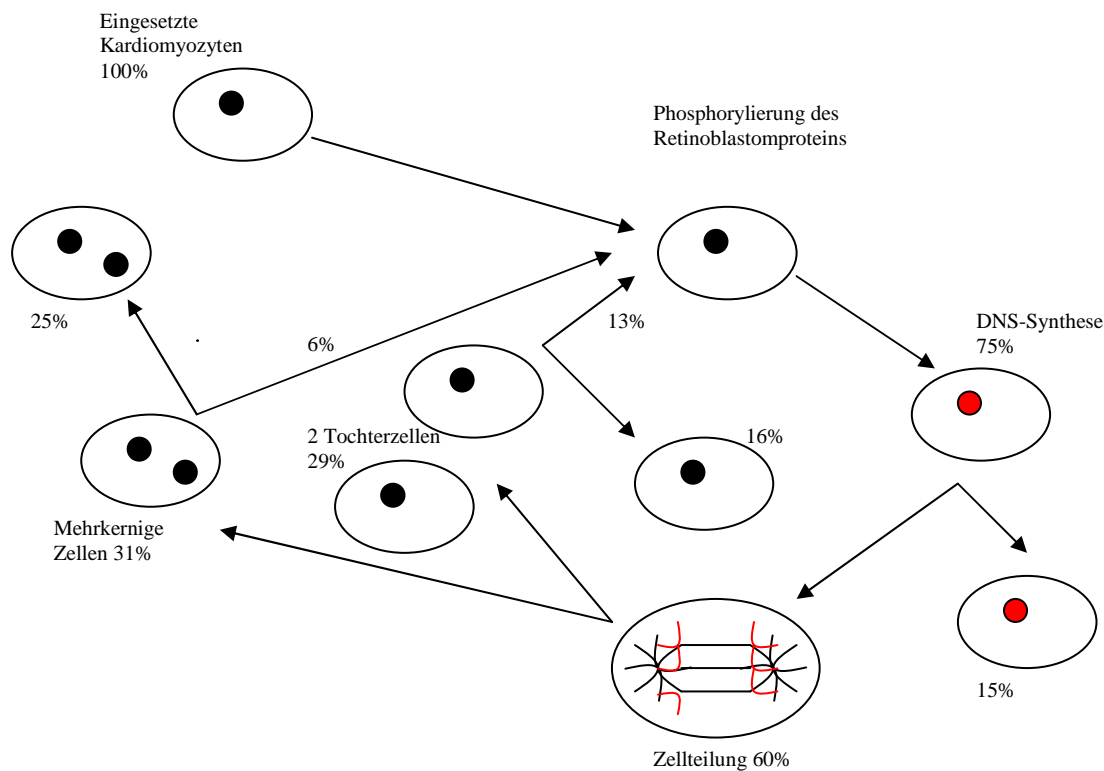
Ausführliche Beobachtungen des morphologischen Ablaufs der Regeneration wurden von Iten et al 1973 durchgeführt. Dabei wurde die Regeneration der Vorderbeine nach Abtrennung des Ober- oder Unterschenkels beschrieben. Die vollständige Regeneration benötigt unabhängig von der Höhe der Amputationsstelle ca. 70 Tage und kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden. Am Anfang steht die Bildung eines Wundepithels während der ersten 5 Tage. Dabei wird die Wunde innerhalb von 24 Stunden mit einer Zellschicht bedeckt und das Stumpfende schwillt an. Die Wundepidermis ist doppelt so dick wie die normale Epidermis und besitzt weder Hautdrüsen noch Pigmente. Die Muskeln und Knochen zeigen keine Anzeichen der Dedifferenzierung, lediglich die beschädigten Nerven erscheinen an ihren Enden unorganisiert. 6 bis 8 Tage nach der Amputation können in der frühen Dedifferenzierungsphase einkernige Muskelzellen beobachtet werden, die durch den Zerfall mehrkerniger Skelettmuskelfasern entstanden sind (18, 19). Diese zerfallenden

Skelettmuskelfasern sind bereits auf dem Weg der Dedifferenzierung. Das Wundepithel ist blasig verdickt und besitzt keine Basalmembran. In der späten Dedifferenzierungsphase, 8 bis 11 Tage nach der Amputation, ist eine starke Dedifferenzierung von Muskeln und Knochen zu sehen und die noch vorhandenen Nerven degenerieren. Einzelne Gruppen von teilungsaktiven Blastemzellen, welche ebenfalls durch Dedifferenzierungsvorgänge entstanden sind, sorgen für die Vermehrung der Zellmasse im Regenerat (36). Sie treten bei jeder Regeneration bei *Notophthalmus viridescens* und anderen regenerationsfähigen Arten zwischen Wundepithel und nicht dedifferenziertem Gewebe auf (1). Sobald die Stärke des Epithels an der Spitze der Regenerationszone zurückgeht, spricht man vom mäßig frühen Keimstadium. Das Blastemgebiet ist größer als im vorherigen Stadium und die Dedifferenzierung findet weiterhin statt. Im frühen Keimstadium, 12 bis 17 Tage nach Amputation, flacht das Wundepithel im Übergang zum normalen Epithel ab, so dass die Amputationsstelle nur noch durch das Fehlen von Hautdrüsen und Pigmenten erkennbar ist. Die Dedifferenzierung hat sich in den gesunden Teil des Beins hinein ausgebreitet. Das Blastemgebiet ist kompakter und teilweise von Kapillaren durchzogen. Dieses Kapillarsystem vergrößert sich beim Übergang in das mittlere Keimstadium 14 bis 20 Tage nach der Amputation. Im Durchlicht ist dann fließendes Blut erkennbar. Die Dedifferenzierung setzt sich weiter fort und ist 18 bis 24 Tage nach der Amputation nicht mehr erkennbar. Das Epithel weist erstmals eine Pigmentierung auf und die Knochenbildung setzt ein. Das gesamte Regenerat ist nun mit einem Kapillarnetz durchzogen. Diese Phase wird als spätes Keimstadium bezeichnet. Zwischen dem 22. und 28. Tag, dem Palettenstadium, beginnt dann die Muskelbildung, die Knochenbildung setzt sich fort und das Epithel wird pigmentierter. Die distalen Blastemzellen ordnen sich bereits in der späteren Hand- bzw. Fußstruktur an. Diese Gebiete bilden im frühen Fingerstadium in der Zeit vom 24. bis 33. Tag nach der Amputation kleine fingerartige Fortsätze aus. Zuerst sind von außen nur drei Finger zu erkennen, die mit einem dünnen gefäßfreien Gewebe verbunden sind. Ungefähr vier Wochen nach der Amputation sind vier fingerartige Fortsätze zu sehen. Hautdrüsen bilden sich in der Epidermis des Regenerats und die Muskel- und Knochenbildung schreitet weiter voran. Der Knorpel von Radius und Ulna ist jedoch noch mit dem Gebiet der späteren Handwurzelknochen verbunden. Sobald sich die Finger zwischen dem 30. und 40. Tag voneinander zu trennen beginnen, befindet sich das Regenerat im mittleren Fingerstadium. Normalerweise spalten sich zuerst der zweite und dritte Finger. Hautdrüsen sind in diesem Stadium unter der gesamten Epidermis zu finden. Die Zahl der Blastemzellen geht stark zurück und der Großteil des Gewebes besteht aus ausdifferenzierten Zellen. Im letzten

Stadium, dem späten Fingerstadium ab dem 34. Tag nach der Amputation, sind die Finger komplett getrennt, die Epidermis von Regenerat und Stumpf ist gleich, die Zellen sind ausdifferenziert und die knorpelig angelegten Knochen beginnen zu ossifizieren. Nach dem Ende der Ossifikation und dem Längenwachstum nach ca. 70 Tagen ist das Bein voll funktionstüchtig und von einem ungeschädigten Bein nicht mehr zu unterscheiden (15, 26). Diese Regenerationsstadien ähneln der embryonalen Entwicklung der Beine von *Notophthalmus viridescens* (37).

#### **2.4.2. Regenerationsfähigkeit der verwendeten Kardiomyozyten**

Eine Gewebeschädigung bedeutet immer, daß eine Anzahl Zellen zugrunde geht, die ersetzt werden muss. Voraussetzung für die Regeneration geschädigten Gewebes ist daher das Vorhandensein teilungsfähiger Zellen. M. Bettencourt-Dias et al. haben sich mit der Teilungsfähigkeit von Molchkardiomyozyten auseinandergesetzt. Sie legten Zellkulturen von Herzmuskelzellen an und behandelten diese mit Brom-Desoxyuridin (BrdU). Diese Verbindung wird bei der DNS-Synthese in die DNS eingebaut und kann mit Hilfe einer Immunzytochemie sichtbar gemacht werden. Da die DNS im Zellzyklus unmittelbar vor einer Zellteilung synthetisiert wird, ist der Einbau von BrdU ein Zeichen für eine beginnende Zellteilung. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herzmuskelzellen befähigt sind, Mitosen durchzuführen und sich zu teilen. Die meisten Zellteilungen und BrdU positiven Zellen konnten dabei zehn Tage nach der Anlage der Zellkultur beobachtet werden. Weiterhin wurden Zellen in Kulturen mit Tritium-Thymidin markiert. Dies ist radioaktiv markiertes Thymidin, welches bei der DNS Synthese eingebaut wird und durch die Radioaktivität nachgewiesen werden kann. So konnte gezeigt werden, daß nach 18 Tagen 75% der beobachteten Zellen in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten sind und von diesen Zellen 76% eine Mitose durchgeführt haben. Außerdem wurden Zellteilungen durch Langzeitbeobachtungen unter dem Phasenkontrastmikroskop direkt beobachtet (5).



Teilungshäufigkeit der Kardiomyozyten, nach (5)

### 3. Materialien und Methoden

Um eindeutig zeigen zu können, daß die Zellen eine Transdifferenzierung durchgemacht haben, wurden in den regenerierenden Stumpf ortsfremde Zellen verpflanzt. Wenn diese an der Regeneration teilnehmen, führt dies entweder zu einer Population von fremden Zellen in dem Bein oder die transplantierten Zellen müssen zu einer anderen Zellart transdifferenzieren. Dabei sind Herzmuskelzellen gut geeignet, da sie relativ rein zu gewinnen sind und es sehr spezifische Antikörper gegen Herzmuskelzellen gibt. Außerdem besitzen diese Zellen die Fähigkeit zur Regeneration, wie durch die Regeneration von Herzen in vivo und den Nachweis der DNS-Synthese und der Teilungsfähigkeit in vitro gezeigt werden konnte (5).

Die Herzmuskelzellen wurden in der Zellkultur mit dem Zellmarker DiI markiert und in den durch Amputation eines Hinterbeines gewonnenen Stumpf durch Injektion transplantiert. Die Stümpfe wurden nach einem, sieben, fünfzehn oder dreißig Tagen oberhalb der Injektionsstelle abgetrennt, am Cryotom zu 8µm dünnen Schnitten verarbeitet und immunhistochemisch untersucht. Zur Kontrolle wurden auch in ungeschädigte Hinterbeine Herzmuskelzellen transplantiert und diese nach denselben Zeiträumen untersucht. Unter der Annahme, daß ein großer Teil der neu gebildeten Zellen zum Ersatz der Beinmuskulatur zu Skelettmuskelzellen transdifferenziert, wurden die transplantierten Zellen auf das



Vorhandensein von Skelettmuskelproteinen untersucht. Dabei konnte im Vergleich zu anderen spezifischen Proteinen auf ein auffällig gutes Angebot an Antikörpern zurückgegriffen werden. Unter anderem gab es Antikörper, die zwischen Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur unterscheiden konnten und die nach eigenen Versuchen im Molchgewebe ebenfalls spezifisch für die jeweilige Muskulatur waren. Als Marker für Herzmuskelzellen wurde kardiales Troponin T verwendet und als Marker für Skelettmuskelzellen skelettales Troponin I, die schwere Myosinkette und sarkomeres Myosin.

### **3.1. Molchhaltung**

Die Molche wurden aus Tennessee in den USA bezogen. Die Tierhaltung erfolgte in einem Aquarienraum mit 12 großen und 6 kleinen Becken. Die großen Becken hatten eine Breite von 60cm, eine Tiefe von 38cm und eine Höhe von 35cm. Die kleinen Becken waren genauso tief und hoch wie die Großen, aber nur 40cm breit. Jeweils vier Becken bildeten eine Einheit und wurden von einem Filter gemeinsam versorgt. Insgesamt konnten in dem Raum 150 Molche gehalten werden. Die Temperatur in den Aquarien betrug 19,5°C. Sie wurde durch Temperaturfühler erfasst, die bei einer zu starken Erwärmung kaltes Leitungswasser in die Becken fließen ließen. Um die Keimbelastung im Aquarium möglichst gering zu halten, floss das Wasser aus dem Filtersystem durch eine UV-Lampe, bevor es wieder in die Becken gelangte. Vor dem Einsetzen neuer Molche in die Becken wurden die Tiere für 24 Stunden einem Bad mit 0,5%iger Sulfamerazinlösung unterzogen. In jedem Becken befand sich ein Stück Holz oder Borke, um den Tieren den Landgang zu ermöglichen. Die Fütterung erfolgte zwei bis drei Mal in der Woche mit roten Mückenlarven oder Arthemia-Krebsen als Lebendfutter.

### **3.2. Amputation des Hinterbeins**

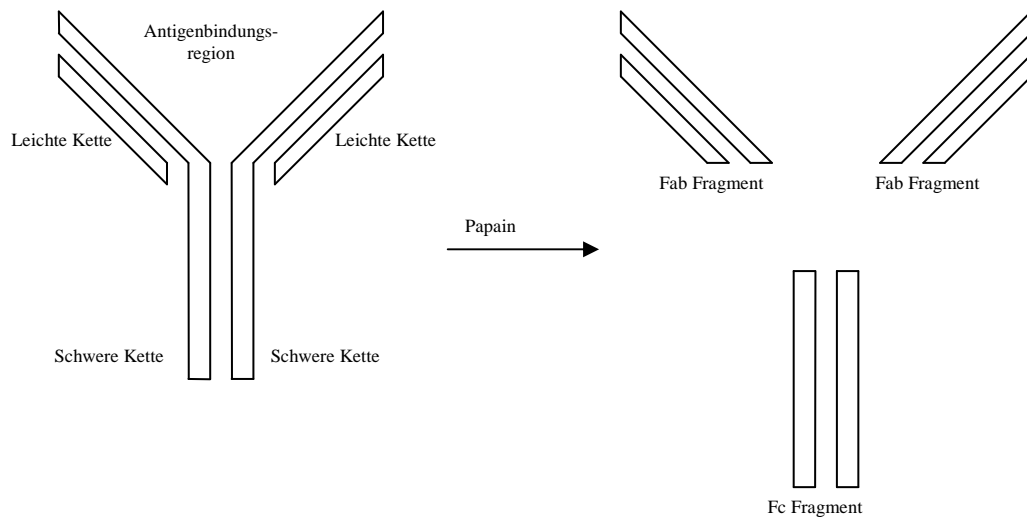
Um das Verhalten von Zellen in den regenerierenden Geweben des Grünlichen Wassermolchs zu beobachten, mussten zuerst Regenerationszonen geschaffen werden. Dies geschah hier durch die Amputation eines Hinterbeins in Höhe des Unterschenkels. Die Regeneration sollte bis zu einem Zeitpunkt von 35 Tagen nach der Amputation verfolgt werden. Daher musste die Amputation unter möglichst sterilen Bedingungen ablaufen, um mögliche Verunreinigungen und Infektionen zu vermeiden. Fünf bis zehn Minuten vor der Amputation wurden die Molche in ein Narkosebad mit 0,1%iger Tricainelösung getaucht. Als Unterlage für die Amputation diente eine große Petrischale. Der Unterschenkel wurde unterhalb des Kniegelenks mit einer

scharfen Schere abgetrennt. Zur Blutstillung diente Eis, auf das der Molch in der Petrischale kurze Zeit gelegt wurde. Die Blutstillung trat sehr rasch ein. Nach der Amputation verbrachten die Molche eine Nacht in einem Becken mit einer 0,5%igen Sulfamerazinlösung, um die Infektion der frischen Wunde zu verhindern. Danach kamen sie in ein Aquarium mit Leitungswasser. Fünf Tage nach der Amputation wurden die Herzmuskelzellen in den regenerierenden Stumpf dieser Tiere implantiert, wenn diese keine Zeichen für eine Infektion zeigten. Die in einigen Artikeln erwähnte Methode, an einem Molch mehrere Gliedmaßen zu amputieren um mehr Regenerationszonen zu erhalten, wurde hier nicht angewendet, da die Tiere dadurch in ihren Aktivitäten stark eingeschränkt werden.

### **3.3. Immunhistochemie, Immunzytochemie**

#### **3.3.1. Funktionsweise und Aufbau von Antikörpern**

Antikörper sind Proteine, die durch ihren Aufbau bestimmte Antigene erkennen können. Es werden fünf Gruppen von Antikörpern unterschieden. Diese sind Immunglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgE und IgD. Die Grundstruktur der Immunglobuline ist ein Y-förmiges Protein. Es besteht aus vier Proteinketten, die durch nichtkovalente Bindungen und Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Durch Lösung der Disulfidbrücken entstehen vier Bruchstücke, die nach ihrem Molekulargewicht in zwei schwere und zwei leichte Ketten unterteilt werden. Durch enzymatische Spaltung mittels Papain erhält man nur drei Fragmente. Zwei dieser Fragmente besitzen die Antigenbindungsregion und können noch das entsprechende Antigen binden. Diese werden Fab Fragment genannt. Das dritte Fragment besitzt keine Antigenbindungsregion mehr und ist im kompletten Immunglobulin für die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Immunglobulinfamilie zuständig. Außerdem bestimmt es die Plazentagängigkeit und die Halbwertszeit und ermöglicht die Bindung von Faktoren des Komplementsystems(20).



Aufbau eines Immunglobulins, nach (20)

### 3.3.2. Herstellung monoklonaler Antikörper

Bei einer Immunantwort reagieren normalerweise mehrere Zellen auf das Antigen, indem sie Antikörper produzieren und sich klonal vermehren. Dabei synthetisieren Zellen abhängig von ihrer Abstammung auch unterschiedliche Antikörper. Das Ergebnis ist eine polyklonale Immunantwort, da mehrere Zellklone unterschiedlichen Ursprungs mit unterschiedlichen Antikörpern beteiligt sind. Um vergleichbarere Ergebnisse zu erhalten, ist in der Immunhistochemie die Verwendung identischer Antikörper mit gleicher Bindungsstärke zum gewünschten Antigen nötig. Um dies zu erreichen, müssen die antikörperproduzierenden Zellen von einer Zelle, die einen bestimmten Antikörper produziert, abstammen. Um diese Zellen zu erhalten wird ein Tier mit dem gewünschten Antigen immunisiert. Dann werden die B-Lymphozyten aus der Milz entnommen und mittels Polyethylenglykol mit Myelomzellen fusioniert. Dadurch entsteht eine unbegrenzt teilungsfähige Zelllinie. Nicht fusionierte B-Lymphozyten sterben nach einem Tag in der Zellkultur ab. Um die nicht fusionierten Myelomzellen auszusondern wird dem Zellkulturmedium Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin zugesetzt. Aminopterin dient der Blockade eines Stoffwechselwegs, den die Milzzellen mit den Metaboliten Hypoxanthin und Thymidin umgehen können. Dadurch überleben nach einigen Tagen in der Zellkultur nur noch die erfolgreich fusionierten Zellen, welche die unbegrenzte Teilungsfähigkeit der Myelomzellen und die Enzymausstattung der B-Lymphozyten für den alternativen Stoffwechselweg besitzen. Die Zellkultur wird nun stark verdünnt und in einzelne Gefäße pipettiert, so dass möglichst nur eine Zelle pro Gefäß vorliegt. Die einzelnen Zellkulturen werden mittels ELISA auf die Produktion des

gewünschten Antikörpers überprüft. Die Zellen bilden nun durch Zellteilung Tochterzellen, die alle identische Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen produzieren (20).

### **3.3.3. Ablauf der immunhistochemischen Untersuchung**

Um die Stümpfe immunhistochemisch untersuchen zu können, mussten sie zuerst als 8µm dünne Schnitte auf einen Objektträger gebracht werden. Dafür wurden die Stümpfe zunächst für zwei Stunden mit 4%iger Paraformaldehydlösung bei 4°C fixiert, mit Amphibien-PBS gewaschen, über Nacht mit 30%iger Saccharoselösung behandelt und danach in Polyfreeze Tissue Freezing Medium (Polyscience, Inc.) auf Trockeneis bei -78°C eingebettet. Das Schneiden erfolgte am Cryotom bei -19°C. Die Schnitte hafteten selbständig auf den warmen, mit Vectabond beschichteten Objektträgern. Vor der Immunhistochemie wurden die Objektträger drei Mal in Amphibien-PBS getaucht, um das Einbettungsmittel abzuwaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde für ein bis zwei Stunden eine proteinreiche Blockierungslösung aufgetragen, danach der Primärantikörper auf die Objektträger pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. So konnte sich der nicht markierte Primärantikörper an das interessierende Antigen binden. Nach der Inkubation wurden die Objektträger wieder durch dreimaliges Eintauchen in Amphibien-PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend konnte der Sekundärantikörper, der nach dem Prinzip eines Sandwich-ELISA gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und fluoreszenzmarkiert ist, aufgetragen werden. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die nicht gebundenen Antikörper wurden wieder durch Eintauchen in Amphibien-PBS abgewaschen. Dabei erfolgte bei der zweiten Waschung eine Zugabe von Hoechst 33258 (10mg/ml) mit einer Verdünnung von 10µl des Farbstoffes auf 100ml Waschlösung. Dieser Farbstoff bindet mit hoher Affinität an die Kern-DNS der Zellen, wodurch die Zellkerne im UV-Licht blau fluoreszierten. Abschließend wurde der Objektträger mit Mowiol überschichtet und mit einem Deckgläschen geschützt. Unter dem Mikroskop wurde die Fluoreszenzmarkierung mit einem Licht bestimmter Wellenlänge angeregt. Da die Markierung Licht einer bestimmten anderen Wellenlänge emittiert, konnte von der Farbe des emittierten Lichts auf die Position der Antikörper und damit auf die Position der Antigene im Gewebe geschlossen werden.

### **3.3.4. Ablauf der Immunzytochemie**

Bei der Immunzytochemie werden im Gegensatz zur Immunhistochemie Zellkulturen in der Petrischale betrachtet. Dabei wurden die Zellen zuerst in der Petrischale fixiert und vor der Zugabe der Antikörper die Zellmembranen durchlässig gemacht. Vor der Fixierung wurde das Zellkulturmedium durch zweimaliges Waschen mit Amphibien-PBS entfernt. Die Fixierung selbst erfolgte mit einer Mischung aus 70% Methanol und 30% Aceton für 20 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Danach wurde die Fixierungslösung abgesaugt und die Petrischale bei Raumtemperatur getrocknet. Ziel der Fixierung war die Stabilisierung der Proteinstruktur in den Zellen, das Festhaften der Zellen auf der Petrischale und die Verhinderung des proteolytischen Abbaus der Zellorganellen nach dem Zelltod. Auch bei der Immunzytochemie bestand der erste Schritt im dreimaligen Waschen der Zellen mit Amphibien-PBS. Allerdings wurde hier der Waschlösung 0,1% Triton X-100 beigegeben, welches die Zellmembran permeabel macht, so dass Antigene innerhalb der Zelle für den Antikörper detektierbar werden. Auch das Blockierungsmittel enthielt eine Zugabe von 0,1% Triton X-100. Die Blockierung erfolgte für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde in Amphibien-PBS mit 1% Pferdeserum und 1% bovinem Serumalbumin verdünnt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurden die Zellen drei Mal mit Amphibien-PBS gewaschen und der Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kernfärbung erfolgte auch hier mit Hoechst 33258 beim Abwaschen der ungebundenen Sekundärantikörper. Die Auswertung fand unter dem Fluoreszenzmikroskop statt.

### **3.3.5. Verwendete Antikörper**

Das Problem bei der Verwendung von industriell hergestellten Antikörpern beim Molch liegt darin, dass für die wenigsten Antikörper zuverlässige Angaben hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit bei diesen Tieren existieren. Es sind also Kontrollen nötig, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Zur Kontrolle der Unterscheidungsfähigkeit der Antikörper zwischen Skelettmuskulatur und Herzmuskulatur wurden Gewebeschnitte von ungeschädigten Molchherzen und Hinterbeinen angefertigt und diese immunhistochemisch untersucht.

## My 32

Der Antikörper MY 32 ist ein von Mauslymphozyten gebildetes monoklonales IgG und ist gegen die schwere Myosinkette von Skelettmuskelzellen gerichtet. Herzmuskelzellen und glatte Muskelzellen werden nicht markiert. Er wird von der Firma Sigma aus Saint Louis, Missouri, USA, geliefert. Seine Selektivität wurde an Geweben von Mensch, Kaninchen, Ratte, Maus, Rind, Huhn und Meerschweinchen getestet. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß MY 32 auch beim Molch ausschließlich Skelettmuskelzellen markiert. Abbildung 1 zeigt die positive Markierung bei Skelettmuskelzellen eines Molchbeins mit einer Belichtungszeit von 0,25 Sekunden und Abbildung 2 die fehlende Markierung bei einem Molchherz mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden.

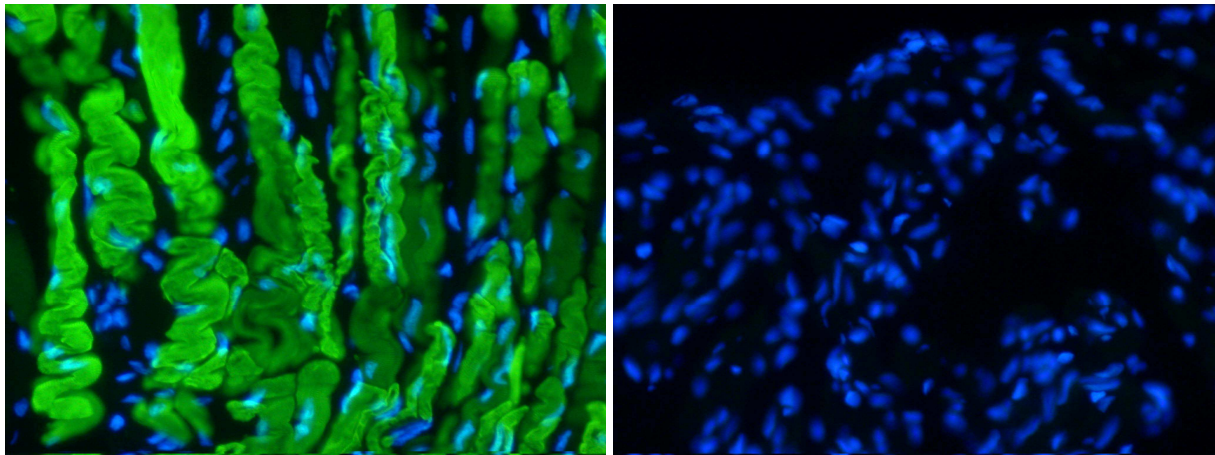


Abb. 1: Detektion von Skelettmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein mit My 32 (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

Abb. 2: Fehlende Grünfluoreszenz von My 32 bei Herzmuskulatur (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

## BM 750

Der Antikörper BM 750, ebenfalls ein Maus IgG, richtet sich gegen kardiales Troponin T. Er ist von der Firma Acris Antibodies, Deutschland, entwickelt worden und an Geweben von Mensch und Rind getestet. Auch hier konnte gezeigt werden, daß BM 750 beim Molch ausschließlich Herzmuskulatur detektiert. Abbildung 3 zeigt die Markierung im Herzmuskel bei einer Belichtungszeit von 0,125 Sekunden und Abbildung 4 ein mit BM 750 behandeltes Molchbein bei einer Belichtungszeit von 1 Sekunde.

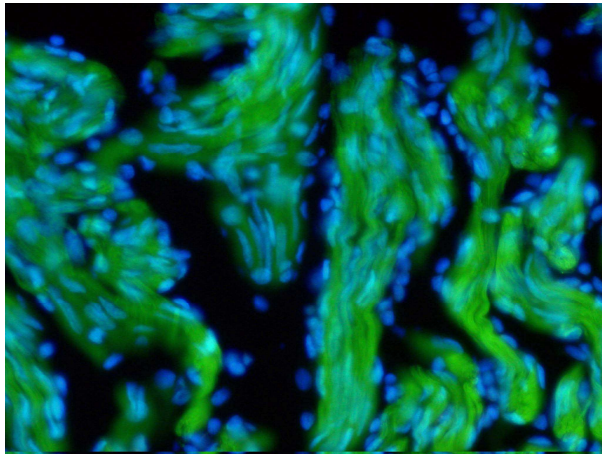


Abb. 3: Detektion von Herzmuskelzellen mit BM 750 (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

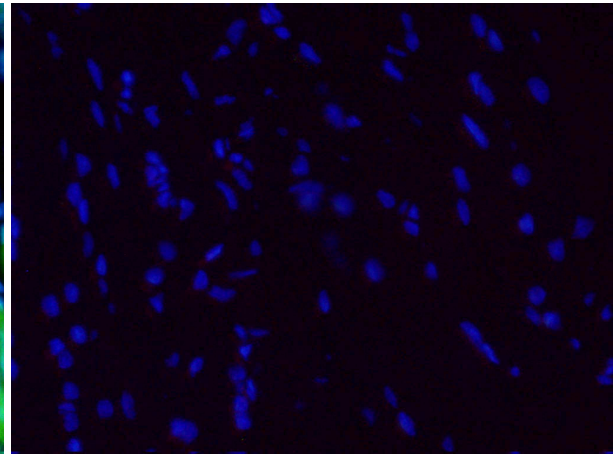


Abb.4: Fehlende Grünfluoreszenz von BM 750 bei Skelettmuskelzellen (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

## MF 20

Der Antikörper MF 20 ist ein gegen sarkomeres Myosin gerichtetes Maus IgG. In dieser Arbeit wurden die Antikörper aus einem Hybridomüberstand einer Zellkultur aus dem Institut für physiologische Chemie der Martin Luther Universität Halle verwendet. Es erwies sich, dass der Antikörper MF 20 bei den Molchen zwischen der Myosinkette von Skelettmuskelzellen und der von Herzmuskelzellen unterscheidet und nur die Skelettmuskelzellen anfärbt. Abbildung 5 zeigt ein mit MF 20 behandeltes Hinterbein bei einer Belichtungszeit von 0,2 s und Abbildung 6 ein mit MF 20 behandeltes Herz bei einer Belichtungszeit von 0,5 s.

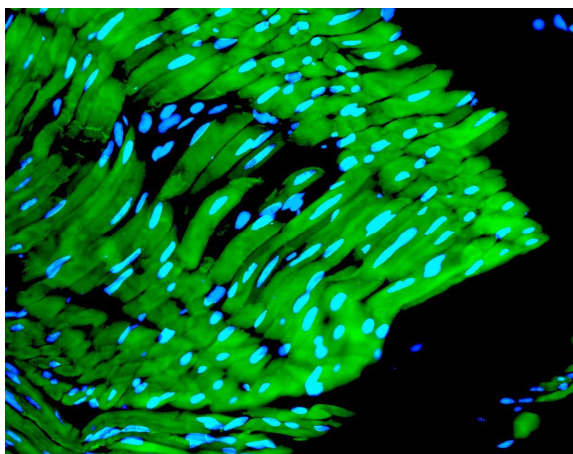


Abb. 5: Detektion von Skelettmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein mit MF 20 (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

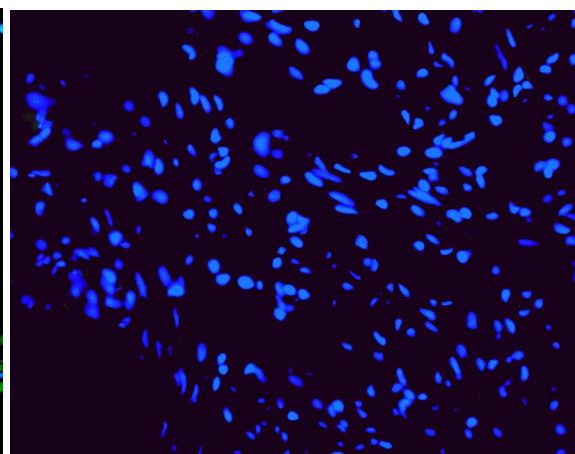


Abb. 6: Fehlende Grünfluoreszenz von MF 20 bei Herzmuskulatur (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)



Der Antikörper 22/18 wurde von Jeremy P. Brockes, Ludwig Institute for Cancer Research, Middlesex Hospital, London speziell zur Erkennung von Blastemzellen des Grünlichen Wassermolchs entwickelt. Er reagiert auf eine zytoplasmatische Komponente, welche nur in den Blastemzellen vorkommt. Eine genauere Spezifizierung des Antigens ist noch nicht vorhanden. Der Antikörper selbst ist ein IgM der Maus. Exemplarisch ist hier in Abbildung 7 und 8 eine Aufnahme des Blastemgebietes 12 Tage nach der Amputation dargestellt.

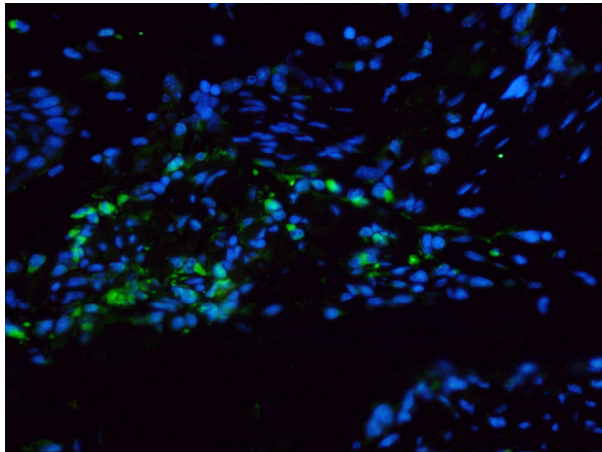


Abb. 7: Blastemgebiet 12 Tage nach Amputation  
(Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

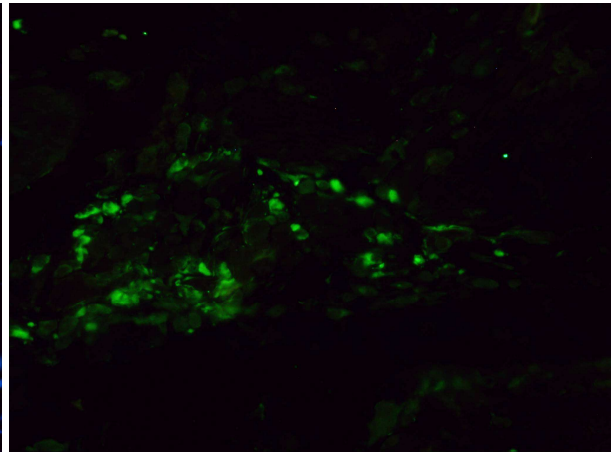


Abb. 8: Blastemgebiet 12 Tage nach Amputation  
(nur grüne Fluoreszenz)

### Anti Desmin

Der Antikörper, der sich gegen Desmin richtet, ist ein Kaninchen IgG. Er wird von der Firma Sigma, 3050 Spuce Street, Saint Louis, Missouri 63103, USA hergestellt. Desmin ist ein für Muskulatur typisches Intermediär-filament, welches in Skelettmuskelzellen, glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen, aber auch in anderen Geweben vorkommt (29). Exemplarisch ist hier in Abbildung 9 die positive Markierung von Desmin in ungeschädigter Muskulatur dargestellt.

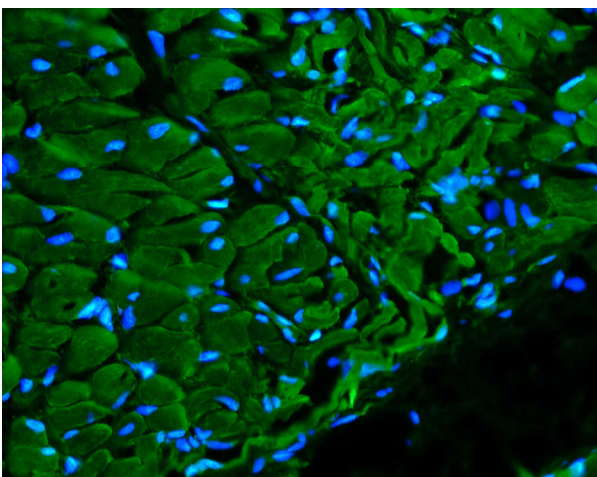


Abb. 9: Markierung von Desmin in ungeschädigter Muskulatur (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)



Der Antikörper BM 747 ist ein Maus IgG. Er ist gegen skelettales Troponin I gerichtet und von der Herstellerfirma Acris Antibodies GmbH, Im Himmelreich 11, 32120 Hiddenhausen, bei Geweben von Hasen, Hühnern, Fischen und Fröschen getestet worden. Troponin I ist ein Protein, welches sich in Muskelzellen am Aktinfilament befindet und dort die Bindung der Myosinköpfe am Aktin reguliert. Je nach Muskelart enthalten die Zellen unterschiedliche Isoformen von Troponin, so dass bei bestimmten Troponinisofomen auf den Zelltyp geschlossen werden kann. Auch für diesen Antikörper konnte gezeigt werden, dass er beim Molch ausschließlich Skelettmuskelzellen detektiert. Abbildung 10 zeigt die Detektion von skelettalem Troponin I im ungeschädigten Hinterbein bei einer Belichtungszeit von 0,25 s und Abbildung 11 die fehlende Fluoreszenz im Molchherz bei einer Belichtungszeit von 0,5 s.

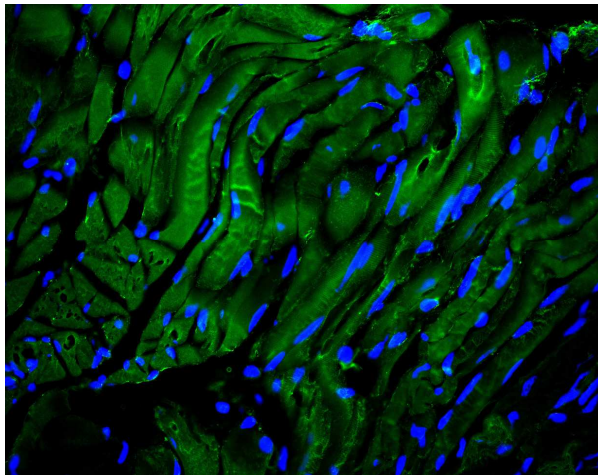


Abb. 10: Detektion von Skelettmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein mit BM 747 (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

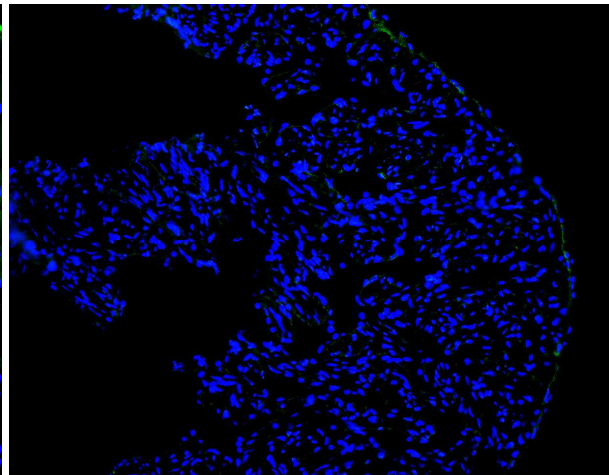


Abb. 11: Fehlende Grünfluoreszenz von BM 747 bei Herzmuskulatur (Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz)

### Sekundärantikörper

Da die Sekundärantikörper gegen die Primärantikörper gerichtet sind, ist die Antigenerkennung unabhängig von dem Gewebe, an dem die Markierung stattfindet. Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper wurden von der Firma Dianova Forschungsreagenzien bezogen.

Anti Maus IgG: Der Antikörper gegen Maus IgG ist ein Ziegen IgG. Er ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein Isothiozyanat (FITC) markiert. Das spezifische Antigen ist die leichte Kette von Maus IgG.

Anti Kaninchen IgG: Bei dem Antikörper gegen Kaninchen IgG handelt es sich ebenfalls um ein Ziegen IgG. Der Fluoreszenzfarbstoff ist Dichlorotriazinyl Amino Fluoreszein (DTAF). Als Antigen wird die leichte Kette von Kaninchen IgG erkannt.

Anti Maus IgM: Der Antikörper gegen Maus IgM wurde von der Firma Calbiochem bezogen. Er ist ein gegen die schwere und die leichte Kette des Maus IgM gerichtetes Kaninchen IgM. Die Markierung erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff FITC.

### **3.4. Verwendete Molchkardiomyozyten**

#### **3.4.1. Zellgewinnung**

Für die Versuche wurden markierte Herzmuskelzellen des Molchs verwendet. Zur Zellgewinnung benötigte man Molchherzen, da sich die Kardiomyozyten in der Zellkultur kaum vermehren. Vor der Herzentnahme kamen die Molche für ca. 10 Minuten in eine 0,1%ige Tricaine Lösung. Zur Entnahme wurden die Molche in der Sterilwerkbank auf eine sterile Petrischale gelegt, der Bauch mit einer Jodlösung desinfiziert, der Brustkorb mit einer Schere geöffnet und das Herz entnommen. Die Herzen lagerten direkt nach der Entnahme vorübergehend in einer 70%igen serumfreien Leibowitz 15 Lösung. Um eine möglichst reine Herzmuskelzellkultur zu erhalten, mussten die einzelnen Zellen aus dem Gewebeverband gelöst werden. Dies erfolgte in einer Lösung aus Kollagenase und Trypsin. Zur Zellvereinzlung wurde die Verdauung zu den Molchherzen gegeben und bei 27°C auf den Schüttler gelegt. Alle zwei Stunden wurde der Überstand in der Sterilwerkbank abgesaugt und frische Verdauung zugegeben. Ab vier Stunden nach dem Beginn des Gewebeverdaus wurden die Überstände mit den aus dem Gewebeverband gelösten Zellen im Verhältnis 1:1 mit serumhaltiger Leibowitz 15 Lösung versetzt um die Enzyme des Verdauansatzes zu neutralisieren. Danach wurden die Zellsuspensionen bei 500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Kulturmedium resuspendiert und in die Kulturschalen ausgesät. Der Zellverdau lief insgesamt ca. zehn Stunden. Die Kulturschalen enthielten Leibowitz 15 Lösung Kulturmedium und 10% fetales Rinderserum. Unter diesen Bedingungen haftete der Großteil der Zellen mit Ausnahme der Herzmuskelzellen an der Plastikoberfläche der Petrischale. Das Kulturmedium mit den Herzmuskelzellen wurde nach 48 Stunden abgesaugt und in mit Laminin beschichtete Petrischalen gegeben. Um die Lamininbeschichtung zu erhalten, wurden die Zellkulturschalen 60 Minuten mit serumfreiem Kulturmedium mit 15 µg Laminin pro ml Kulturmedium

behandelt. Durch dieses von J. O. Oberpriller et al. angewendete und als Preplating bezeichnete Verfahren bestehen die Zellkulturen nach fünf Tagen zu 93,5% aus Herzmuskelzellen. Selbst nach 20 Tagen sind noch 90% der Zellen Herzmuskelzellen (25). Nach drei Tagen, in denen die Zellen sich an der Oberfläche festheften konnten, wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt. Als Medium wurde 70%ige Leibowitz-15 Lösung mit 10% fetalem Rinderserum verwendet.

### **3.4.2 Zellkultur**

Die Kultivierung der Zellen fand in lamininbeschichteten Petrischalen im Brutschrank bei 26°C ohne CO<sub>2</sub> statt. Als Zellkulturmedium wurde 70%iges Leibowitz 15 Kulturmedium mit 10% fetalem Rinderserum sowie Penicillin und Streptomycin zur Antibiose verwendet. Unter diesen Bedingungen kam es in der Zellkultur in einigen Fällen zur Teilung der Kardiomyozyten. Viele Zellen wiesen zwei oder mehr Zellkerne auf. Die Proliferation war allerdings nicht so stark, dass ein Zellrasen entstanden wäre. Auch die Anlage von Subkulturen war aufgrund der geringen Proliferation nicht möglich, so daß für die Experimente Molchherzen zur Gewinnung von ausreichenden Mengen von Kardiomyozyten benötigt wurden.

### **3.4.3 Zellmarkierung mit DiI**

Es gibt verschiedene Di Farbstoffe. Nach der Fluoreszenzfarbe werden DiI (orange), DiO (grün) und DiD (rot) unterschieden. In dieser Arbeit wurde ein Analogon von DiI verwendet, CellTracker CM-DiI, das auch bei der Fixation und der Immunhistochemie sicher in den Zellmembranen der markierten Zellen bleibt. Der Zellmarker CM-DiI ist ein langkettiges Kohlenstoffzyaninmolekül. Es lagert sich aufgrund seiner stark lipophilen Kohlenstoffketten in die Zellmembranen ein und bindet mit einer Chlormethylgruppe an Thiole der Lipoproteine in der Zellmembran. Bisherige Verwendungsgebiete waren die Markierung von Zellen, Zellorganellen, Liposomen, Viren und Lipoproteinen in Langzeituntersuchungen zur Zelltransplantation, Migration, Adhäsion und Zellfusion. DiI ist vor allem durch seine geringe Zelltoxizität für Langzeitbeobachtungen geeignet. Die Fluoreszenz ist im wässrigen Milieu nur sehr gering. Erst nach dem Einbau in die Zellmembranen ist eine intensive Fluoreszenz zu beobachten.

Vor der Markierung der Zellen erfolgte die Absaugung des Kulturmediums und zweimalige Waschung der Zellen mit Amphibien PBS. Die Zellkultur wurde mit einer Lösung des

Zellmarkers mit einer Konzentration von 2µg/ml in Amphibien PBS überschichtet. Die Lösung mit dem Zellmarker blieb für fünf Minuten bei 26°C und für 15 Minuten bei 4°C in der Zellkulturschale. Der lipophile Farbstoff lagerte sich dabei von selbst in die Zellmembranen ein. Nach der Markierung wurden die Zellen mit Amphibien PBS gewaschen. Im Verlauf der Arbeit fanden auch Versuche mit anderen Zellmarkierungen statt. Dabei kamen der Vitalkernfarbstoff Hoechst 33342 und die Transfizierung mit dem Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) zum Einsatz. Der Vitalkernfarbstoff wies allerdings nach 30 Tagen eine für die Immunhistochemie zu geringe Fluoreszenz auf. Er wurde nur eingesetzt, um mit einer Doppelmarkierung die Stabilität des Farbstoffs DiI in den Kardiomyozyten zu zeigen. Die GFP-Transfizierung war in den ersten Tagen in der Zellkultur erfolgreich, eine grüne Fluoreszenz der Zellen konnte jedoch erst sechs Tage nach der Transfizierung beobachtet werden. Nach der Transplantation war die Grünfluoreszenz in den Zellen jedoch nicht mehr nachweisbar. Die Ursache, die für das Verschwinden der Fluoreszenz nach der Transplantation verantwortlich war konnte nicht gefunden werden. Eine mögliche Erklärung wäre die Änderung der Genexpression durch das Milieu in dem regenerierenden Hinterbein. Allerdings wird auch die erfolgreiche Markierung von Molchzellen in regenerierendem Gewebe durch Transfizierung beschrieben (18). Ein weiterer in der Zellmarkierung beim Molch eingesetzter Farbstoff, PKH 26, war in vergleichenden Arbeiten etwas weniger langzeitstabil. Der Farbstoff DiI konnte damit als einziger über die gesamte Versuchsdauer nachgewiesen werden und eignete sich aufgrund seiner sicheren Anwendung, der geringen Zelltoxizität, den guten Erfahrungen im Institut und aus vorherigen Arbeiten gut für die Langzeitmarkierung der Molchkardiomyozyten.

#### **3.4.4. Zelltransplantation**

Die Vorbereitungen für die Zelltransplantation liefen ähnlich ab wie die für die Amputation. Die Narkotisierung der Molche erfolgte für ca. 10 Minuten in einer 0,1%igen Tricaine Lösung. Die zuvor markierten Herzmuskelzellen wurden mit einer Lösung aus 0,02% EDTA und 0,05% Trypsin in Amphibien PBS von den Kulturschalen gelöst und nach kurzer Zentrifugation und Resuspension auf eine Spritze gezogen. Die regenerierende Beinknospe wurde mit der Hand festgehalten und die Herzmuskelzellen mit einer Spritze als Zellsuspension nahe der Regenerationszone in den regenerierenden Stumpf transplantiert. Um eine möglichst große Zahl an Herzmuskelzellen in den Gewebeschnitten zu erhalten, wurden bis zu drei Injektionen in unterschiedlichen Winkeln zueinander vorgenommen. Bis

zum Abklingen der Narkose befanden sich die Molche in einem separaten Becken mit Leitungswasser.

### 3.5. Geräte und Chemikalien

#### 3.5.1. Geräte

Mikroskop:	Axioplan2/Axiophot2	Zeiss, Jena
Mikroskop:	Stemi 2000-C	Zeiss, Jena
Kamera:	Coolpix 990	Nikon
Brutschrank:	HERA cell	Sorvall/Heraeus
	Cryotom	
	Bildbearbeitungsprogramm:	Adobe Photoshop Elements 2.0

#### 3.5.2. Chemikalien

Amphibien-PBS (Phosphate buffered Saline)

NaCl	6,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,108 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,396 g
Zellkulturwasser	1l

Kollagenaselösung

Amphibien – PBS (s.o.)	8,4 ml
BSA – Fraktion V	15,0 mg
Collagenase	10,5 mg
D-Glukose	30,0 mg
Gentamycin (50mg/ml)	10,0 µl
2,5% Trypsin	2,1 ml

## Mowiol

Mowiol 4-88 (Calbiochem Nr. 475904)	2,4 g
Glycerol	6 g
H <sub>2</sub> O	6 ml
0,2M Tris/HCl-Puffer pH 8,5	12 ml

Mowiol, Glycerol und Wasser mischen und einige Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Danach Zugabe des Tris/HCl-Puffers und mit einem Magnetrührer bei 50°C bis zur vollständigen Auflösung rühren.

## PFA (4%)

Paraformaldehyd	40 g
Amphibien-PBS	1000 ml
1 N NaOH	wenige Tropfen

Paraformaldehyd und Wasser mischen und im Abzug auf 60°C erwärmen. Das ungelöste Paraformaldehyd löst sich nach Zugabe einiger Tropfen 1 normaler Natronlauge.

## Blockierungsmittel

Amphibien-PBS	100 ml
Bovines Serumalbumin	500 mg
Pferdeserum	3 ml

## Zellkulturmedium (L-15) Angaben in mg/l

NaCl	8000	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	359
KCl	400	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60
CaCl <sub>2</sub>	140	D(+)-Galactose	900
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	200	Na-Pyruvat	550
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	200	Phenolrot	10
L-Methionin	75	L-Threonin	300
L-Lysin	75	L-Tryptophan	20
L-Leucin	125	L-Tyrosin	300
L-Phenylalanin	125		

L-Alanin	225	Cholinchlorid	1
L-Arginin	500	Folsäure	1
L-Asparagin	250	Myo-Inositol	2
L-Cystein	120	Nicotinamid	1
L-Glutamin	300	Pyridoxin HCl	1
Glycin	200	Riboflavin-5-Phosphat-Na	0,1
L-Histidin	250	Thiaminmonophosphat	1
L-Isoleucin	125	D-Ca-Pantothenat	1
L-Valin	100		

#### Vectabondbeschichtung

Vectabond Reagent (Vector Laboratories)	7 ml
Aceton	350 ml

Die Objektträger vor der Beschichtung 5 Minuten in Aceton tauchen. Vectabond Reagent und Aceton mischen. Die Objektträger für 5 Minuten in die Lösung tauchen und danach in destilliertem Wasser das überschüssige Vectabond-Aceton Gemisch abwaschen und die Objektträger lufttrocknen lassen. Eine Lösung reicht für die Beschichtung von ca. 500 Objektträgern.

#### Fetales Rinderserum

#### Tricaine Lösung

Ethyl-3-Aminobenzoatmethansulfat, bezogen von der Firma Sigma

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Herzmuskelspezifisches Antigen

Die transplantierten Herzmuskelzellen erfahren unter dem Einfluss des regenerierenden Stumpfes eine sehr rasche Veränderung. Sie besitzen bereits nach 24 Stunden kein cardiales Troponin T mehr, wie die fehlende Markierung mit dem Antikörper BM 750 zeigt (Abb. 1). Die Dedifferenzierung findet nur im geschädigten Bein statt. Im ungeschädigten

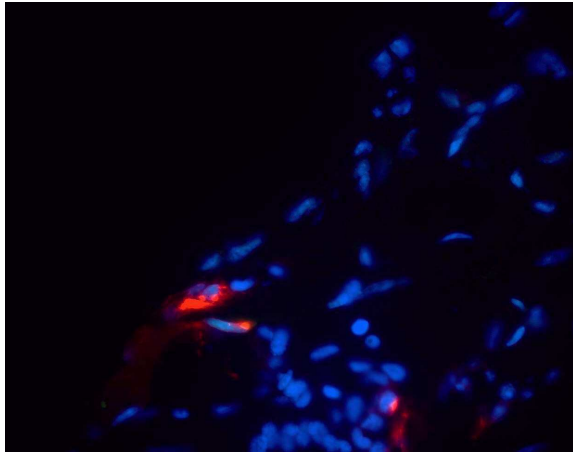


Abb. 1: fehlende Detektion von kardialem Troponin T mit BM 750 im regenerierenden Stumpf nach einem Tag (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

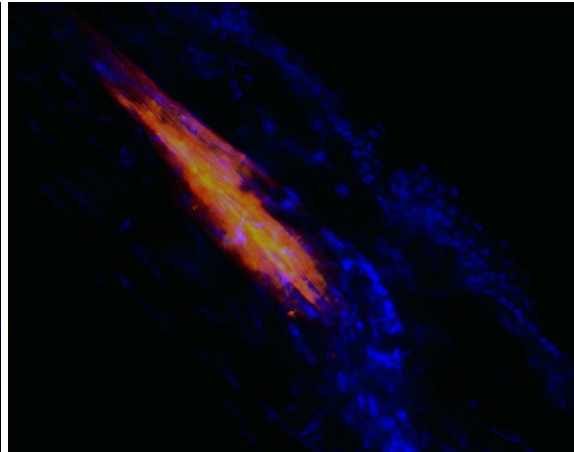


Abb. 2: Detektion von kardialem Troponin T mit BM750 bei Herzmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein nach 15 Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

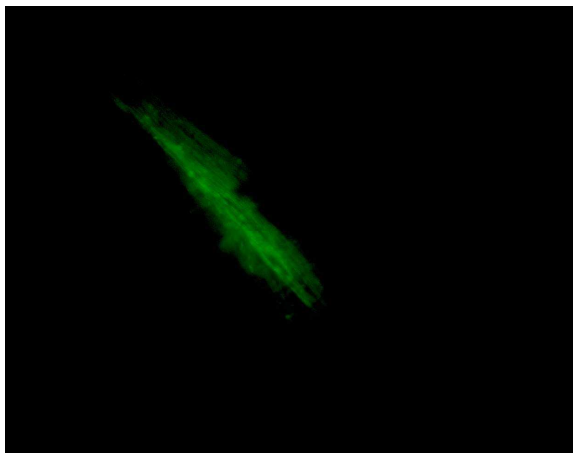


Abb. 3: Detektion von kardialem Troponin T mit BM750 bei Herzmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein nach 15 Tagen

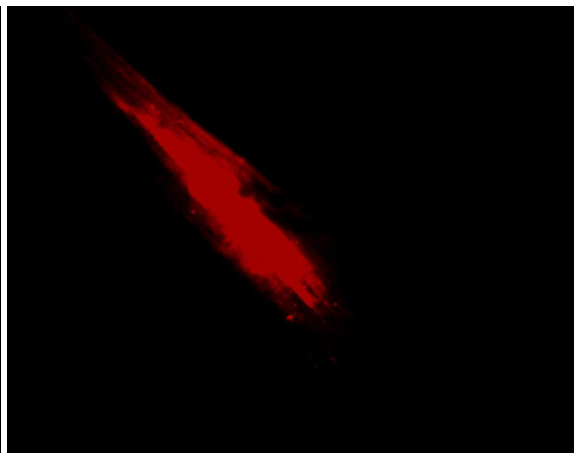


Abb. 4: Rotfluoreszenz der markierten Herzmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein nach 15 Tagen

Bein hingegen bleibt das Herz-Troponin T stabil und lässt sich immunhistochemisch nachweisen (Abb. 2, 3, 4). Auch im weiteren Verlauf lässt sich bis 30 Tage nach der Transplantation im regenerierenden Stumpf kein kardiales Troponin T nachweisen. Die Haltung der Zellen in der Zellkultur kann nicht die Ursache für den Verlust an Troponin T sein, da die Zellen in der Kulturschale während der gesamten Kulturzeit BM 750 positiv



blieben (Abb. 5). Im ungeschädigten Hinterbein bleibt kardiales Troponin T auch nach 30 Tagen noch nachweisbar (Abb. 6).

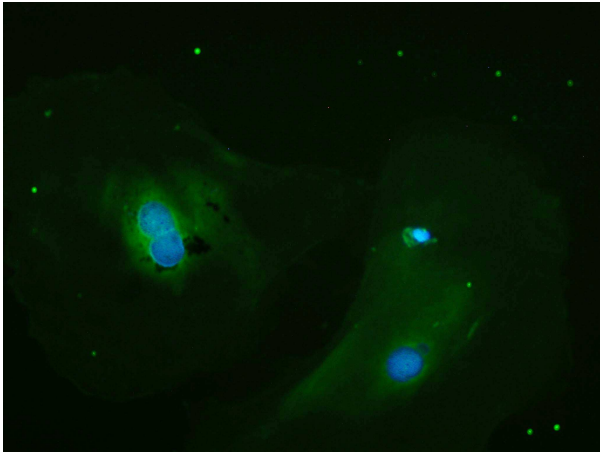


Abb. 5: Detektion von kardialem Troponin T mit BM 750 bei Herzmuskelzellen in der Zellkultur (Überlagerung von blauer und grüner Fluoreszenz)

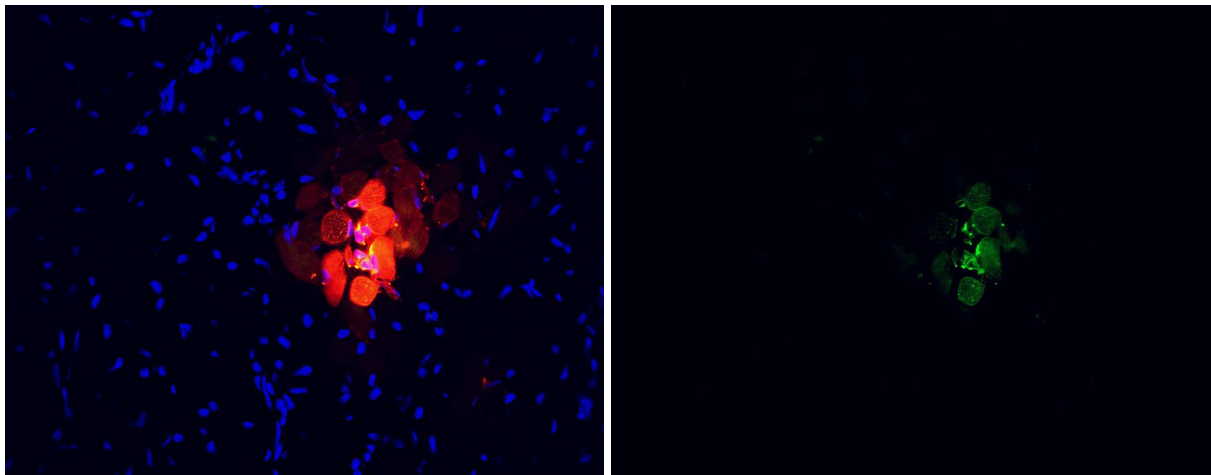
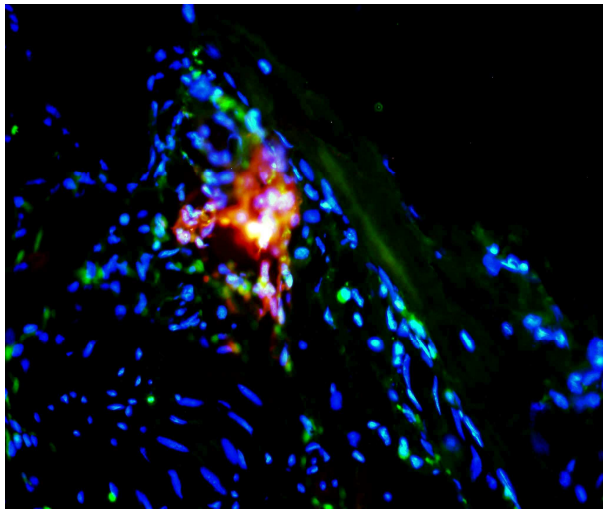


Abb. 6: Detektion von kardialem Troponin T mit BM 750 bei Herzmuskelzellen im ungeschädigten Hinterbein nach 30 Tagen (links Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz; rechts nur Grünfluoreszenz des Antikörpers)

#### 4.2. Blastemzellspezifisches Antigen

Nach 24 Stunden sind die Zellen außerdem von dem Antikörper 22/18 markiert (Abb. 7). Dieser wurde von Jeremy P. Brockes entwickelt, um Blastemzellen beim *Notophthalmus viridescens* nachzuweisen, die für die Proliferation des regenerierenden Gewebes verantwortlich sind und aus denen sich die Zellen des regenerierten Beins bilden. Der Antikörper wurde zur Detektion von Blastemzellen im frühen bis mittleren Knospstadium entwickelt. Das Antigen befindet sich intrazellulär und geht mit der Differenzierung der Blastemzellen zu ausdifferenziertem Gewebe verloren. Nach sieben Tagen ist die Reaktion



auf 22/18 nur noch schwach positiv (Abb. 8), dann lässt sich das blastemzellspezifische Antigen nicht mehr bei den transplantierten Zellen nachweisen.

Abb. 7: Detektion von blastemzellspezifischem Antigen mit 22/18 nach einem Tag (Überlagerung von blauer grüner und roter Fluoreszenz)

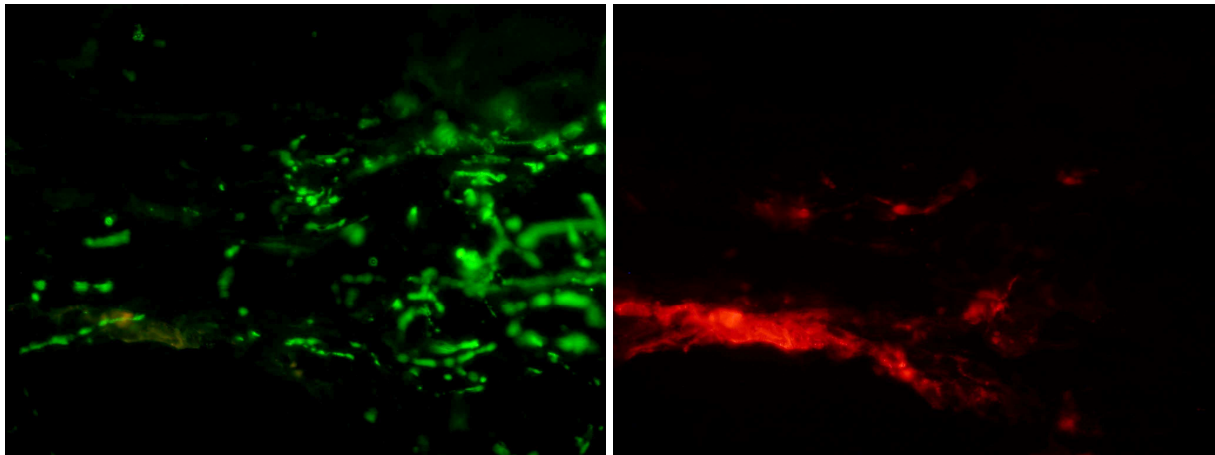


Abb. 8: Detektion von blastemzellspezifischem Antigen mit 22/18 nach sieben Tagen (links Grünfluoreszenz des Antikörpers; rechts Rotfluoreszenz der markierten Zellen)

### 4.3. Skelettmuskelspezifische Antigene

Die transplantierten Zellen zeigen in den ersten zwei Wochen im regenerierenden Stumpf keine positive immunhistochemische Färbung für einen der eingesetzten skelettmuskelspezifischen Antikörper. Die Zellen liegen entweder im Skelettmuskel und beteiligen sich an seinem Aufbau (Abb. 9, 11, 13, 14), oder sie liegen daneben und scheinen andere Strukturen zu bilden (Abb. 10, 12).

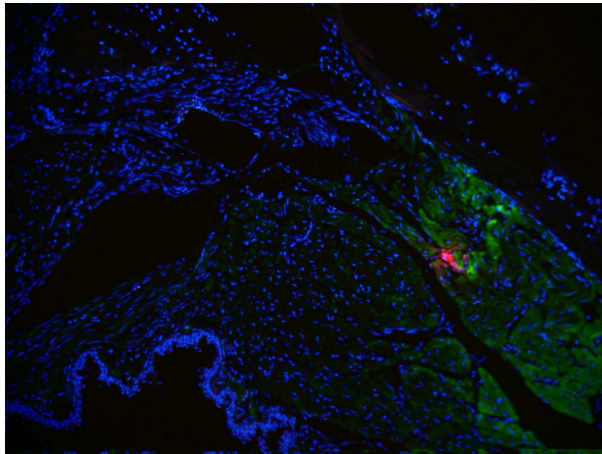


Abb. 9: Detektion von skelettalem Myosin mit MF 20 nach einem Tag (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

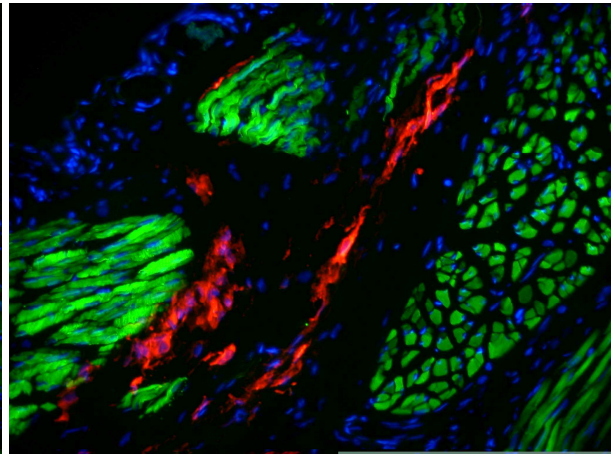


Abb. 10: Detektion von skelettalem Myosin mit MF 20 nach sieben Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

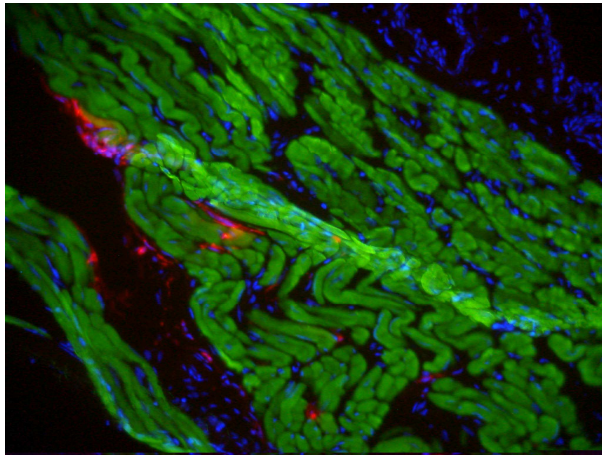


Abb. 11: Detektion von skelettalem Myosin mit MF 20 nach 15 Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

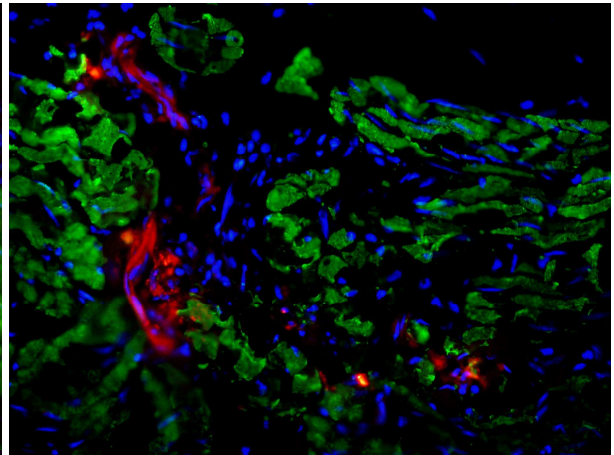


Abb. 12: Detektion der skelettalen Myosinkette mit MY 32 nach einem Tag (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

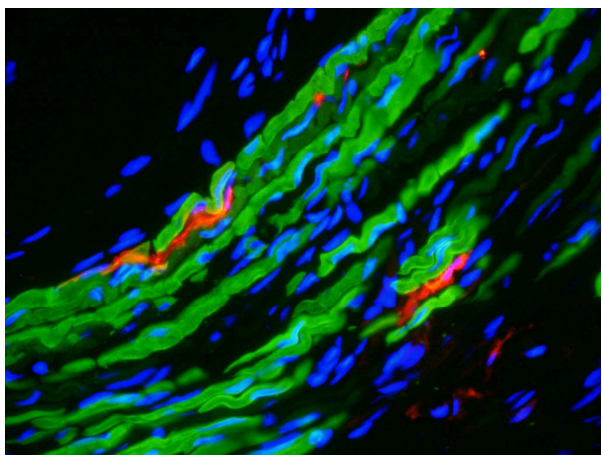


Abb. 13: Detektion der skelettalen Myosinkette mit MY 32 nach sieben Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

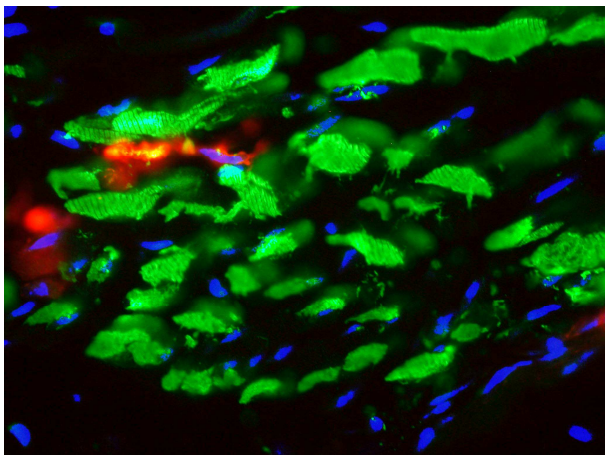
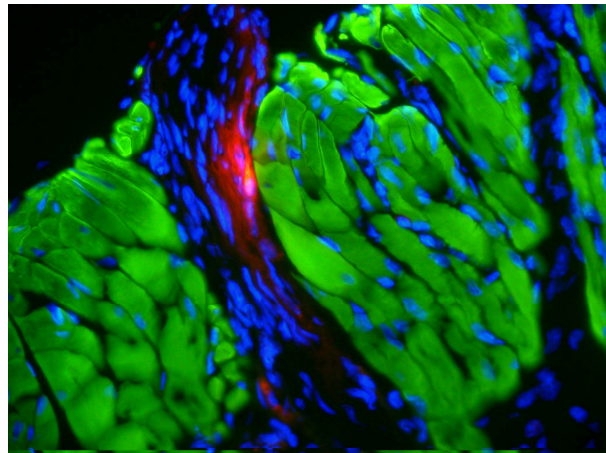


Abb. 14: Detektion der skelettalen Myosinkette mit MY 32 nach 15 Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)



Nach 30 Tagen ist die Markierung der transplantierten Zellen in Abhängigkeit der verwendeten Antikörper sehr unterschiedlich. Sie zeigen in manchen Gewebeschnitten überhaupt keine Markierung mit skelettmuskelspezifischen Antikörpern. In diesen Schnitten liegen die transplantierten Zellen aber auch außerhalb der Muskulatur. Dies ist durch Unterschiede in der Kerndichte und im Aufbau des Gewebes zu erkennen, in dem die transplantierten Zellen in einigen Fällen liegen (Abb. 15). Wenn die Zellen



allerdings in der Muskulatur liegen, sind sie mit verschiedenen Antikörpern gegen Skelettmuskelproteine markierbar.

Abb. 15: Detektion von skelettalem Myosin mit MF 20 nach 30 Tagen (Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz)

Dabei ist die Markierung mit My32 nur sehr schwach (Abb. 16), wogegen die Markierung mit BM 747 deutlich zu erkennen ist (Abb. 17).

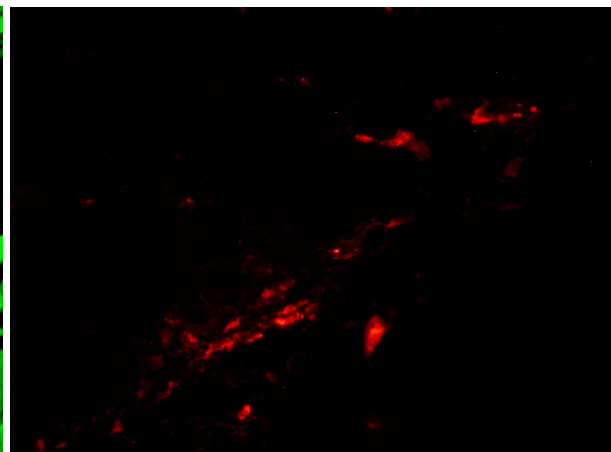
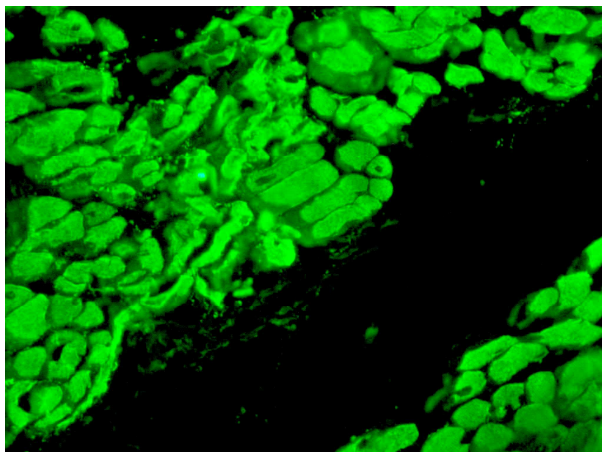
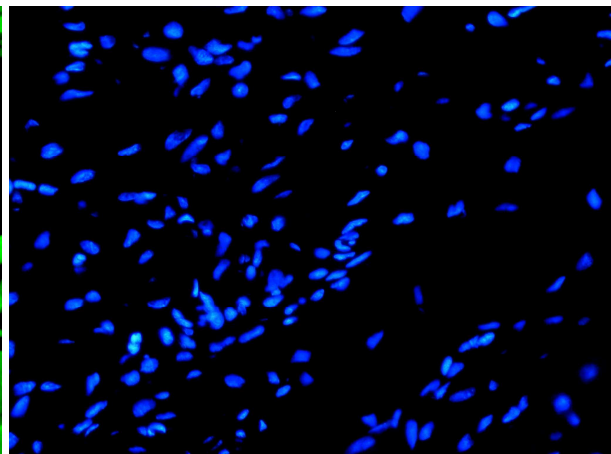
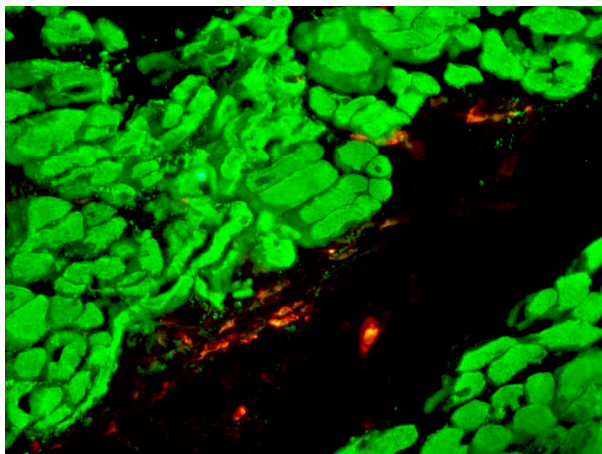


Abb. 16: Detektion der skelettalen Myosinkette mit MY 32 nach 30 Tagen (links Grünfluoreszenz des Antikörpers, rechts Rotfluoreszenz der transplantierten Zellen)

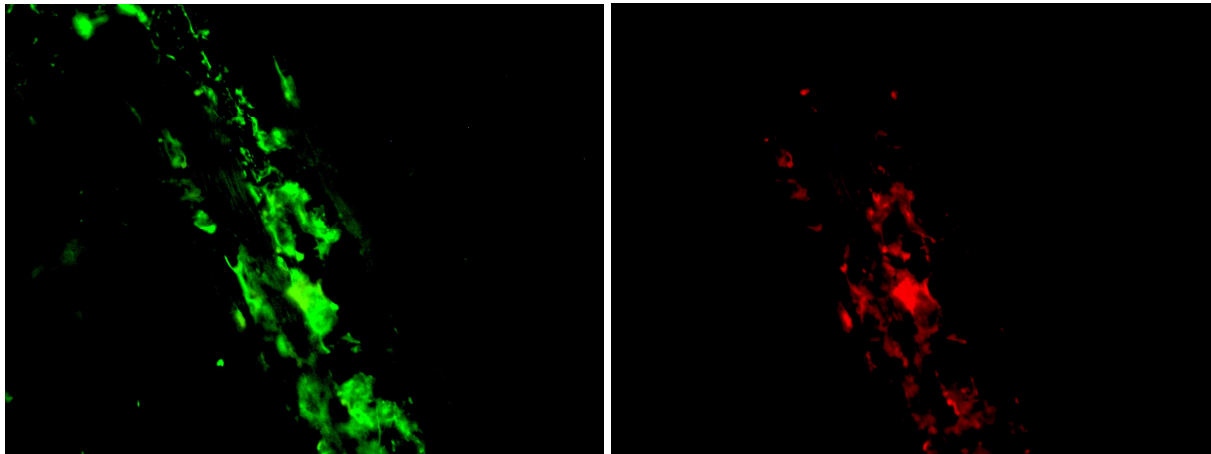
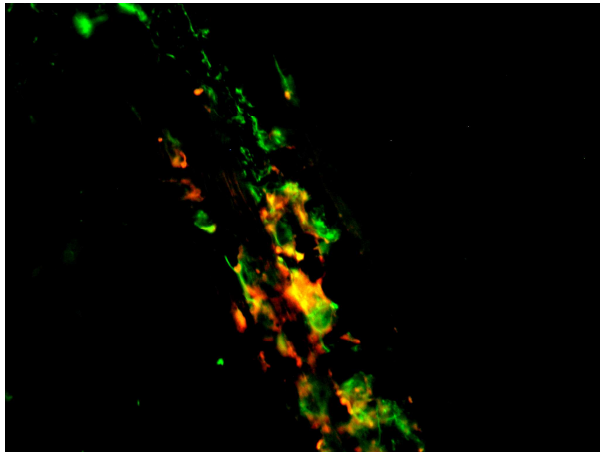


Abb. 17: Detektion von skelettalem Troponin I mit BM 747 nach 30 Tagen (oben Überlagerung von grüner und blauer Fluoreszenz; unten links Grünfluoreszenz des Antikörpers; unten rechts Rotfluoreszenz der markierten Zellen)

#### 4.4. Unspezifische Antigene

Während der gesamten Beobachtungszeit enthielten die transplantierten Zellen zumindest zu den untersuchten Zeitpunkten Desmin, welches durch die positive Markierung mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde. Dabei war aber die Intensität der Färbung zu den beobachteten Zeitpunkten sehr unterschiedlich und teilweise deutlich niedriger als bei der umgebenden Skelettmuskulatur (Abb. 18, 19, 20).

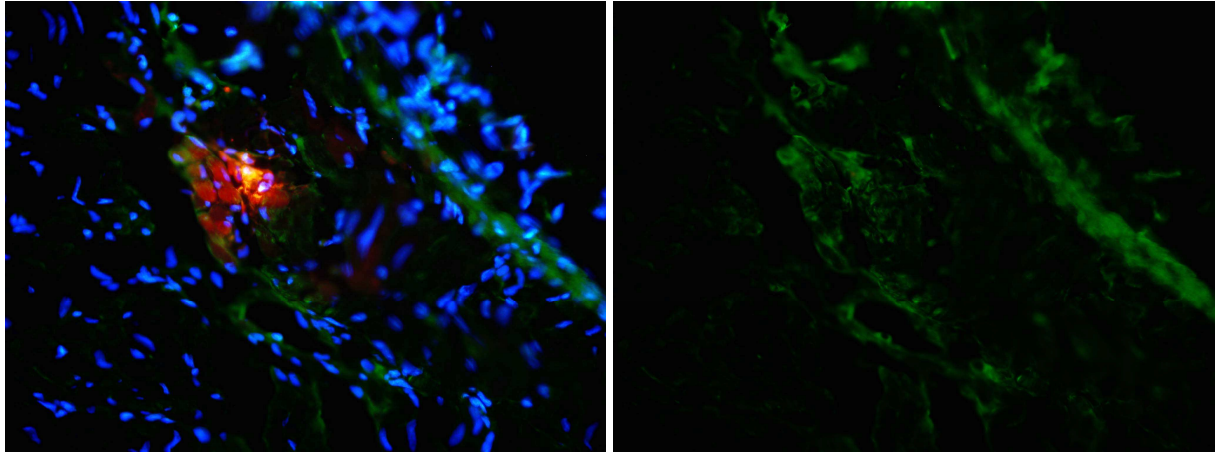


Abb. 18: Detektion von Desmin nach einem Tag (links Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz; rechts Grünfluoreszenz des Antikörpers)

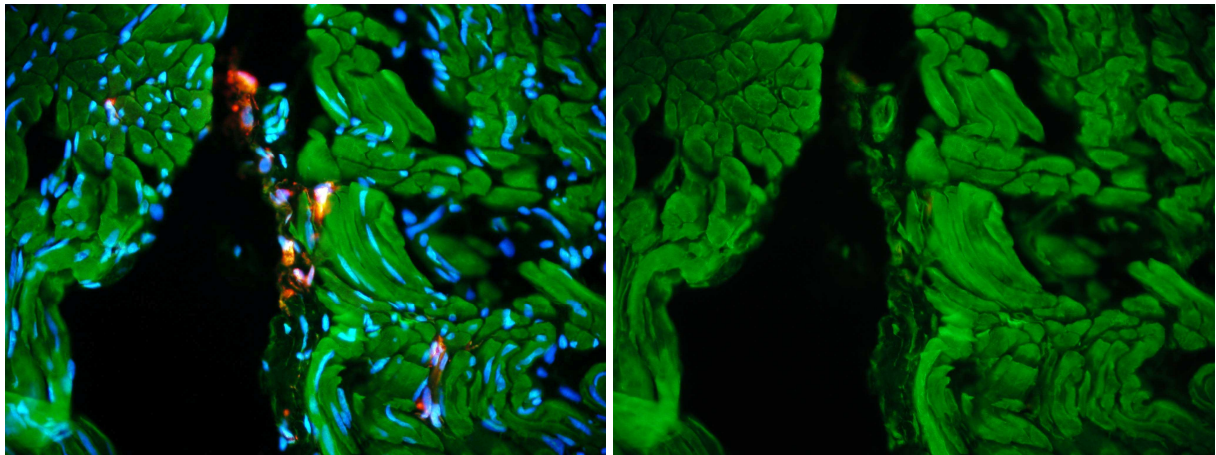


Abb. 19: Detektion von Desmin nach 15 Tagen (links Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz; rechts Grünfluoreszenz des Antikörpers)

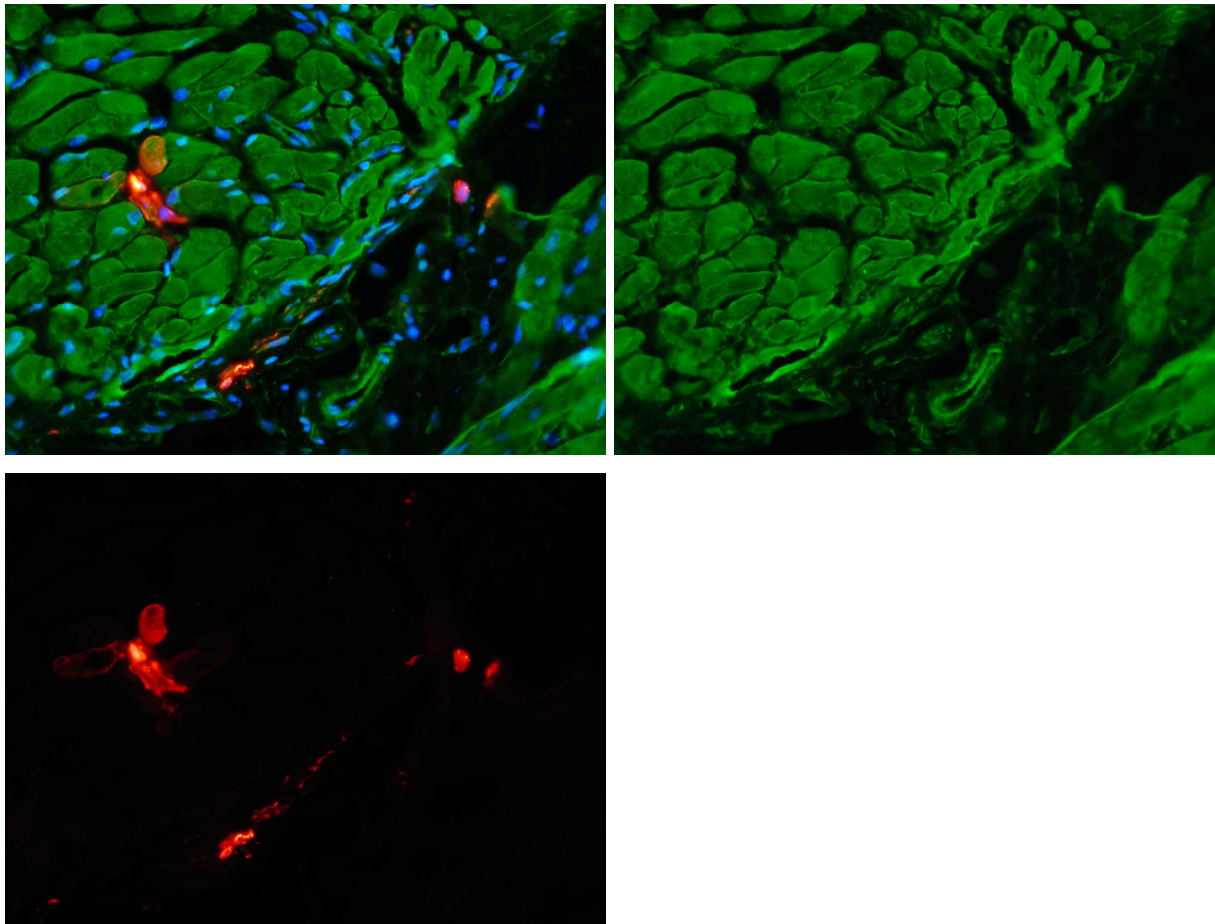


Abb. 20: Detektion von Desmin nach 30 Tagen (oben links Überlagerung von blauer, grüner und roter Fluoreszenz; oben rechts Grünfluoreszenz des Antikörpers; unten Rotfluoreszenz der Kardiomyozyten)

#### 4. 5. Kontrolle der Zellmarkierung

Zur Kontrolle der Zellmarkierung wurden die Zellen mit dem roten Farbstoff CM-DiI und dem Vital Kernfarbstoff Hoechst 33342 markiert. Der Kernfarbstoff eignete sich nicht für die Markierung der transplantierten Zellen, weil die Fluoreszenz nach 30 Tagen nicht mehr erkennbar war. Im regenerierenden Hinterbein konnte gezeigt werden, dass nach 15 Tagen die rote Markierung der Zellmembranen mit CM-DiI und die blaue Markierung der Zellkerne mit Hoechst 33342 übereinstimmen (Abbildung 21).



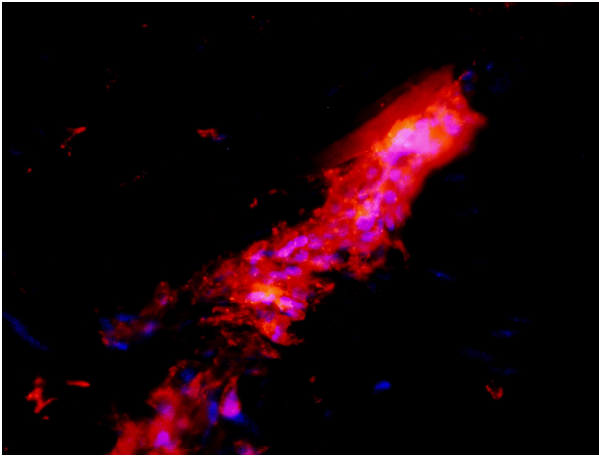


Abb. 21: Markierung von Herzmuskelzellen mit DiI und Hoechst Kernfarbstoff nach 15 Tagen (Überlagerung von blauer und roter Fluoreszenz)

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion des Versuchsaufbaus

Der Gegenstand der Arbeit war die Beobachtung von Herzmuskelzellen unter dem Einfluss regenerierenden Gewebes. Besondere Beachtung wurde dabei der Möglichkeit der Transdifferenzierung gewidmet. Der Grünliche Wassermolch (*Notophthalmus viridescens*) wurde ausgewählt, weil bekannt war, dass er aufgrund seiner regenerativen Fähigkeiten die Möglichkeit hat, undifferenzierte Blastemzellen aus differenzierten Zellen, wie z. B. aus Skelettmyotuben zu erzeugen. Um zeigen zu können, ob die transplantierten Herzmuskelzellen eine Transdifferenzierung durchmachen, wurden sie in regenerierende Hinterbeinstümpfe verpflanzt. Im Prinzip haben transplantierte Kardiomyozyten die Möglichkeit ihre Identität als Herzmuskelzellen zu erhalten oder sich durch Transdifferenzierung in ortstypische Zellen umzuwandeln. Aufgrund der zur Regeneration benötigten großen Masse an Skelettmuskelzellen im Hinterbein wurde angenommen, daß ein Großteil der transplantierten Herzmuskelzellen zu Skelettmuskelzellen transdifferenziert. Skelettmuskelzellen und Herzmuskelzellen lassen sich immunhistochemisch durch spezifische Antikörper gut voneinander unterscheiden. Des Weiteren lassen sich die Zellen in das Hinterbein des Molchs injizieren, ohne dass für die Zelltransplantation eine aufwändige Operation nötig wäre. Durch diese Vorüberlegungen war ein relativ einfacher Versuchsaufbau möglich.



Der Verlauf der Transdifferenzierung sollte durch eine immunhistochemische Untersuchung der transplantierten Herzmuskelzellen in bestimmten zeitlichen Abständen von einem Tag bis zu 30 Tagen nach der Transplantation dargestellt werden. Dabei wurden die Zellen auf Skelettmuskelantigene, Blastemzellantigene und Desmin untersucht. Blastemzellen sind eine dedifferenzierte und proliferative Zellpopulation im regenerierenden Stumpf. Desmin ist für Muskulatur im Allgemeinen typisch, kommt aber auch in anderen Geweben vor. Außer zur Proteinausstattung wurden auch Untersuchungen zur Proliferation und zur Apoptose durchgeführt. Als Kontrolle dienten Herzmuskelzellen, die in ungeschädigte Hinterbeine transplantiert wurden.

Die Herzmuskelzellen wurden fünf Tage nach der Amputation des Unterschenkels in den regenerierenden Stumpf transplantiert. Die erste immunhistochemische Untersuchung nach 24 Stunden sollte zeigen, wie schnell sich der Einfluss des umgebenden geschädigten Gewebes auf die Herzmuskelzellen auswirkt. Der Endpunkt bei 30 Tagen entspricht dem mittleren Fingerstadium, in dem die meisten Zellen des Regenerats differenzierte Zellen sind.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

Nur 24 Stunden nach der Transplantation exprimieren die Herzmuskelzellen blastemzellspezifische Antigene, die durch den Antikörper 22/18 nachgewiesen werden konnten (Abb. 4). Sie liegen also nicht nur im regenerierenden Gewebe ohne Kontakte zu dem umgebenden Milieu, sondern werden von diesem beeinflusst und zu einer Veränderung der intrazellulären Proteine gebracht, die nur in dem regenerierenden Hinterbein beobachtet werden kann. Ebenfalls 24 Stunden nach der Transplantation besitzen die Zellen kein herzmuskelspezifisches Troponin T mehr. Die Reaktion auf den Antikörper BM 750 ist negativ (Abb.1). Desmin ist jedoch noch deutlich nachweisbar. Innerhalb des ersten Tages im Kontakt mit dem regenerierenden Stumpf machen die transplantierten Zellen also eine rasante Entwicklung durch. Die hochspezialisierten Herzmuskelzellen verlieren in sehr kurzer Zeit ihre spezifische Proteinausstattung und entwickeln sich zu undifferenzierten teilungsaktiven Blastemzellen. Der Verlust der spezifischen Proteinausstattung und die Entwicklung zu einer proliferativen Zellart, aus der sich verschiedene Zelltypen entwickeln können, sprechen hier für eine Dedifferenzierung. Die Blastemzellen bilden einen Zellpool, der durch Proliferation Strukturen neu aufbaut, die bei der Amputation verloren gegangen waren. Die transplantierten Zellen nehmen durch die Dedifferenzierung an der Regeneration des Hinterbeins teil, obwohl sie nicht zum umgebenden Gewebe gehören und dadurch nicht selbst durch die Schädigung

betroffen waren. Der Anstoß zur Dedifferenzierung muss also von Stoffen kommen, die entweder sehr lange im Gewebe verbleiben oder im regenerierenden Stumpf auch nach der Schädigung weiter synthetisiert werden. Dazu passt auch, dass die Dedifferenzierung und die Bildung der Blastemzellen über einen Zeitraum von 20 Tagen ablaufen und sich in das gesunde Gewebe hinein fortsetzen. Die Entwicklung der Herzmuskelzellen zu Blastemzellen ist jedoch aufgrund des vorhandenen Desmins entweder noch nicht vollständig, oder der Abbau des vom Antikörper erkannten Antigens bei Desmin benötigt mehr Zeit als bei Troponin T. Auch ist denkbar, dass Herzmuskelzellen sich nicht vollständig zu Blastemzellen umformen sondern partiell bis zu einem Stadium dedifferenzieren, das es ihnen ermöglicht sich zu Skelettmuskelzellen zu entwickeln. Die transplantierten Zellen weisen jedoch eine viel schwächere Desmin-Immunfluoreszenz auf als normale Muskelzellen, welche durch die zur Erhaltung der Zellstruktur benötigte Menge an Desmin in den Zellen erklärt werden. Im ungeschädigten Hinterbein und in der Zellkultur bleibt herzmuskelspezifisches Troponin T dagegen noch nach zwei Wochen und auch noch nach 30 Tagen mit BM 750 nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Veränderung in der Proteinausstattung der Zellen durch den Einfluss des umgebenden dedifferenzierenden Gewebes verursacht wird und nicht durch die Verweildauer in der Petrischale.

Nach sieben Tagen ist die Reaktion auf 22/18 etwas schwächer, nach 15 Tagen nicht mehr nachweisbar. Es ist nicht geklärt, ob sich alle Blastemzellen nur 15 Tage in diesem Stadium befinden oder ob nur die transplantierten Zellen nach 15 Tagen ihren Blastemzellcharakter verlieren. Aufgrund des vorher durchgeführten Preplating und der immunhistochemischen Untersuchung der Zellen in der Zellkultur kann davon ausgegangen werden, daß fast ausschließlich adulte Herzmuskelzellen zu Blastemzellen dedifferenziert sind. Im Gegensatz zu der Arbeit von J. I. Morrison et al (22) bildet sich bei diesem Versuch das beobachtete Blastemgewebe also nicht aus Sattelitzellen.

Die transplantierten Zellen zeigen 15 Tage nach der Transplantation noch keine skelettmuskelspezifischen Proteine, unterliegen allerdings auch nicht der Apoptose. Der Antikörper gegen Desmin reagiert weiterhin schwach positiv. Ob es sich noch um das Desmin aus der Zeit als Herzmuskelzelle handelt, oder um bereits neu synthetisiertes Desmin bei Zellen, die auf dem Weg zu Skelettmuskelzellen sind, kann nicht unterschieden werden. Die Intensität der Färbung ist jedoch sehr unterschiedlich, so dass auch eine zeitliche Überlappung von Abbau und Neusynthese des Desmins möglich ist, da Desmin bei der normalen Muskelentwicklung vor Troponin und Myosin auftritt (38, 11). Einige Zellen liegen dabei einzeln zwischen Skelettmuskelfasern und sind unter dem Mikroskop ohne

Fluoreszenzmarkierung nur durch die fehlende Querstreifung vom umgebenden Gewebe zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu liegen in anderen regenerierenden Stümpfen die transplantierten Zellen kompakt oder einzeln in Gewebeabschnitten, in denen die umgebenden Zellen nicht positiv auf skelettmuskelspezifische Antikörper reagieren. Nach 15 Tagen ist also eine morphologisch erkennbare Eingliederung in das umgebende Gewebe erfolgt, ohne dass bereits Differenzierungsvorgänge in Form von spezifischer Skelettmuskelproteinbiosynthese erkennbar wären. Bemerkenswert ist dabei, dass die umgebende Skelettmuskulatur zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine sehr intensive Färbung für Antikörper gegen Skelettmuskelproteine aufweist. Da die Herzmuskelzellen erst fünf Tage nach der Schädigung des Stumpfes implantiert wurden, kann die Dedifferenzierung der Skelettmuskulatur zu den beobachteten Zeitpunkten schon stattgefunden haben. Ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass zwar einen Tag nach der Transplantation der Herzmuskelzellen, also sechs Tage nach der Schädigung, der gegen die schwere Myosinkette gerichtete Antikörper My 32 bei den Muskelzellen des Stumpfes schon gut detektiert. Der Antikörper gegen sarkomere Strukturen, MF 20, ruft jedoch so gut wie keine Fluoreszenzen hervor. Die Proteine für die Skelettmuskelzellen sind also noch vorhanden oder schon neu gebildet, während die hochspezialisierten Sarkomerstrukturen nicht nachgewiesen werden können. Diese müssen auch vor einem Abbau der Skelettmuskelproteine aufgelöst werden und können erst mit den Skelettmuskelproteinen neu gebildet werden. Nach der Einteilung der Regenerationsstadien beim Molch nach Iten und Bryant (15) ist hier am ehesten von einer beginnenden Dedifferenzierung der Skelettmuskulatur auszugehen. Eine andere Möglichkeit ist, dass die umgebende Skelettmuskulatur nicht an der Regeneration beteiligt ist, weil sie zu weit von der Schädigungsstelle entfernt ist. Dann wäre aber auch die Dedifferenzierung der transplantierten Zellen nicht auf die Schädigung, sondern auf eine Reaktion auf das umgebende Gewebe zurückzuführen. Die Skelettmuskulatur kann aber auch resistenter gegenüber den Stoffen sein, die die Dedifferenzierung hervorrufen, als die ortsfremden Herzmuskelzellen. Eine Reaktion der transplantierten Zellen auf das umgebende Gewebe kann dabei aber ausgeschlossen werden, weil Herzmuskelzellen, die in einen ungeschädigten Stumpf transplantiert wurden, ihre herzmuskelspezifische Proteinausstattung beibehalten.

15 Tage später, am 30. Tag nach der Transplantation, sind die unterschiedlichen Wege in der Redifferenzierung noch deutlicher zu erkennen. Auch jetzt gibt es transplantierte Zellen, die in Gewebestücken liegen, welche durch ihre Morphologie und ihre immunhistochemische Färbung deutlich als nicht zur Skelettmuskulatur gehörig identifiziert werden können. Um diese Gewebe mit den enthaltenen Zellen genauer untersuchen zu können, würde man

Antikörper benötigen, die beim Molch zwischen Nervengewebe, Bindegewebe, Gefäßen, Sehnen und anderen Strukturen unterscheiden. Daraus könnten sich weitere Hinweise auf eine erfolgte Transdifferenzierung ergeben. Allerdings gibt es für diese Gewebe nur wenige hochspezifische Antikörper, deren Unterscheidungspotential beim Molch meist nicht gesichert ist. Die Testung dieser Antikörper auf ihre Unterscheidungsfähigkeit im Molchgewebe und eine Charakterisierung sämtlicher Zelltypen, in die die transplantierten Zellen differenzieren können, ist eine Aufgabe für weitere Untersuchungen. Es sind aber auch Zellen zu finden, die den erwarteten Differenzierungsweg in Richtung der Skelettmuskulatur eingeschlagen haben. Sie liegen entweder neben oder direkt in der neu gebildeten Skelettmuskulatur. Positive Reaktionen für Skelettmuskelproteine konnten dabei für die Antikörper My 32 und BM 747 gefunden werden. My 32 detektiert die schwere Myosinkette von Skelettmuskelzellen und BM 747 detektiert skelettales Troponin I. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz bei der Detektion von skelettalem Troponin I relativ stark, die Intensität der Fluoreszenz bei der Detektion der schweren Myosinkette jedoch geringer als im umgebenden Gewebe. Bei allen beobachteten Schnitten ist die Fluoreszenz aber deutlich intensiver als in den Negativkontrollen. Die transplantierten Herzmuskelzellen enthalten demzufolge sowohl Myosin als auch skelettales Troponin T, allerdings nicht in so großen Mengen wie die umgebenden Skelettmuskelzellen. Die Redifferenzierung der Zellen ist also noch nicht abgeschlossen. Auch die fehlende Markierung durch MF 20 und damit das Fehlen von sarkomeren Strukturen, ist ein Hinweis auf das frühe Stadium der Skelettmuskelentwicklung. Dennoch muss es sich bei den transplantierten Zellen nach 30 Tagen um Skelettmuskelzellen handeln, da in keinem anderen Gewebe diese Form der schweren Myosinkette oder skelettales Troponin T vorkommen.

Untersuchungen zur Regeneration beim Molch wurden 1972 von R. W. Reyer et al. und 1999 von M. Ito et al. vorgenommen. Von beiden Arbeitsgruppen wurden dabei Iriszellen verwendet, die bei einer Verpflanzung in regenerierende Beine Linsen bildeten. Die Iriszellen zeigten aber keine Tendenz zur Teilnahme an der Regeneration des geschädigten Beines. Es ist also fraglich ob alle adulten Zellen des Molches die Fähigkeit besitzen in das zur Regeneration benötigte Gewebe zu transdifferenzieren. Vielmehr scheinen bei einigen Geweben festgelegte Regenerationsprogramme zu existieren, die nur die Bildung eines bestimmten Organs zulassen (33, 16). Zwar sind im Herzen selbst bei der Regeneration keine typischen Blastemzellen nachweisbar, jedoch finden sich undifferenzierte Zellen, die Reste sarkomerer Strukturen aufweisen. Wahrscheinlich bildet sich funktionelles neues Herzgewebe aus derartigen undifferenzierten Vorläuferzellen und aus differenzierten Herzmuskelzellen,

die beim Molch auch noch eine residuale Teilungsfähigkeit besitzen, welche auch in der Zellkultur beobachtet werden kann. Im Gegensatz zum Hinterbein werden im Herzen eine deutlich geringere Anzahl unterschiedlicher Zelltypen benötigt. Selbst bei Lebewesen, die die Möglichkeit zur Regeneration durch Transdifferenzierung haben, hat sich dieser Mechanismus in der Evolution nicht immer zur Heilung bei einer Verletzung durchgesetzt. Dies könnte ein Hinweis auf die Risiken der Regeneration durch die Dedifferenzierung und Proliferation adulter Zellen sein. Zum einen geht anfangs noch mehr funktionelles Gewebe verloren, was beim Beispiel des Herzens zum Versagen des Herzmuskels und damit zum Tod des Tieres führen kann. Zum anderen sind die Blastemzellen ein stark proliferierender Zellverband. Adulte Zellen, die schon längere Zeit eine hohe Stoffwechselrate hatten und verschiedenen Noxen ausgesetzt waren könnten Schäden in ihrer DNS aufweisen und im Verlauf der Transdifferenzierung zu Tumorzellen mit einem sehr hohen proliferativen Potential entarten. Dennoch wird auch bei anderen Arten die Regeneration aus adultem Gewebe zur Heilung verletzter lebenswichtiger Organe benutzt, so zum Beispiel beim Zebrafisch zur Regeneration des Herzens (31) oder der Flossen, wobei ebenfalls ein Blastemgewebe aufgebaut wird (30).

Die Gleichförmigkeit, mit der die Transdifferenzierung und die Regeneration unabhängig von den verwendeten Zellen stattfinden, lässt an ein festgelegtes genetisches Programm denken (8). Die Suche nach dem Auslöser für dieses Programm wäre nun eine dringende Aufgabe um untersuchen zu können ob sich damit ähnliche Phänomene bei anderen Tierarten oder sogar beim Menschen auslösen lassen. Die Induktion der Regeneration durch Transdifferenzierung würde neue Therapieoptionen gerade bei kaum proliferativen Geweben wie Nervengewebe oder Herzmuskulatur ermöglichen. Dabei kann zumindest auf ein geringes proliferatives Potential auch bei menschlichen Herzmuskelzellen zurückgegriffen werden (27).

McGann et al ist bereits einen Schritt in diese Richtung gegangen. Durch die Behandlung von Mausmyotuben in Zellkultur mit homogenisierten Regenerationsgebieten von *Notophthalmus viridescens* konnte bei 18% der Myotuben der Beginn der S-Phase durch Aufnahme von BrdU in den Zellkern nachgewiesen werden (21). Ob diese Zahl an Myotuben für eine effektive Regeneration ausreicht und ob das Experiment auch auf andere Säugerzellen übertragbar ist konnte noch nicht gezeigt werden. Die genetischen Voraussetzungen für eine Regeneration scheinen auch bei Wirbeltieren vorhanden zu sein, da beim grünlichen Wassermolch teilweise Gene aktiviert werden die auch bei anderen Spezies vorkommen (36). Allerdings unterscheiden sich die Proteine in ihrer Funktion stark von Spezies zu Spezies. So

finden sich die Komplementfaktoren 3 und 5 nur im regenerierenden und nicht im ungeschädigten Hinterbein was einen Einfluss auf die Regeneration vermuten lässt (17, 13) und Thrombin reguliert den Zellzyklus bei der Regeneration der Linse (14). Beim Menschen hingegen sind die Komplementfaktoren ein Teil der Immunabwehr und Thrombin ein Teil des Blutgerinnungssystems.

## **6. Zusammenfassung**

Zusammenfassend konnte anhand der Proteinausstattung und der Lokalisation der beobachteten Herzmuskelzellen gezeigt werden, wie sie unter dem Einfluss des geschädigten Gewebes, und zwar nur bei geschädigtem Gewebe, zuerst zu einer zumindest multipotenten Zellart, den Blastemzellen, dedifferenzieren, im Verband des Blastemgewebes proliferieren und schließlich zu Skelettmuskelzellen und wahrscheinlich noch zu anderen Zellarten redifferenzieren. Die Umwandlung der Herzmuskelzellen zu Skelettmuskelzellen entspricht dabei einer Transdifferenzierung. Es ist nicht davon auszugehen, dass sich die Regeneration durch Stammzellen aus dem Herzen erklären lässt, da die transplantierten Zellen zu über 95% aus differenzierten Herzmuskelzellen bestanden und bei allen transplantierten Zellen Dedifferenzierungs- und Redifferenzierungsvorgänge zu beobachten waren.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1 Kiyokazu Agata, Yumi Saito, Elizabeth Nakajima (2007): Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis; *Develop. Growth Differ.* 49, 73–78
- 2 Bruce Alberts, Dennis Bay, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson (1983): *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, New York, London
- 3 Piero Anversa, Bernardo Nadal-Ginard (2002): Myocyte renewal and ventricular remodelling; *Nature* 415, 240-243
- 4 Antonio P. Beltrami, Konrad Urbanek, Jan Kajstura, Shao-Minyan, Nicoletta Finato, Rossana Bussani, Bernardo Nadal-Ginard, Furio Silvestri, Annarosa Leri, C. Alberto Beltrami, Piero Anversa (2001): Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction; *N. Engl. J. Med.* 344, 1750-1757
- 5 Mónica Bettencourt-Dias, Sybille Mittnacht, Jeremy P. Brockes (2003): Heterogeneous proliferative potential in regenerative adult newt cardiomyocytes, *Journal of Cell Science* 116, 4001 – 4009
- 6 Jeremy P. Brockes (1997): Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure, *Science* 276, 81-87
- 7 Jeremy Brockes, Anoop Kumar (2005): Newts; *Curr. Biol.* 15, 42-44
- 8 Jeremy P. Brockes, Anoop Kumar, Christiana P. Velloso (2001): Regeneration as an evolutionary variable; *J. Anat.* 199, 3-12
- 9 Mindy K. Call, Matthew W. Grogg, Panagiotis A. Tsonis (2005): Eye on Regeneration; *The Anatomical Record* 287B, 42-48
- 10 Sophie B. P. Chargé, Michael A. Rudnicki (2004): Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration; *Physiol. Rev.* 84, 209-238
- 11 M.L. Costa, R. Escaleira, A. Cataldo, F. Oliveira and C.S. Mermelstein (2004): Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein; *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1819-1830
- 12 Joshua D. Dowell, Loren J. Field, Kishore B.S. Pasumarthi (2003): Cell cycle regulation to repair the infarcted myocardium; *Heart Fail. Rev.* 8, 293-303
- 13 James W. Godwin, Jeremy P. Brockes (2006): Regeneration, tissue injury and the immune response; *J. Anat.* 209, 423–432



- 14 Yutaka Imokawa, Andra Simon, Jeremy P. Brockes (2004): A critical role for thrombin in vertebrate lens regeneration; *Biol. Sci.* 359, 765-776
- 15 Laurie E. Iten, Susan V. Bryant (1973): Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, Rate, and Stages; *Wilhelm Roux Archiv* 173, 263-282
- 16 Mayumi Ito, Toshinori Hayaschi, Atsushi Kuroiwa, Mitsumasa Okamoto (1999): Lens formation by pigmented epithelial cell reaggregate from dorsal iris implanted into limb blastema in the adult newt; *Developmental Growth Differentiation* 41, 429-440
- 17 Yuko Kimura, Mayur Madhavan, Mindy K. Call, William Santiago, Panagiotis A. Tsonis, John D. Lambris, Katia Del Rio-Tsonis (2003): Expression of Complement 3 and Complement 5 in Newt Limb and Lens Regeneration; *The Journal of Immunology* 170, 2331–2339
- 18 Anoop Kumar, Cristiana P. Velloso, Yutaka Imokawa, and Jeremy P. Brockes (2000): Plasticity of retrovirus-labelled myotubes in the newt limb regeneration blastema; *Developmental Biology* 218, 125–136
- 19 Donald C. Lo, Francesca Allen, Jeremy P. Brockes (1993): Reversal of muscle differentiation during urodele limb regeneration; *Developmental Biology* 90, 7230-7234
- 20 Georg Löffler, Petro E. Petrides (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*; siebente Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1031-1051, 1121-1157
- 21 Christopher J. McGann, Shannon J. Odelberg, Mark T. Keating (2001): Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract; *Cell Biology* 98, 13699-13704
- 22 Jamie I. Morrison, Sara Lööf, Pingping He, Andrés Simon (2006): Salamander limb regeneration involves the activation of a multipotent skeletal muscle satellite cell population; *The Journal of Cell Biology* 172, 433–440
- 23 Upendra Nongthomba, Sam Clark, Mark Cummins, Maqsood Ansari, Meg Stark and John C. Sparrow (2003): Troponin I is required for myofibrillogenesis and sarcomere formation in *Drosophila* flight muscle, *Journal of Cell Science* 117, 1795-1805
- 24 Martin J. Oberholzer (2001): *Pathologie verstehen*; 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 65-79

- 25 John O. Oberpriller, Jean C. Oberpriller, Donald G. Matz, Mark H. Soonpaa (1995): Stimulation of proliferative events in the adult amphibian cardiac myocyte; *Annals of the New York Academy of Sciences* 752, 30-46
- 26 Shannon J. Odelberg (2005): Cellular plasticity in vertebrate regeneration; *The anatomical record* 287B, 25–35
- 27 D. Orlic (2005): BM stem cells and cardiac repair: where do we stand in 2004?; *Cytotherapy* 7, 3 - 15
- 28 Kishore B.S. Pasumarthi, Loren J. Field (2002): Cardiomyocyte cell cycle regulation; *Circulation Research* 90, 1044-1054
- 29 Denise Paulin, Zhenlin Li (2004): Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle; *Experimental Cell Research* 301, 1-7
- 30 Kenneth D. Poss, Mark T. Keating, Alex Nechiporuk (2003): Tales of regeneration in Zebrafish; *Developmental Dynamics* 226, 202-210
- 31 Kenneth D. Poss, Lindsay G. Wilson, Mark T. Keating (2002): Heart regeneration in Zebrafish; *Science* 298, 2188-2190
- 32 Leslie Reinlib, Loren Field (2000): Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? A workshop of the national heart, lung, and blood institute; *Circulation* 101, 182-187
- 33 Randall W. Reyer, Robert A. Woolfitt, Loraine T. Whitersty (1972): Stimulation of lens regeneration from the newt dorsal iris when implanted into the blastema of the regenerating limb; *Developmental Biology* 32, 258-281
- 34 Schiebler et al. (1999): *Anatomie* ; 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 29-34
- 35 Elly M. Tanaka (2003): Regeneration: If they can do it, why can't we?; *Cell* 113, 559–562
- 36 Sandy G. Vascotto, Shawn Beug, Richard A. Liversage, Catherine Tsilfidis (2005): Identification of cDNAs associated with late dedifferentiation in adult newt forelimb regeneration; *Developmental Dynamics* 233, 347–355
- 37 Christine J. Wong, Richard A. Liversage (2005): Limb developmental stages of the newt *Notophthalmus viridescens*; *Int. J. Dev. Biol.* 49, 375-389
- 38 Yassemi Capetanaki, Derek J. Milner, G. Weitzer (1997): Desmin muscle formation and maintenance: knockouts and consequences; *Cell Struct. Funct.* 22, 103-116

## 8. Anlagen

### Bilder

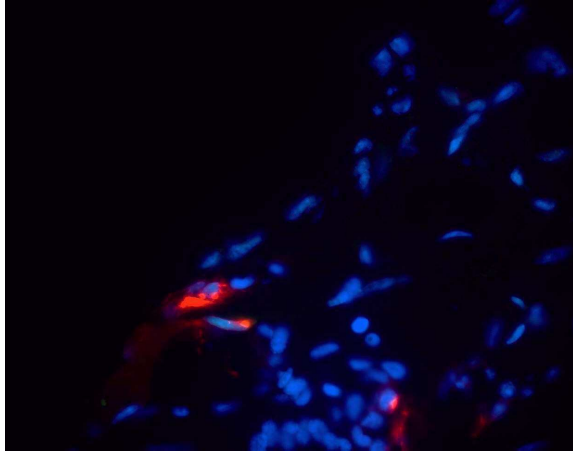


Abb. 1

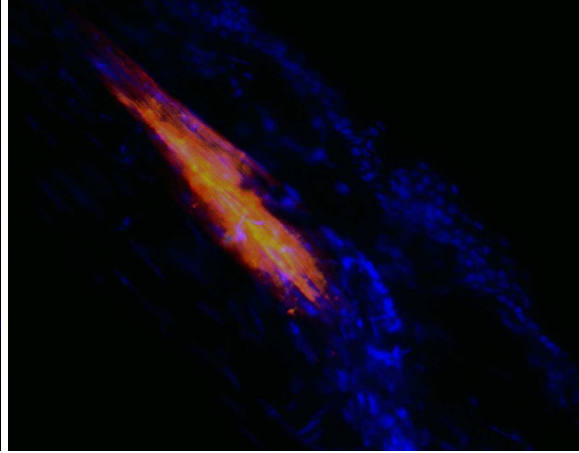


Abb. 2

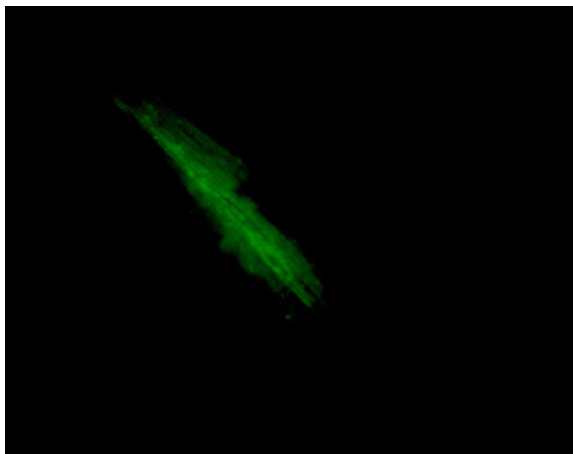


Abb. 3: ungeschädigtes Bein, Troponin T

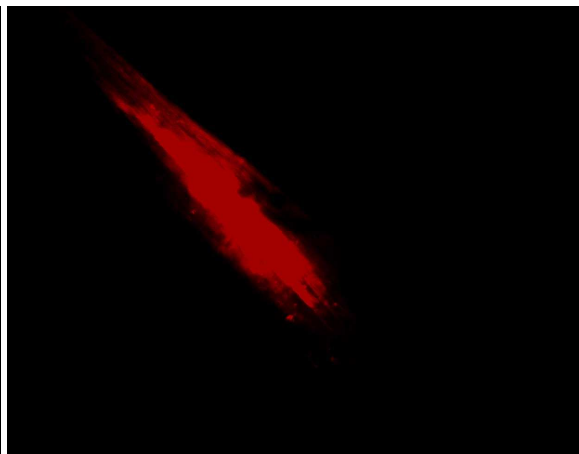


Abb. 4: ungeschädigtes Bein, transplantierte Zellen

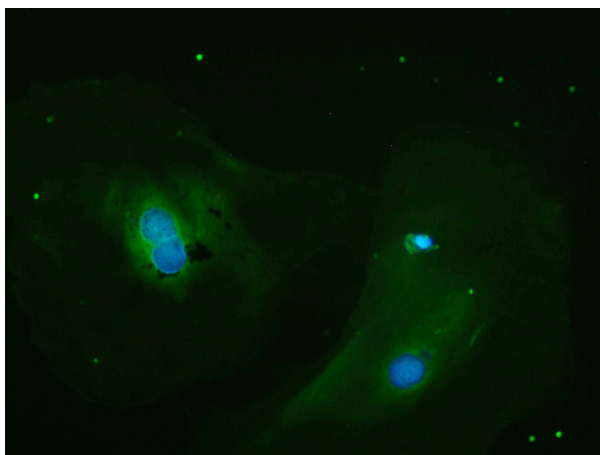


Abbildung 5

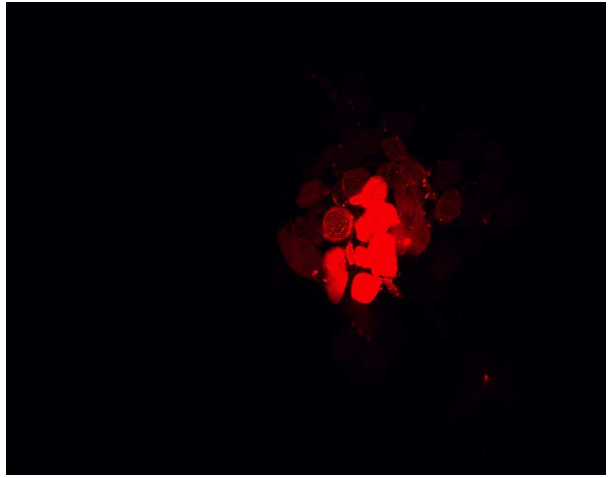
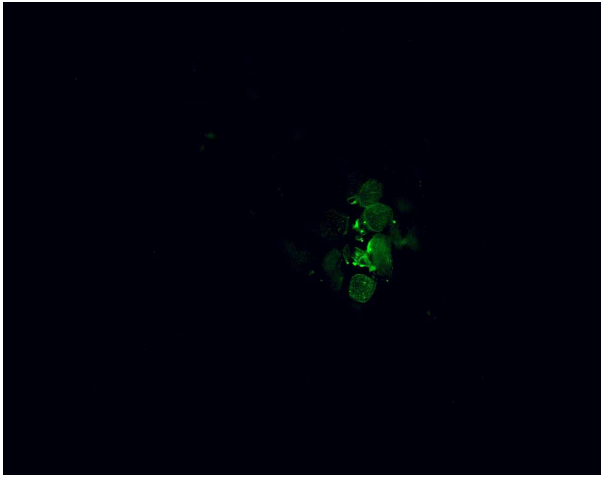
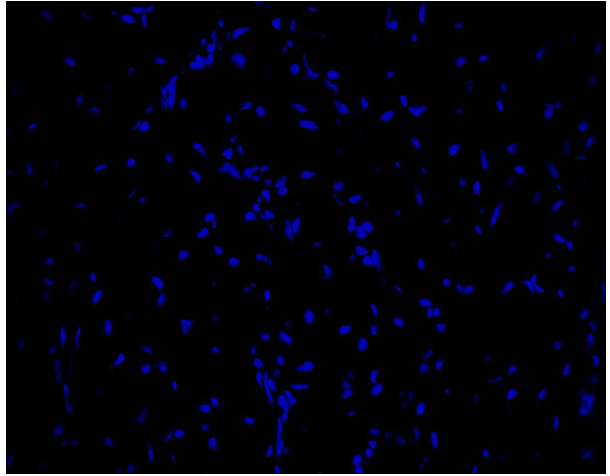
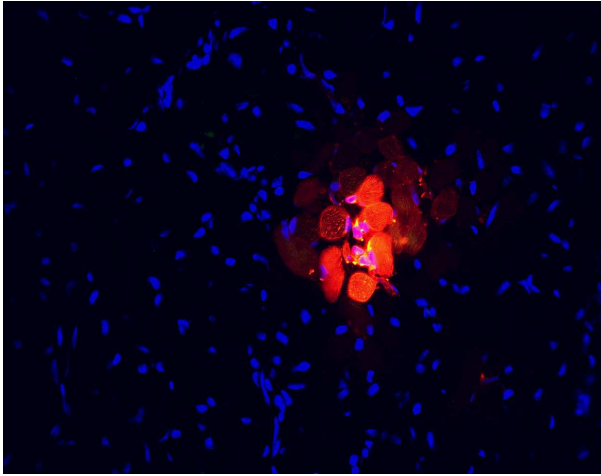
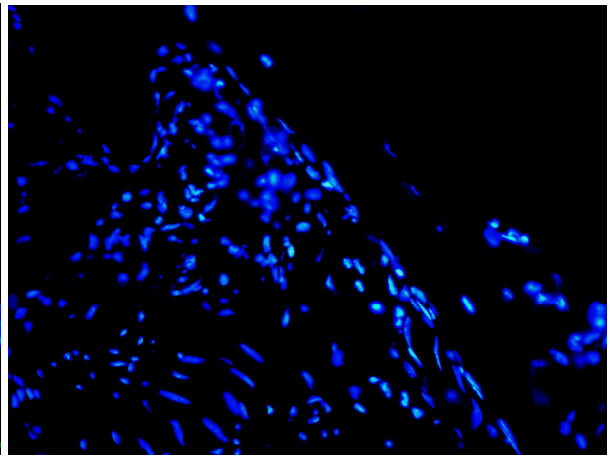
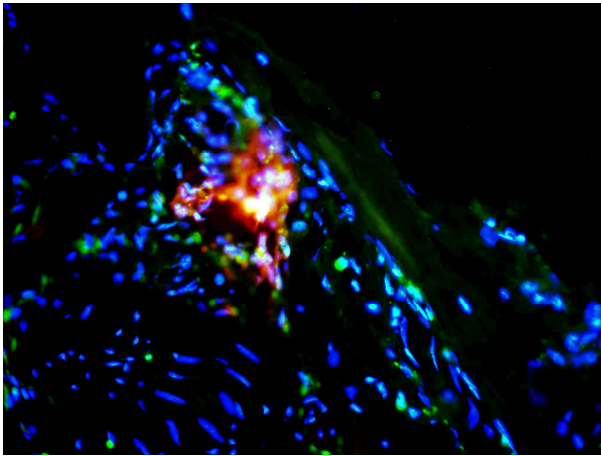


Abbildung 6



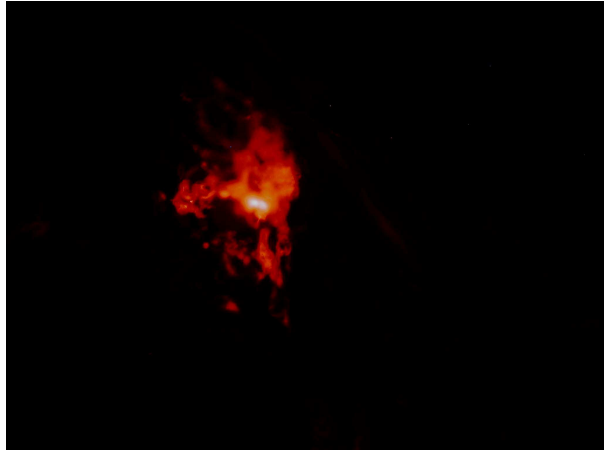
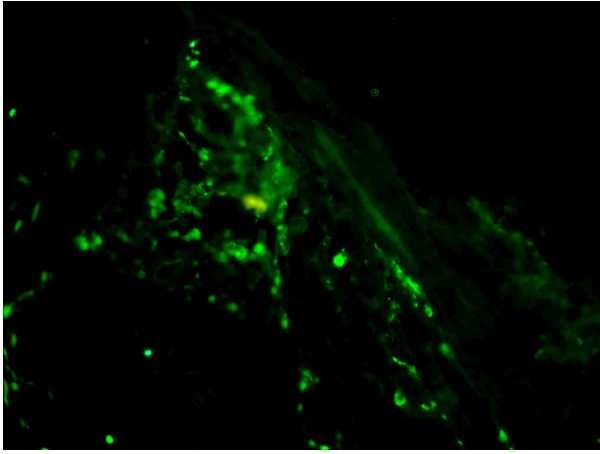


Abb. 7

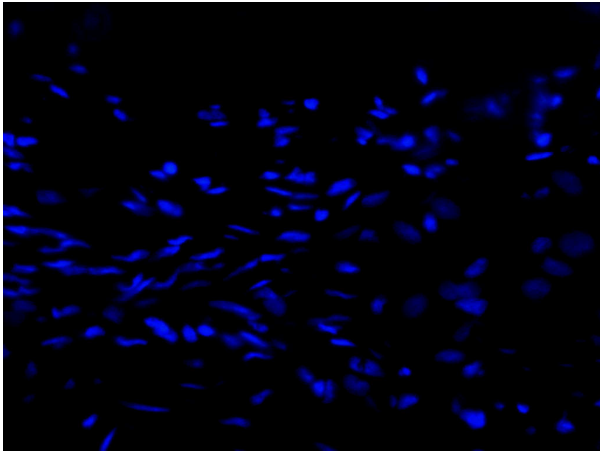
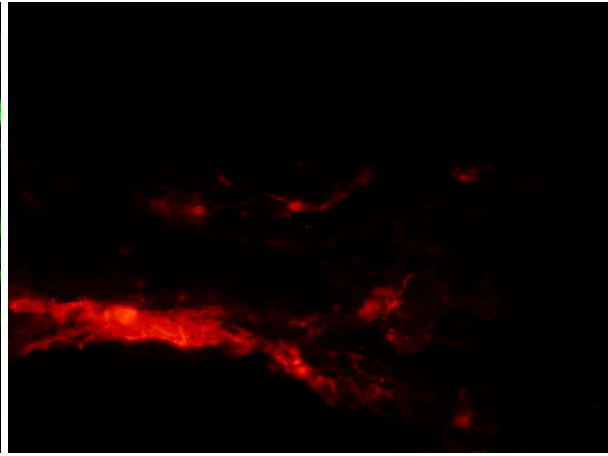
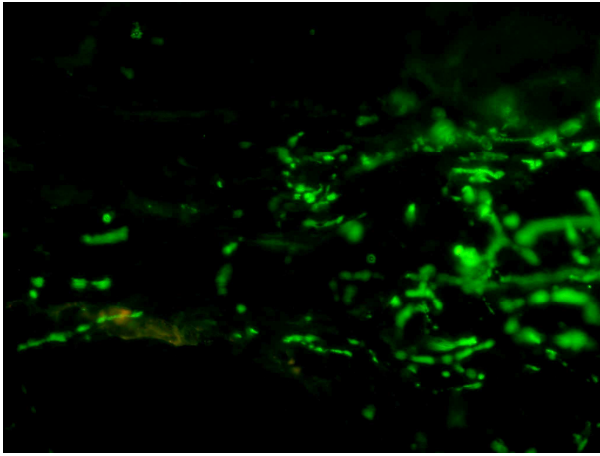


Abb. 8

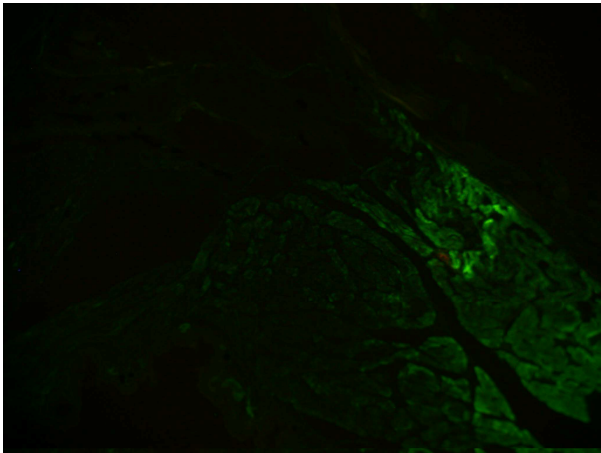
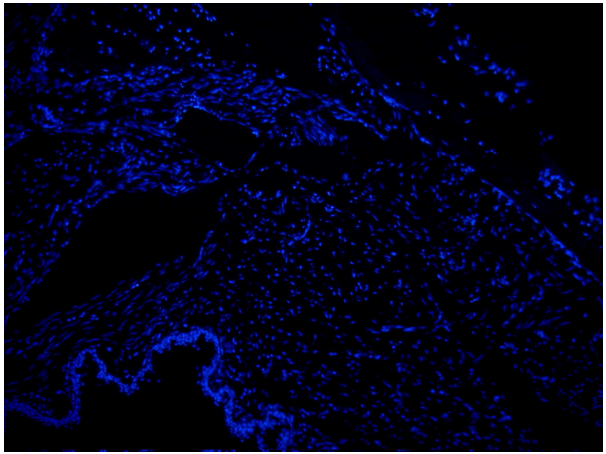
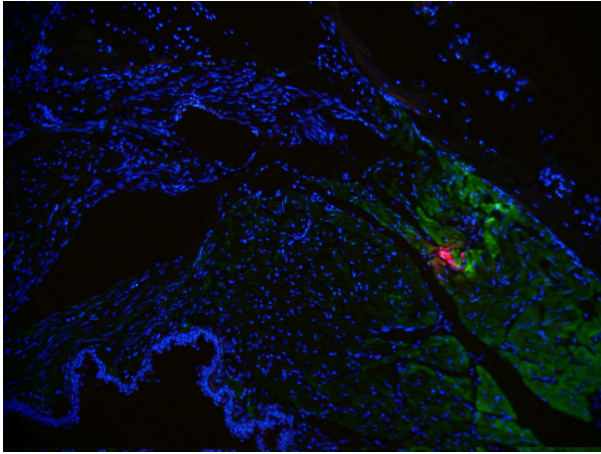
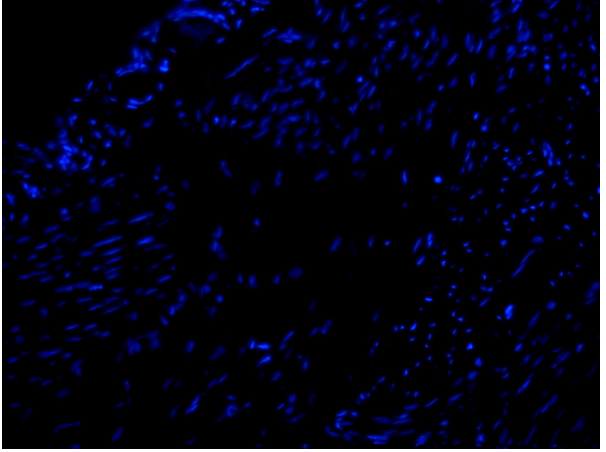
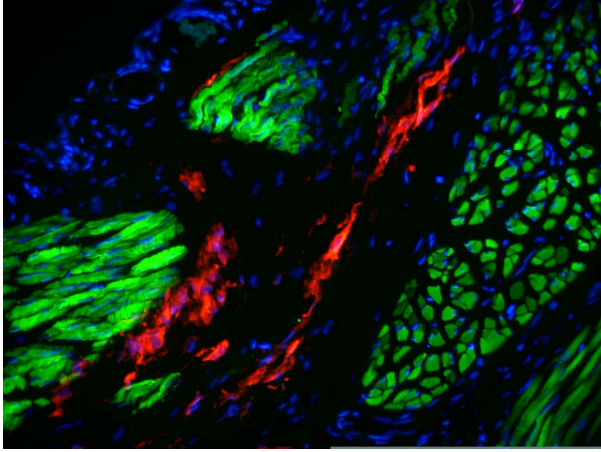


Abb. 9 1d MF20





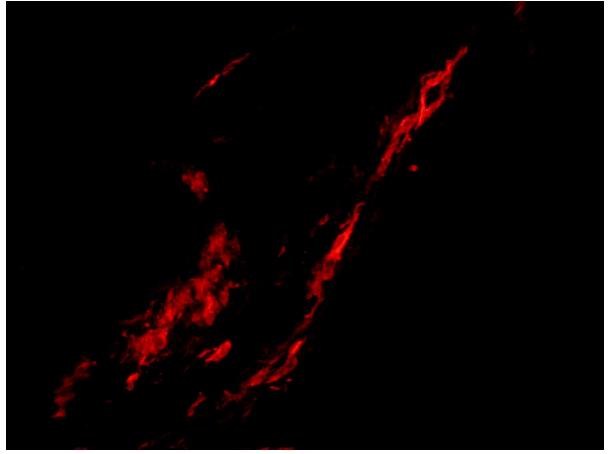
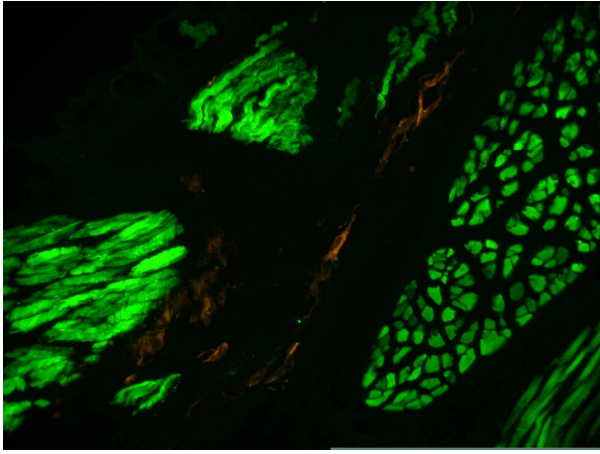


Abb. 10 7d MF20

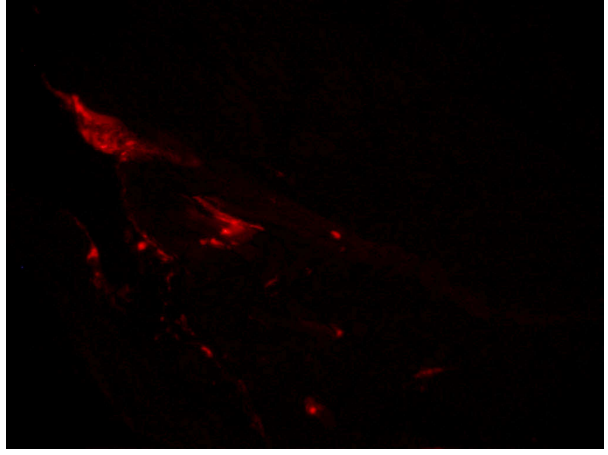
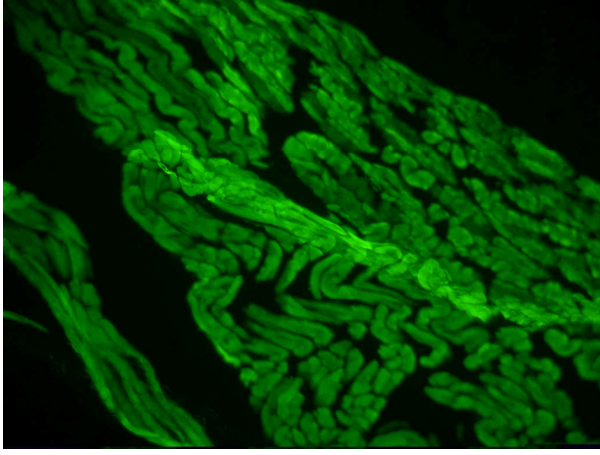
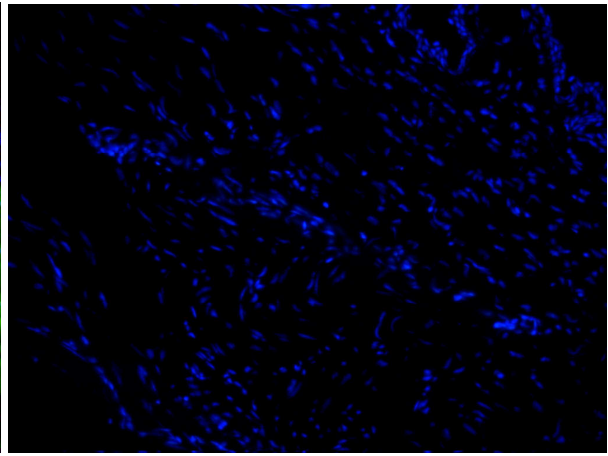
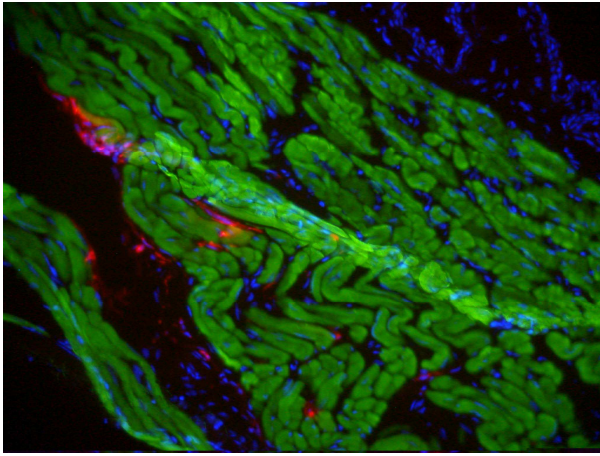


Abb. 11 15d MF20

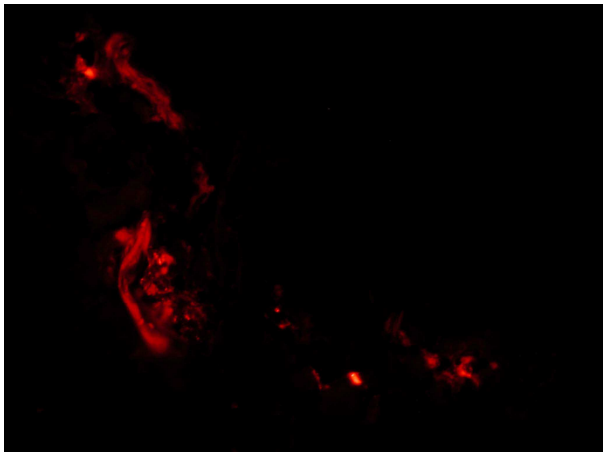
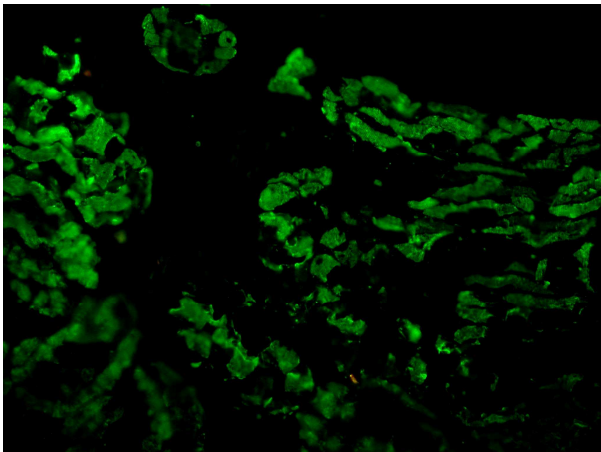
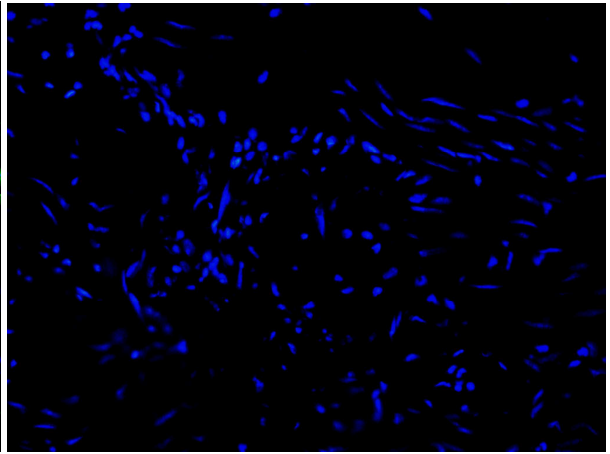
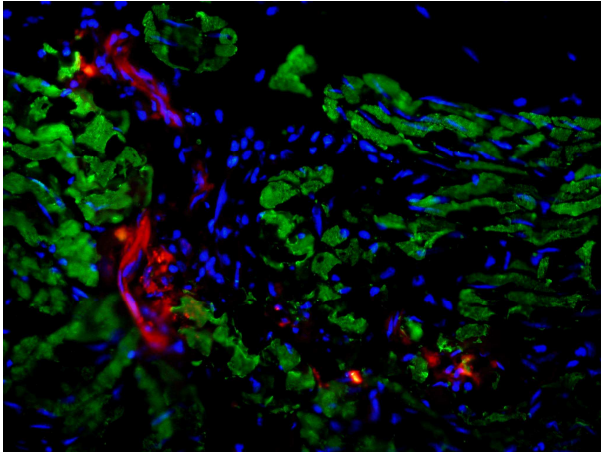
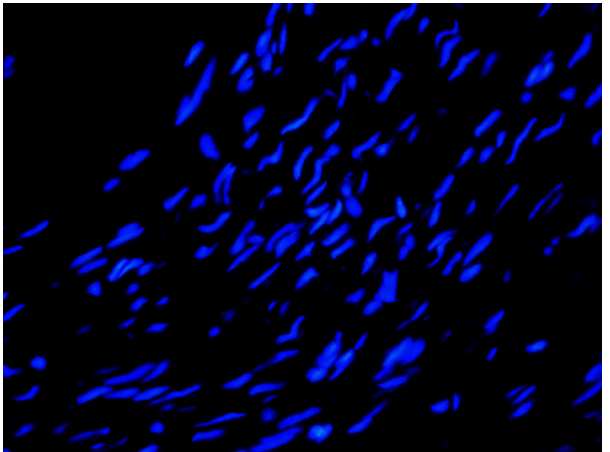
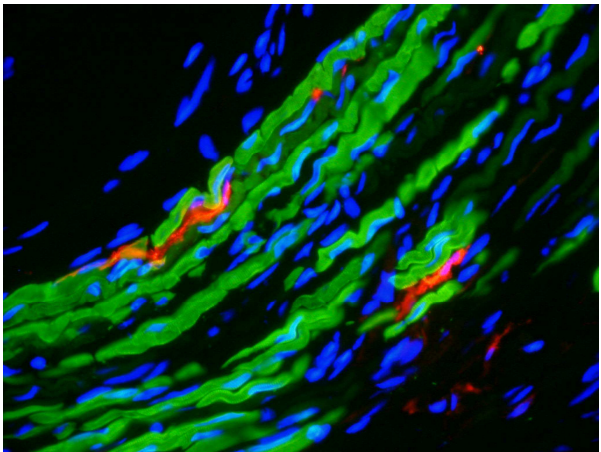


Abb. 12 1d MY32





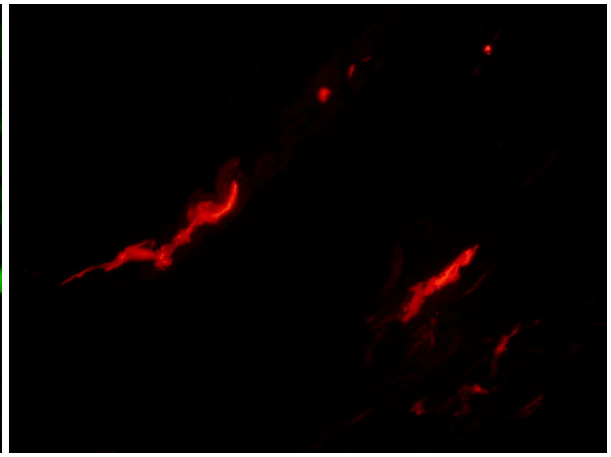
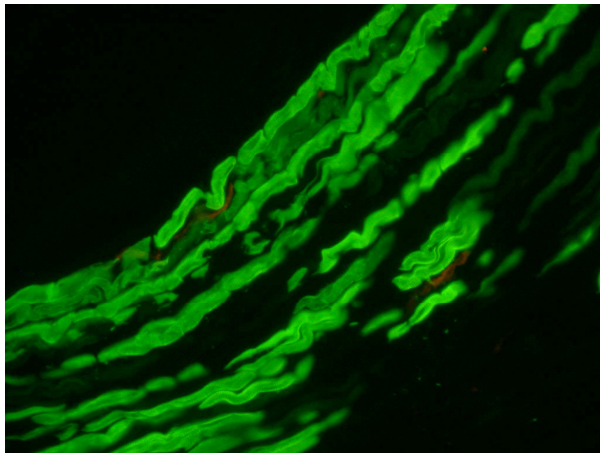


Abb. 13 7d MY32

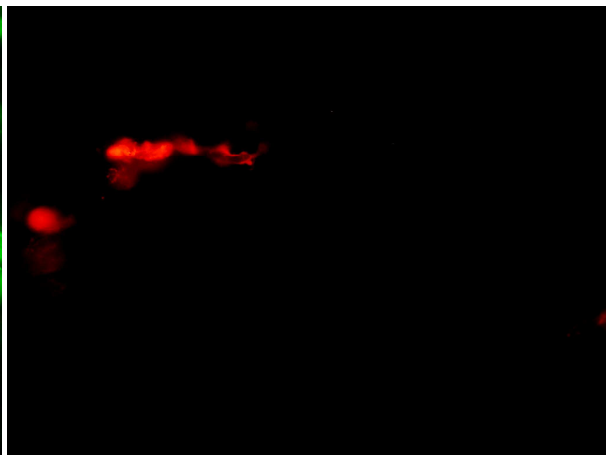
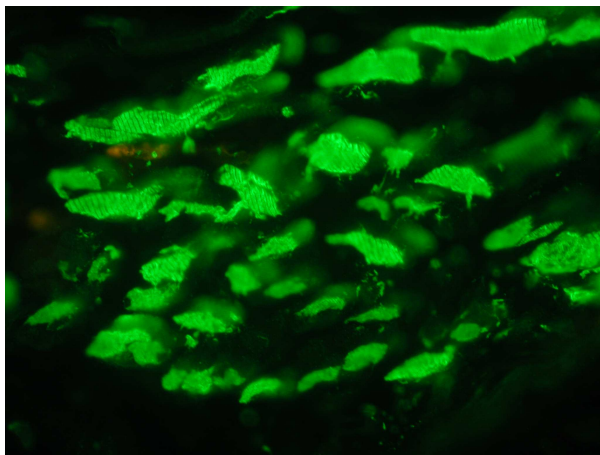
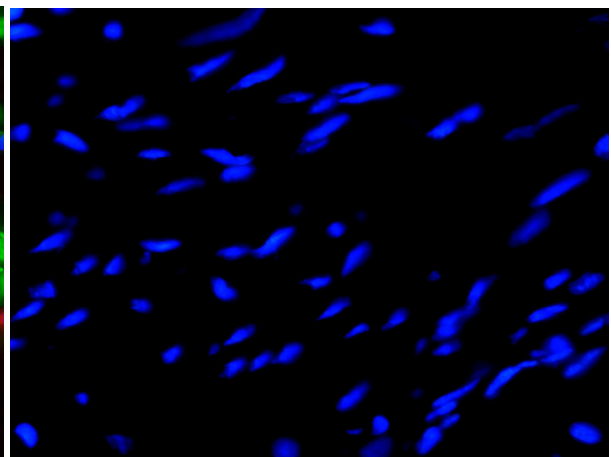
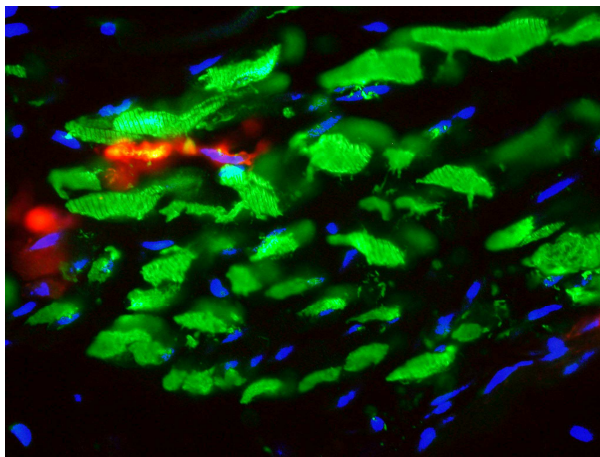


Abb. 14 15d MY32

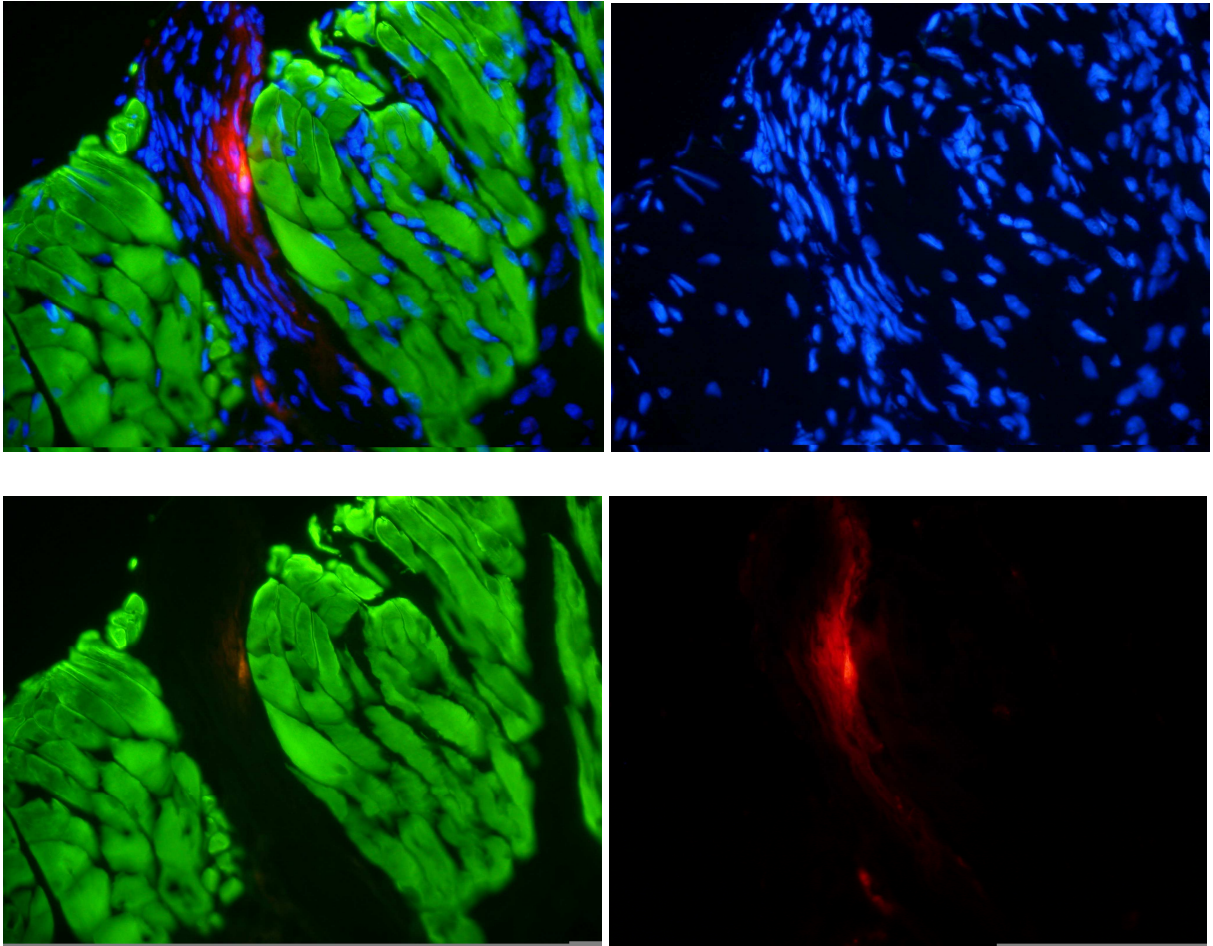


Abb. 15 30d MF20

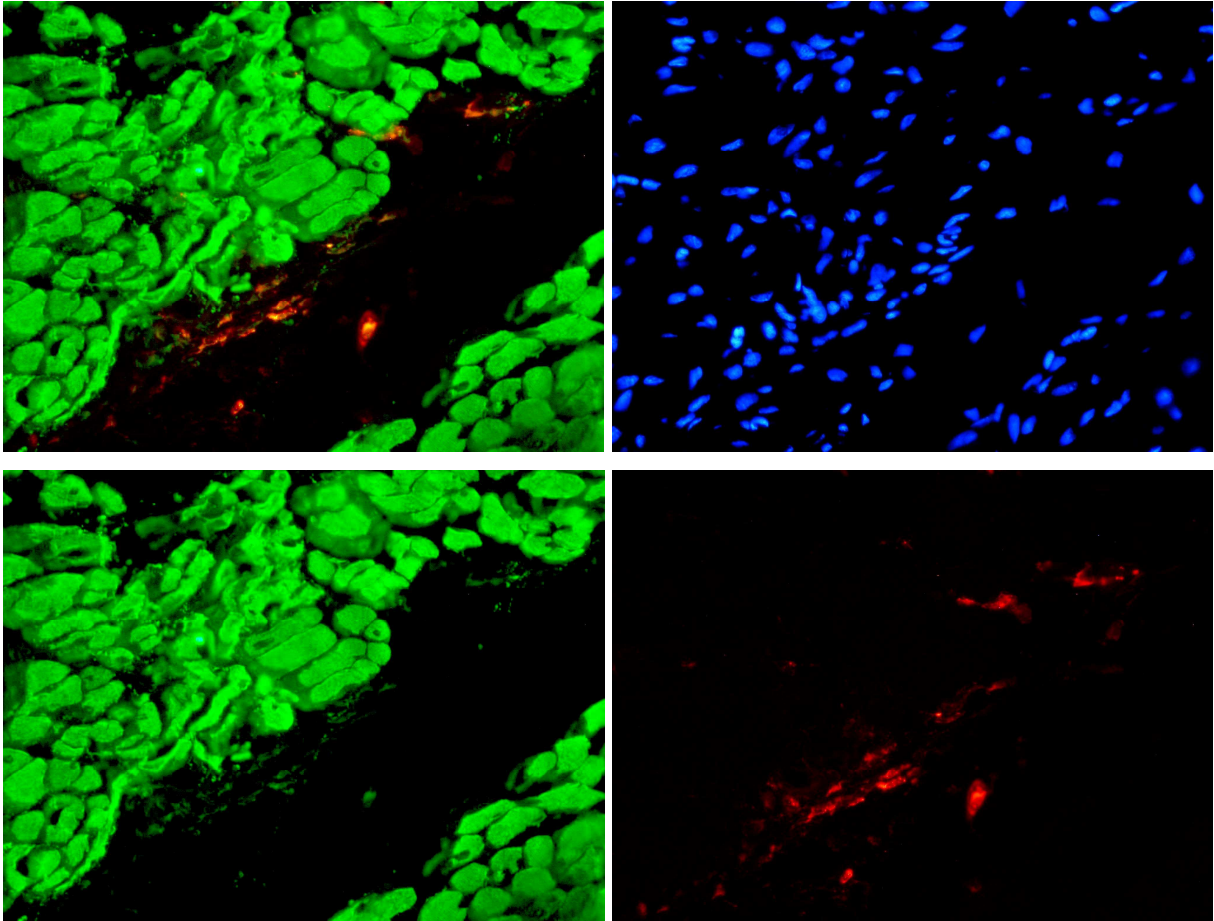
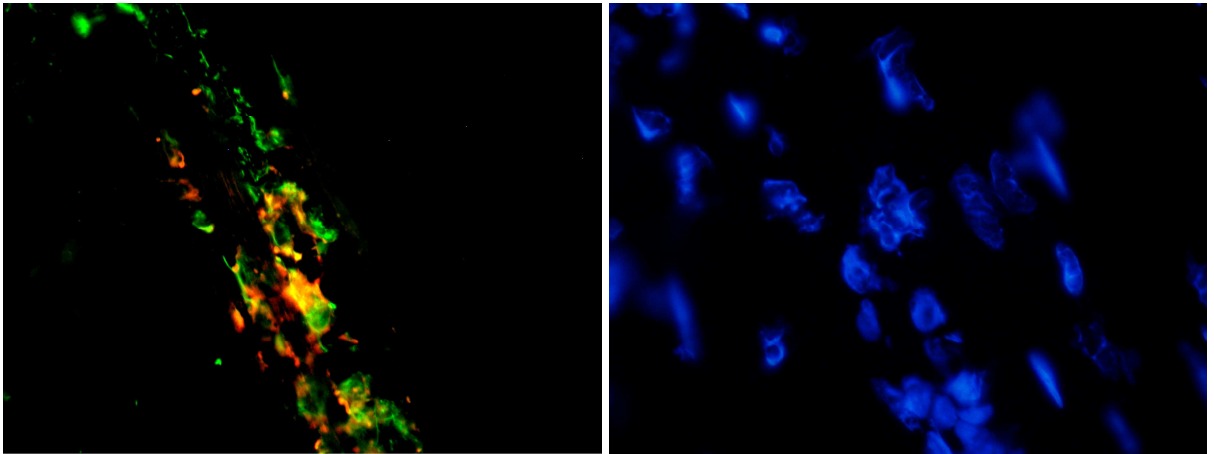


Abb. 16 30d MY32



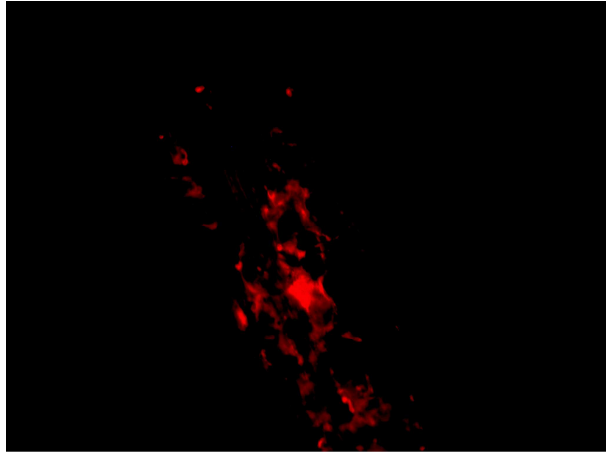
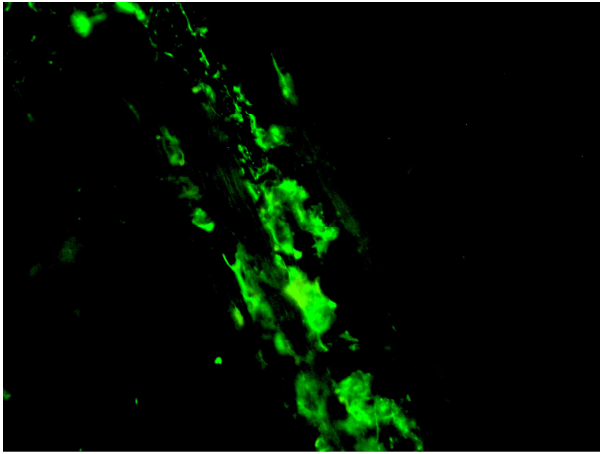


Abb. 17 30d BM 747

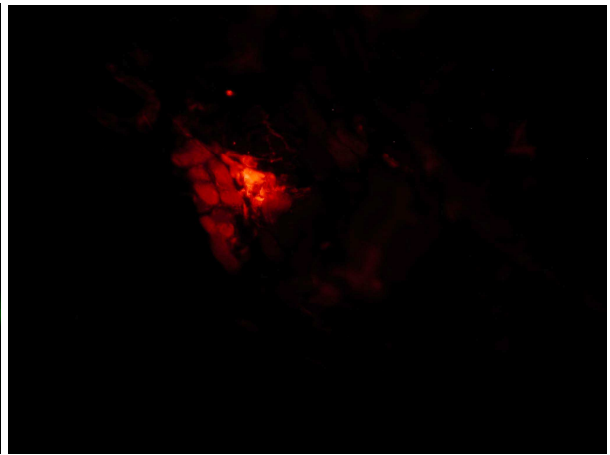
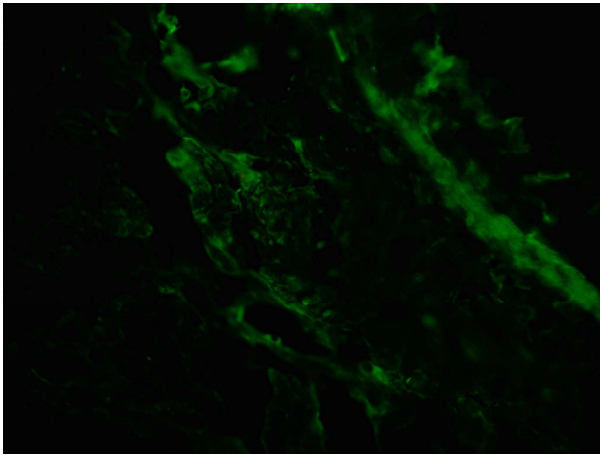
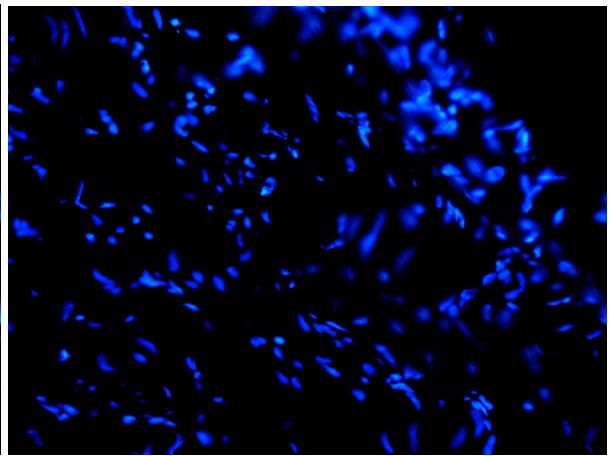
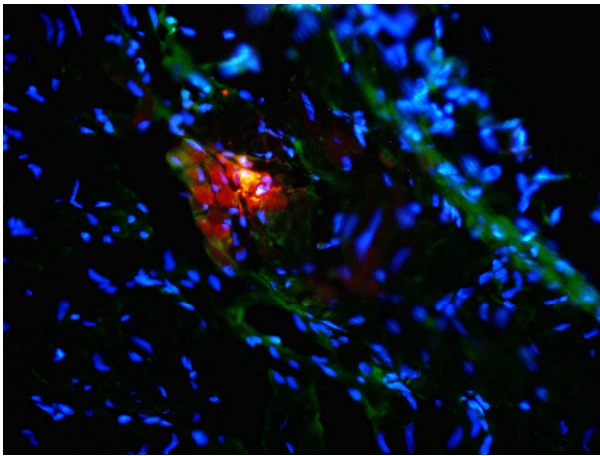


Abb. 18 1d Desmin



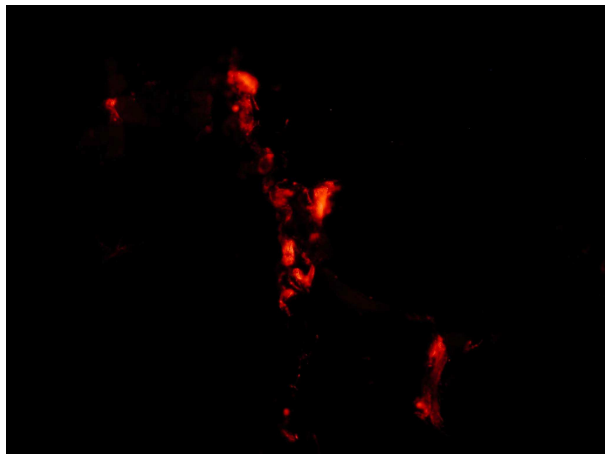
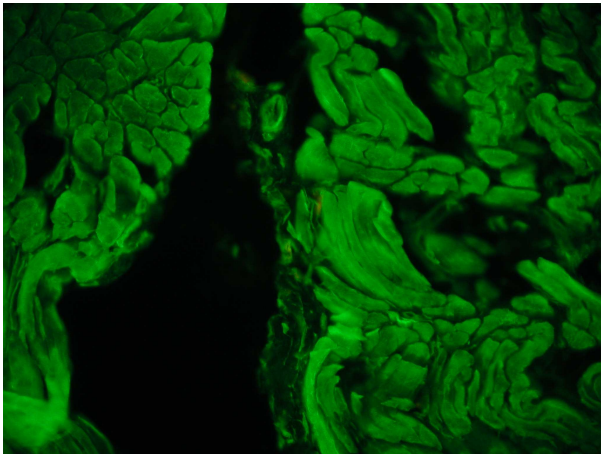
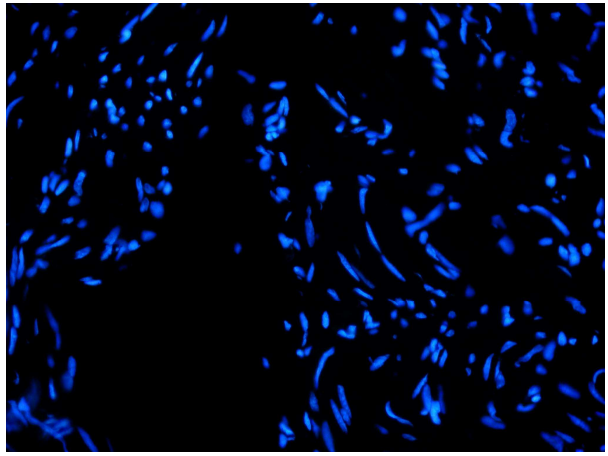
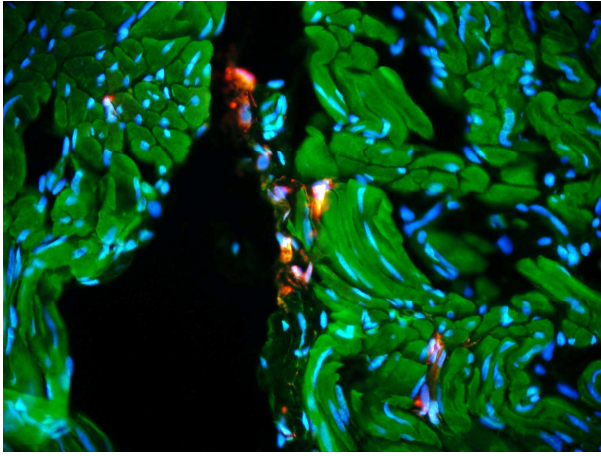
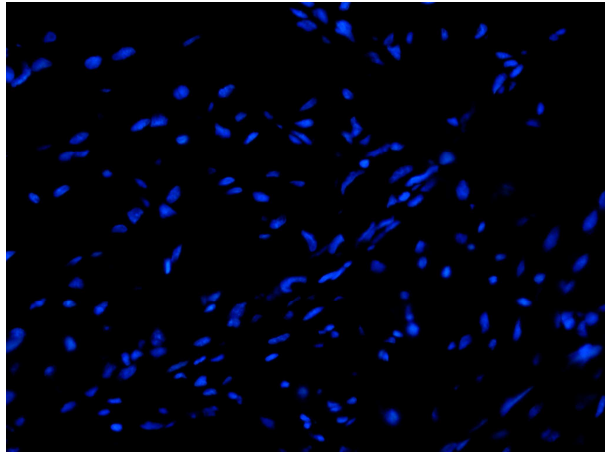
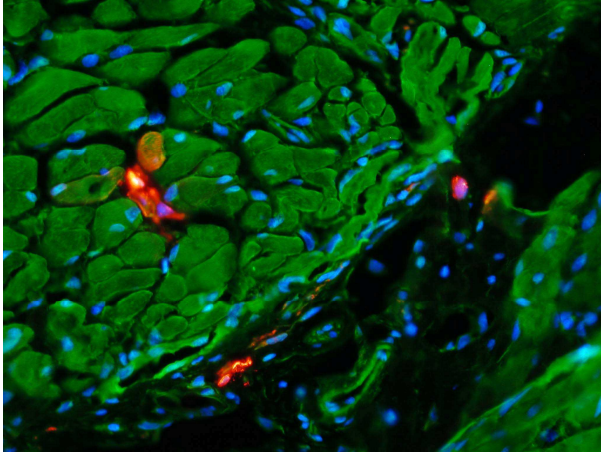


Abb. 19 15d Desmin



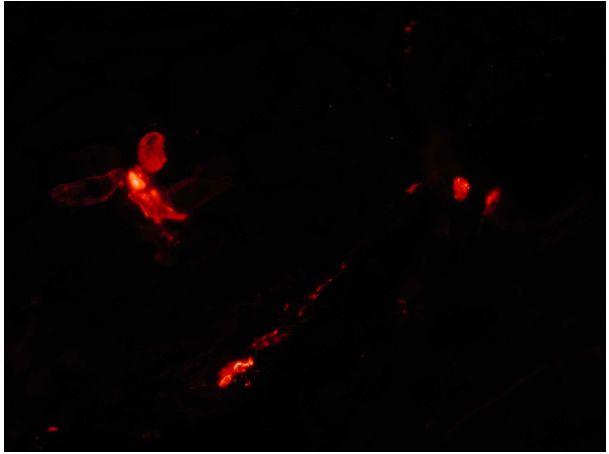
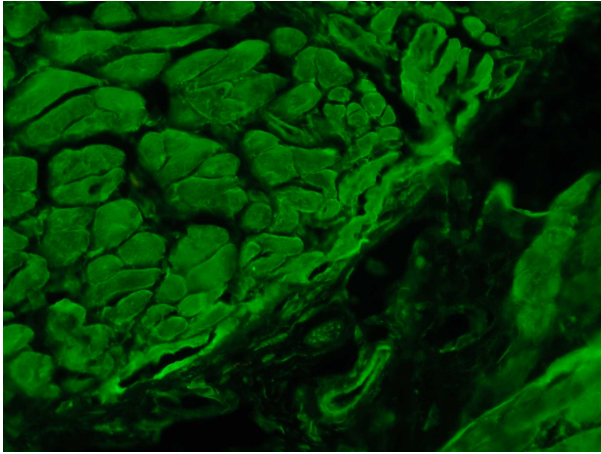


Abb. 20 30d Desmin

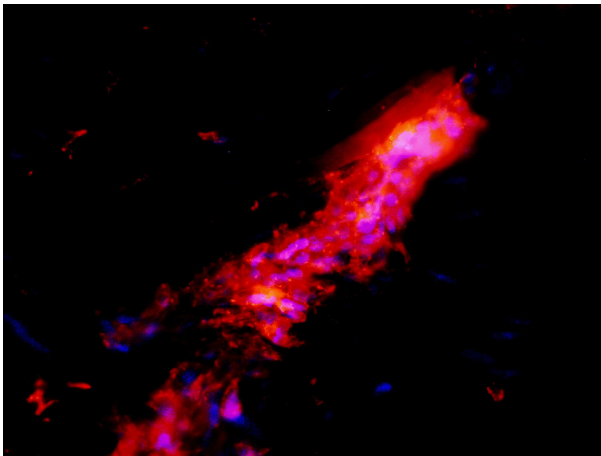


Abb. 21

## 9. Thesen

1. Im regenerierenden Stumpf verlieren transplantierte Herzmuskelzellen innerhalb von 24 Stunden cardiales Troponin T.
2. Die transplantierten Zellen nehmen innerhalb der ersten 24 Stunden im regenerierenden Stumpf Blastemzellcharakter an.
3. Nach 30 Tagen im regenerierenden Stumpf exprimieren transplantierte Herzmuskelzellen skelettmuskelspezifische Proteine (skelettales Myosin und skelettales Troponin I)
4. Herzmuskelzellen können 30 Tage im regenerierenden Stumpf überleben.
5. Bei Herzmuskelzellen von *Notophthalmus viridescens* ist eine Änderung der Proteinausstattung von herzmuskelspezifischen Protein zu skelettmuskelspezifischen Protein möglich.
6. Im ungeschädigten Hinterbein bleibt bei transplantierten Herzmuskelzellen das herzmuskelspezifische Troponin T erhalten.
7. In der Zellkultur bleibt bei Herzmuskelzellen von *Notophthalmus viridescens* das herzmuskelspezifische Troponin T erhalten.
8. Die DiI Markierung der Herzmuskelzellen bleibt mindestens 15 Tage stabil.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Christian Scholz  
Anschrift: Morgenleite 19  
09122 Chemnitz  
Geburtsdatum und -ort: 7.11. 1981, Karl-Marx-Stadt

### **Ausbildung**

1988-1992 Grundschole Schule am Schloßteich  
1992-2000 Dr. Wilhelm André Gymnasium  
Juli 2000 Abitur, Note 1,9

### **Zivildienst**

2000-2001 Zivildienst in der Gefäß- und Thoraxchirurgie im  
Küchwaldkrankenhaus des Klinikum Chemnitz

### **Studium**

Oktober 2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin Luther  
Universität Halle- Wittemberg  
22. September 2003 ärztliche Vorprüfung (Physikum), Note 2,33



## **Publikationen**

Friedemann Laube, Matthias Heister, Christian Scholz, Thilo Borchardt, Thomas Braun (2007): Re-programming of newt cardiomyocytes is induced by tissue regeneration, Journal of Cell Science, 4719-4729

Ch. Scholz, F. Laube, T. Braun (2005): The fate of newt cardiomyocytes transplanted into the regenerating limb stumps, European Journal of Cell Biology S. 61

## 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.

*Christian Scholz*

## 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.

*Christian Scholz*

## Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Dr. Braun für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung und Kritik während meiner Arbeit bedanken.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Laube für die ausführliche Einweisung in die Laborarbeit und die ungezählten Fachgespräche, für die er jederzeit zur Verfügung stand.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglicht haben und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.