

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Einfluss verschiedener Knochenmarkszellpopulationen auf  
linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Kristina Miriam Henig  
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2010

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. med. S. Frantz

**Koreferent:** Prof. Dr. med. G. Ertl

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 12.03.2010

**Die Promovendin ist Ärztin.**

**I. Inhaltsverzeichnis**

<b>I. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II. Abbildungs,- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>III. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen.....</b>	<b>3</b>
<u>2.1 Stammzellen.....</u>	3
<i>2.1.1 Knochenmarksstammzellen.....</i>	3
2.1.1.1 Hämatopoietische Stammzellen .....	3
2.1.1.2 Mesenchymale Stammzellen.....	4
2.1.1.3 Subpopulationen.....	5
2.1.1.3.1 Endothelial Progenitor Cells.....	5
2.1.1.3.2 Side Population Cells.....	5
2.1.1.3.3 Multipotent Adult Progenitor Cells.....	6
2.1.1.3.4 Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells.....	6
2.1.1.3.5 Tissue Committed Stem Cells.....	6
2.1.1.3.6 Very Small Embryonic-Like Stem Cells.....	6
<i>2.1.2 Kardiale Stammzellen.....</i>	7
<u>2.2 Herzinsuffizienz.....</u>	7
2.2.1 <i>Epidemiologie.....</i>	7
2.2.2 <i>Ätiologie.....</i>	8
2.2.3 <i>Remodeling.....</i>	9
2.2.3.1 <i>Abheilungsphase.....</i>	9
2.2.3.2 <i>Remodelingphase.....</i>	10
2.2.4 <i>Therapeutische Möglichkeiten.....</i>	12

<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>13</b>
<u>3.1 Studienprotokoll.....</u>	13
<u>3.2 Versuchstiere.....</u>	14
<u>3.3 Herzinfarktchirurgie und Zellinjektion.....</u>	14
<u>3.4 Echokardiographische Untersuchung.....</u>	16
<u>3.5 Probensammlung.....</u>	18
<u>3.6 Infarktgrößenbestimmung.....</u>	18
<u>3.7 Zellpräparation.....</u>	20
<u>3.8 Y-Chromosom Detektion.....</u>	22
<u>3.9 Parakrine Sekretion von Zytokinen.....</u>	22
<u>3.10 Biochemische Nachweise.....</u>	22
<u>3.10.1 RNA-Extraktion.....</u>	23
<u>3.10.2 cDNA-Synthese.....</u>	24
<u>3.9.3 Realtime-PCR.....</u>	25
<u>3.11 Statistische Auswertung.....</u>	29
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<u>4.1 Intrakardiale Zellinjektion und Detektion männlicher Spenderzellen.....</u>	30
<u>4.2 Mortalität.....</u>	31
<u>4.3 Infarktgrößenbestimmung.....</u>	31
<u>4.4 Körper- und Herzgewicht.....</u>	32
<u>4.5 <math>\beta</math>MHC/<math>\alpha</math>MHC-Expression.....</u>	34
<u>4.6 Echokardiographische Messungen.....</u>	35
<u>4.7 Zytokinsekretion.....</u>	36
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>44</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>45</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## II. Abbildungs,- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Remodelingprozesse nach Myokardinfarkt (nach SUTTON et al., 2000) .....	11
Abb. 2: Studienprotokoll.....	13
Abb. 3: Schematische Zeichnung der anatomischen Verlaufsvarianten der LAD bei der Maus.....	15
Abb. 4: EKG-Aufzeichnung zur Kontrolle der erfolgreichen Koronarligation.....	15
Abb. 5: Vergleichende echokardiographische Darstellung von dilatierten und nicht dilatierten Mäuseherzen.....	17
Abb. 6: Infarktgrößenausmessung.....	20
Abb. 7: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation.....	21
Abb. 8: Schematische Darstellung der RT-PCR.....	26
Abb. 9: CT-Wert-Bestimmung bei der RT-PCR.....	27
Abb. 10: Quantitative Konzentrationsbestimmung bei der RT-PCR mittels Standardreihe.....	28
Abb. 11: Southern Blot zur Zelldetektion.....	30
Abb. 12: Überlebenskurve.....	31
Abb. 13: Infarktgröße.....	32
Abb. 14: LV-Gewicht/Körpergewicht.....	33
Abb. 15: $\beta$ MHC/ $\alpha$ MHC-Expression.....	34
Abb. 16: Linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Fläche an Tag 1 und 42.....	35
Abb. 17: IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$ Konzentrationen.....	37
Tabelle 1: Körpergewicht, linksventrikuläres und rechtsventrikuläres Gewicht sowie deren Relationen.....	33
Tabelle 2: Echokardiographiemessungen an Tag 42.....	36

### III. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
g	Gramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilber
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ALCAM	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
BM	Bone marrow
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
c-kit	= CD117
CT	Threshold-Cycle
CXCR-4	CXC chemokine Receptor-4
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleid Acid
EDA	Enddiastolic Area
EDD	Enddiastolic Diameter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ESA	Endsystolic Area
ESD	Endsystolic Diameter
EtOH	Ethanol
FS	Fractional Shortening
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulozyte-Colony stimulating Factor
GM-CSF	Granulozyte Macrophage-Colony stimulating Factor

HMV	Herzminutenvolumen
HSC	Hämatopoietische Stammzelle
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KC	Keratinocyte derived Chemokine
LAD	Left descending artery
Lin <sup>+</sup> -Cell	Lineage positive Cell
Lin <sup>-</sup> -Cell	Lineage negative Cell
LV	Linker Ventrikel
MACS	Magnetic Cell Separation
MAPC	Multipotent Adult Progenitor Cell
MHC	Myosin Heavy Chain
MI	Myokardinfarkt
MIAMI Cell	Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cell
MIP	Makrophagen Inflammatorisches Protein
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NF $\kappa$ B	Nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Oct-4	Octamer binding transcription factor 4
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted
Rex-1	= Zfp-42, zinc finger protein-42
RNA	Ribonucleid Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction

RV	Rechter Ventrikel
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	Stromal-Derived-Factor-1
SPC	Side Population Cell
SSEA-1	Stage-specific embryonic antigen-1
SV	Schlagvolumen
TCSC	Tissue Committed Stem Cell
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Factor-beta 1
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TNF-R1	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF-R2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
ZNS	Zentrales Nervensystem



## 1. Einleitung

Das therapeutische Potenzial adulter Stammzellen ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Neben der seit langem bekannten und in der Therapie hämatoonkologischer Erkrankungen erfolgreich eingesetzten hämatopoietischen Stammzelle brachte die Grundlagenforschung der letzten Jahre hervor, dass eine Vielzahl weiterer Stammzellen im adulten Organismus existiert. Als eine *in vitro* Differenzierung dieser pluripotenten Stammzellen zu reifen Zelltypen gezeigt werden konnte, kam der Gedanke auf, das Potenzial der adulten Stammzellen für Therapiezwecke zu nutzen.

Herzinsuffizienz, eine der häufigsten und bedeutsamsten Folgen eines Herzinfarkts, stellt die führende Morbiditäts- und Mortalitätsursache in den westlichen Industrienationen dar. Heutige Standardtherapien, vornehmlich beruhend auf pharmakologischen Ansätzen, sind lediglich in der Lage eine Krankheitsprogression zu verhindern, ohne auf die zugrunde liegende Pathophysiologie der Erkrankung zu zielen, nämlich den progressiven Untergang von funktionellen Herzmuskelzellen. Mit der Entdeckung von adulten Stammzellen und Publikationen über die *in vitro* (MAKINO et al., 1999) und *in vivo* (ORLIC et al., 2001; MIYAHARA et al., 2006; AMADO et al., 2005) Differenzierungsfähigkeit von Knochenmarksstammzellen zu Kardiomyozyten, wurde ein explosiver Interessensanstieg in der Nutzung adulter Stamzellen zur ursächlichen und „kurativen“ Behandlung der Herzinsuffizienz beobachtet.

Weitere Untersuchungen in den Folgejahren haben allerdings die Plastizität adulter Knochenmarksstammzellen in Frage gestellt, da im Tiermodell keinerlei Transdifferenzierung festgestellt werden konnte (MURRY et al., 2004; BALSAM et al., 2004). Nicht ausreichend geklärt ist ebenso, welche Knochenmarkszellpopulationen geeignet sind, ob eine vorherige Kultivierung und Vordifferenzierung von Vorteil ist, und in welcher Anzahl, zu welchem Zeitpunkt und mittels welcher Applikationsart diese Zellen verabreicht werden müssen, um klinisch relevanten Nutzen aufzuweisen. Klinische Studien am Menschen unter Verwendung von Knochenmarksstammzellen zeigten die Durchführbarkeit und Sicherheit solch einer Intervention (ASSMUS et al., 2002; FUCHS et al., 2003), die Ergebnisse hinsichtlich kardialer Funktionsverbesserung variierten jedoch erheblich. Letztlich ist weitere Grundlagenforschung nötig, um die regulatorischen Mechanismen der Differenzierung dieser Zellen zu klären, und damit Aussagen über die tatsächliche Wirkweise und Effektivität der Zelltherapie treffen zu können.

Die vorliegende Arbeit hat sich zum Ziel gemacht, die Rolle von exogen verabreichten Knochenmarkszellen an kardialen Umbauprozessen nach Myokardinfarkt zu beleuchten. Hierfür wurden Mäuse nach experimentell induzierten Myokardinfarkt entweder mit unfraktionierten Knochenmarkszellen oder einer mit Vorläufer- ( $\text{Lin}^-$ ) bzw. reifen ( $\text{Lin}^+$ ) Zellen angereicherten Subpopulationen behandelt. Dadurch ist ein Vergleich der verschiedenen Populationen untereinander möglich. Es besteht die Hypothese, dass durch die Injektion von Knochenmarkszellen in das infarzierte Herz linksventrikuläre Umbauprozesse verhindert bzw. in ihrem Ausmaß abgeschwächt werden können. Als Parameter hierfür soll insbesondere die echokardiographisch bestimmte linksventrikuläre Dilatation dienen.

## 2. Grundlagen

### 2.1 Stammzellen

Als Stammzellen im Allgemeinen bezeichnet man unreife Zellen, die zu Klonalität, unbegrenzter Selbsterneuerung und weiterer Differenzierung fähig sind. Primär lassen sich embryonale von adulten Stammzellen unterscheiden. Aus totipotenten embryonalen Stammzellen, die erstmals 1981 aus Mausblastozysten (EVANS et al., 1981) gewonnen werden konnten, entwickeln sich alle weiteren somatischen Zellen (wie auch Keimzellen) eines Individuums. So gelang es auch anhand menschlicher embryonaler Stammzellkulturen eine Differenzierung in Kardiomyozyten zu zeigen (KEHAT et al., 2001). Das therapeutische Potenzial embryonaler Stammzellen ist dennoch beschränkt, da neben ethischen Fragestellungen immunologische Reaktionen und die Neigung zur tumorösen Entartung den Einsatz dieser Zellen limitieren (NUSSBAUM et al., 2007). Die adulte Stammzelle hingegen, und hier insbesondere die Knochenmarksstammzelle, weist die Vorteile der einfachen Gewinnung, der guten Kultivierbarkeit ex vivo und, da als autologes Transplantat verwendet, keinerlei immunologische Reaktion auf. Auch die Gefahr der Neoplasiebildung ist trotz Studien von Rubio et al., die nach Langzeitkultivierung eine spontane Transformation adulter Stammzellen beobachten konnten, im Vergleich zu embryonalen Stammzellen als gering anzusehen (RUBIO et al., 2005). In den folgenden Ausführungen möchte ich mich auf die nähere Charakterisierung der adulten Stammzellen beschränken, welche einen zentralen Punkt in meinen Untersuchungen einnehmen.

#### *2.1.1 Knochenmarksstammzellen*

Das Knochenmark beherbergt neben den seit langen bekannten hämatopoietischen und mesenchymalen Stammzellen weitere Populationen von adulten Stammzellen, deren Charakteristika teilweise noch weiter zu erforschen sind.

##### 2.1.1.1 Hämatopoietische Stammzellen

Die hämatopoietische Stammzelle (HSC), deren Vorkommen erstmalig 1906 von Alexander MAXIMOV beschrieben wurde, ist zuständig für die ständige Erneuerung aller im Blut vorhandenen Zellen. Lediglich 0,01-0,05% aller Knochenmarkszellen (HARRISON et al.,

1990) tragen die für hämatopoietische Stammzellen typischen Oberflächenrezeptoren Lin<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, CD34<sup>lo</sup>, CD38<sup>hi</sup> (OSAWA et al., 1996; SPANGRUDE et al., 1988). Hämatopoietische Stammzellen, deren Mobilisierung aus dem Knochenmark u.a. mittels Stem Cell Faktor (SCF) sowie Granulocyte-Colony Stimulating Faktor (G-CSF) möglich ist, werden seit mehr als drei Jahrzehnten erfolgreich für die autologe und allogene Knochenmarkstransplantation eingesetzt (GOLDMANN et al., 2002). Obwohl keine Studie bisher die Differenzierung von HSC in Kardiomyozyten in vitro beweisen konnte, berichtete Orlic et al. (ORLIC et al., 2001a; ORLIC et al., 2001b) am Mausmodell von einer Transdifferenzierung in Kardiomyozyten sowie Gefäßzellen nach Myokardinfarkt. Diese Plastizität wurde allerdings durch weitere Untersuchungen in Frage gestellt, die im Tiermodell keinerlei Transdifferenzierung hämatopoietischer Stammzellen in Herzmuskelzellen feststellen konnten (MURRY et al., 2004; BALSAM LB et al., 2004).

### 2.1.1.2 Mesenchymale Stammzellen

Vor ca. 30 Jahren entdeckten Friedenstein et al. (FRIEDENSTEIN et al., 1968) eine weitere im Knochenmark residierende Zellpopulation adulter Stammzellen: mesenchymale Stammzellen (MSC). Charakteristisch für diese Zellen, die lediglich 0,001-0,01% aller Knochenmarkszellen repräsentieren (PITTENGER et al., 2004), ist die Fähigkeit sich in Zellen mesenchymaler Herkunft zu differenzieren, wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten. Zudem konnte eine Differenzierung zu Skelettmuskelzellen (WAKITANI et al., 1995, FERRARI et al., 1998), Vorläuferzellen neuronaler Zellen (MEZEY et al., 2000; WOODBURY et al., 2000; ZHAO et al., 2002), Hepatozyten (PETERSON et al., 1999; LAGASSE et al., 2000; THEISE et al., 2000) sowie Kardiomyozyten in vitro (MAKINO et al., 1999) und in vivo (MIYAHARA et al., 2006, AMADO et al., 2005) beobachtet werden. Da eine Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten in vivo aber lediglich nur in sehr geringem Ausmaß stattfand, wurden zudem parakrine Effekte über Bereitstellung von Zytokinen als entscheidender Wirkmechanismus zur Verbesserung der kardialen Funktion nach Herzinfarkt gesehen (GNECCHI et al., 2006).

MSC, die sich durch das Fehlen typischer hämatopoietischer Antigene (CD45, CD34, CD14) bei Expression spezifischer Oberflächenfaktoren wie Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM, CD106), Intercellular Adhesion Molecule 1 und 2 (ICAM-1 und ICAM-2), Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM, CD166) (CONGET et al., 1999) sowie einer Reihe von Integrinen auszeichnen, zeigen zudem in vitro und in vivo ein

immunsuppressives Potenzial (BARTHOLOMEW et al., 2002) was den allogenen Einsatz dieser Zellpopulation denkbar macht.

### 2.1.1.3 Subpopulationen

In den letzten Jahren wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen über neu charakterisierte Knochenmarksubpopulationen berichtet, die sich ex vivo kultivieren lassen und teilweise die Fähigkeit zur gewebsübergreifenden Differenzierung besitzen. Beschrieben wurden in diesem Zusammenhang folgende Zelltypen: Endothelial Progenitor Cells, Side Population Cells, Multipotent Adult Progenitor Cells, Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells, Tissue Committed Stem Cells und Very Small Embryonic-Like Cells.

#### 2.1.1.3.1 Endothelial Progenitor Cells

Die endotheliale Progenitorzelle (EPC), die sich vermutlich wie die HSC aus dem Hämangioblasten (RIBATTI et al., 2002) entwickelt, zeigt eine Expression der hämatopoitischen Stammzellmarker CD133 und CD34 sowie des endothelialen Markerproteins Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 2 (VEGF-R2) (PEICHEV et al., 2000). Neben der physiologischen Differenzierung der EPC in Gefäßendothelzellen, die mehrfach in vitro und in vivo beschrieben worden ist (ISNER et al., 2001; QUIRICI et al., 2001; ASSMUS et al., 2002; KAWAMOTO et al., 2003), konnten wenige Studien zudem eine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten sowohl in Zellkultur (BARDORFF et al., 2003; KOYANAGI et al., 2005) als auch nach Injektion ins infarzierte Herz (IWASAKI et al., 2006) zeigen.

#### 2.1.1.3.2 Side Population Cells

Bei Side Population Cells,  $CD34^{-/lo} c\text{-Kit}^+ Sca\text{-}1^+$ , einer Subpopulation hämatopoitischer Stammzellen, die durch die Fähigkeit Hoechst Farbstoff auszuschleusen charakterisiert sind (GOODELL et al., 1997; SCHARENBERG et al., 2002), konnte nach Einbringung in infarziertes Myokardgewebe ebenso eine Neubildung von Kardiomyozyten beobachtet werden (KAJSTURA et al., 2005; JACKSON et al., 2001).

### 2.1.1.3.3 Multipotent Adult Progenitor Cells

Die multipotenten adulten Progenitorzellen (MAPC),  $CD13^+$   $Flk1^{dim}$   $c-kit^-$   $CD44^-$   $CD45^-$  Major Histocompatibility Complex Klasse I/II<sup>-</sup>, lassen sich aus Kulturen mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark isolieren (REYES et al., 2001; JIANG et al., 2002). REYES et al. zeigten, dass diese Zellen sich nicht nur zu mesenchymalen sondern auch zu endothelialen, neuroectodermalen und endodermalen Zelltypen differenzieren lassen (REYES et al., 2001). Jedoch wurden MAPCs bisher noch nicht hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit und ihres therapeutischen Potentials im Tier-Infarkt-Modell untersucht, wobei ein Fehlen der Oberflächenproteine des Major Histocompatibility Complex Klasse I und II einen Einsatz für allogene Transplantation denkbar macht.

### 2.1.1.3.4 Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells

Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells (MIAMI) werden als primitive Subpopulation MSCs angesehen. In vitro ließ sich, wie bei embryonalen Stammzellen, eine Expression embryonaler Stammzellmarker (Oct-4, Rex-1) sowie die Differenzierungsfähigkeit in alle drei Keimblätter nachweisen (D'IPPOLITO et al., 2004).

### 2.1.1.3.5 Tissue Committed Stem Cells

Eine weitere adulte Stammzellpopulation, die im Knochenmark wiederzufinden ist, sind die Tissue Committed Stem Cells (TCSC). Diese kleinen CXCR-4 positiven,  $CD45^-$  Zellen, deren Anzahl im Laufe des Lebens abnimmt, lassen sich durch die Freisetzung von Chemokinen wie Stromal-Derived-Factor-1 (SDF-1), welcher typischerweise in geschädigten Geweben vermehrt zu finden ist, aktivieren und an den Ort der Schädigung locken, wo sie durch Differenzierung z.B. in Muskelzellen zur Organregeneration beitragen (KUCIA et al., 2006).

### 2.1.1.3.6 Very Small Embryonic-Like Stem Cells

Very Small Embryonic-Like Stem Cells siedeln sich in der frühen Knochenmarksentwicklung als Abkömmlinge epiblastärer Zellen im Knochenmark an (RATAJCZAK et al., 2007). Diese sehr seltene  $Sca-1^+$   $lin^-$   $CD45^-$  Zellpopulation (KUCIA et al., 2005) exprimiert Marker pluripotenter Stammzellen wie SSEA-1, Oct-4, Nanog oder Rex-1, und zeigt Charakteristika

embryonaler Stammzellen, wie z.B. die große Kern-Plasma-Relation und die Expression von Euchromatin (KUCIA et al., 2008). Ihre Pluripotenz zeigt sich in vitro an der Fähigkeit zur Differenzierung in Zellen aller drei Keimblätter (KUCIA et al., 2008). Eine in vivo Differenzierung sowie eine Teilnahme an der Regeneration von geschädigten Gewebe konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden.

### *2.1.2 Kardiale Stammzellen*

Einige Jahre nach Entdeckung adulter Knochenmarksstammzellen wurde auch in vielen weiteren Organsystemen wie Haut, ZNS, Skelettmuskel, Leber, Milchdrüse und Herz die Existenz adulter Stammzellpopulationen aufgezeigt. Was das Herz betrifft, konnten Studien belegen, dass diese Zellpopulationen in der Lage sind, sich zu Kardiomyozyten, glatten Muskelzellen und endothelialen Zellen zu differenzieren (BELTRAMI et al., 2003; OH et al., 2003; MESSINA et al., 2004; MARTIN et al., 2004; LINKE et al., 2005; LAUGWITZ et al., 2005). Dabei ist jedoch noch nicht genau geklärt, ob es sich bei den als Kardiosphären, c-Kit<sup>+</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, Islet-1<sup>+</sup> sowie SP- Zellen beschriebenen Progenitorzellen wirklich um eigenständige Zellpopulationen handelt, oder ob sie nicht die selbe Population von Vorläuferzellen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten darstellen. Letztlich wurde aber der traditionelle Gedanke, dass es sich beim Herzen um ein irreversibel differenziertes Organ mit nicht vorhandener Regenerations- bzw. Heilungskapazität handelt, in Frage gestellt.

## 2.2 Herzinsuffizienz

### *2.2.1 Epidemiologie*

Die Herzinsuffizienz, die mit wiederkehrenden Hospitalisationen, hoher Morbidität und Mortalität verbunden ist, hat sich parallel zum Altersanstieg in der Bevölkerung der westlichen Industriestaaten zu einem immer größer werdenden sozioökonomischen Problem entwickelt. Bei einer Gesamtprävalenz von 1-2% (COWIE et al., 1997) unterstreicht die Framingham Studie den Einfluss des Alters auf die Herzinsuffizienzrate. Danach steigt die Prävalenz bei Männern von 0,8% im Alter von 50-59 Jahren auf 6,6% im Alter von 80-89 Jahren. Bei Frauen findet sich ein Anstieg von 0,8% auf 7,9% (HO et al., 1993). Ähnlich wie die Prävalenzdaten zeigen auch die Inzidenzdaten eine deutliche Alterskorrelation. Die Framingham Studie verdeutlicht hierbei, dass die jährliche Inzidenz von 3 Fällen bei 1000

Männern im Alter von 50-59 Jahren auf 27 Fälle bei 1000 Männern im Alter von 80-89 Jahren ansteigt (HO et al., 1993). Ein vergleichbarer Anstieg von 2 auf 22 Fälle in den selben Altergrenzen findet sich bei Frauen wieder. Die Rotterdam Studie, welche zudem die Inzidenz in der Population der über 90 Jährigen untersucht hat, spricht von einer Inzidenz von 47 Fällen bei 1000 Personen in der genannten Altersgruppe (BLEUMINK et al., 2004). Neben den oft erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität führt die Herzinsuffizienz zu einem deutlichen Verlust an erwarteten Lebensjahren. Nach der Hillingdon Herzinsuffizienzstudie nimmt das Überleben nach Stellen der Diagnose von 81% im ersten Monat, 75% nach drei Monaten, 70% nach sechs Monaten, 62% nach zwölf Monaten bis auf 57% nach achtzehn Monaten ab (COWIE et al., 2000). 80% der Männer und 70% der Frauen unter 65 Lebensjahren mit bestehender Herzinsuffizienz sterben innerhalb von acht Jahren. (LLOYD-JONES et al., 2009). Mit einer 5-Jahres Überlebensrate von ungefähr 25% gleicht die Mortalität jener von hochmalignen Tumoren (STEWART et al., 2001). 6% aller Sterbefälle und damit in absoluten Zahlen ca. 50 000 Todesfälle gingen 2007 in der Bundesrepublik Deutschland auf das Konto Herzinsuffizienz. Damit stand die Herzinsuffizienz in der Rangliste der häufigsten Todesursachen 2007 auf Platz 3 (Statistisches Bundesamt Deutschland).

### 2.2.2 Ätiologie

Man spricht von einer Herzinsuffizienz, wenn das Herz nicht mehr in der Lage ist, sich selbst und die anderen Organe ausreichend mit Blut zu versorgen. Je nach vornehmlich betroffener Kammer lässt sich eine Einteilung in Links-, Rechts- oder Globalherzinsuffizienz vornehmen. Nach dem zeitlichen Verlauf grenzt man zudem die akute Herzinsuffizienz, welche sich im Verlauf von Stunden/Tagen entwickelt, von der chronischen Herzinsuffizienz, die sich erst nach Monaten/Jahren manifestiert, ab. Die Hauptursache sowohl der chronischen als auch der akuten Herzinsuffizienz ist in den westlichen Ländern die koronare Herzerkrankung, die wiederum sekundär über den plötzlichen Verschluss einer Koronararterie, typischerweise durch einen rupturierten atherosklerotischen Plaque, zur akuten Ischämie und Verlust von Herzmuskelzellen, definiert als akuter Myokardinfarkt (MI), führt und eine systolische Ventrikelfunktionsstörung nach sich zieht. Als primäre Ursache der Herzinsuffizienz ist insbesondere die arterielle Hypertonie zu beachten, da sie einerseits als Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung anzusehen ist, und zudem auf direktem Wege zu einer diastolischen Ventrikelfunktionsstörung führt. Dabei ist das Lebenszeitrisiko an einer



Herzinsuffizienz zu erkranken für Personen mit einem Blutdruck >160/90 mmHg doppelt so hoch wie für Patienten mit einem Blutdruck <140/90 mmHg (LLOYD-JONES et al., 2002).

### 2.2.3 Remodeling

Die Mechanismen, die nach einem akuten Ischämieereignis einsetzen sind mannigfaltig, und erstrecken sich sowohl auf zelluläre als auch auf molekulare Ebene. Besteht die Ischämie länger als 30 min kommt es zum irreversiblen Untergang von Herzmuskelzellen, was histologisch zunächst als Koagulationsnekrose sichtbar wird (KUMAR et al., 2004). Der myokardiale Zelltod erfordert hierbei Umbauprozesse am übrig gebliebenen Myokardgewebe, um der steigenden Arbeitsbelastung gerecht zu werden. Dieses sogenannte Remodeling umfasst Dilatation, Hypertrophie, Narbenbildung, neurohormonale Anpassungen sowie Zytokinaktivierung (PFEFFER et al., 1990; SUTTON et al., 2000), deren Ausmaße dabei vor allem vom initialen Gewebeschaden abhängig sind. Im zeitlichen Verlauf lässt sich die Abheilungsphase, welche sich in den ersten drei Tagen nach Infarkt abspielt und vor allem den Infarkt selbst und die umgebene Periinfarktzone, auch Borderzone genannt, betrifft, von der Remodelingphase abgrenzen, welche ab dem dritten Tag einsetzt und Prozesse beinhaltet, die den gesamten linken Ventrikel miteinbeziehen (TIYYAGURA et al., 2006).

#### 2.2.3.1 Abheilungsphase

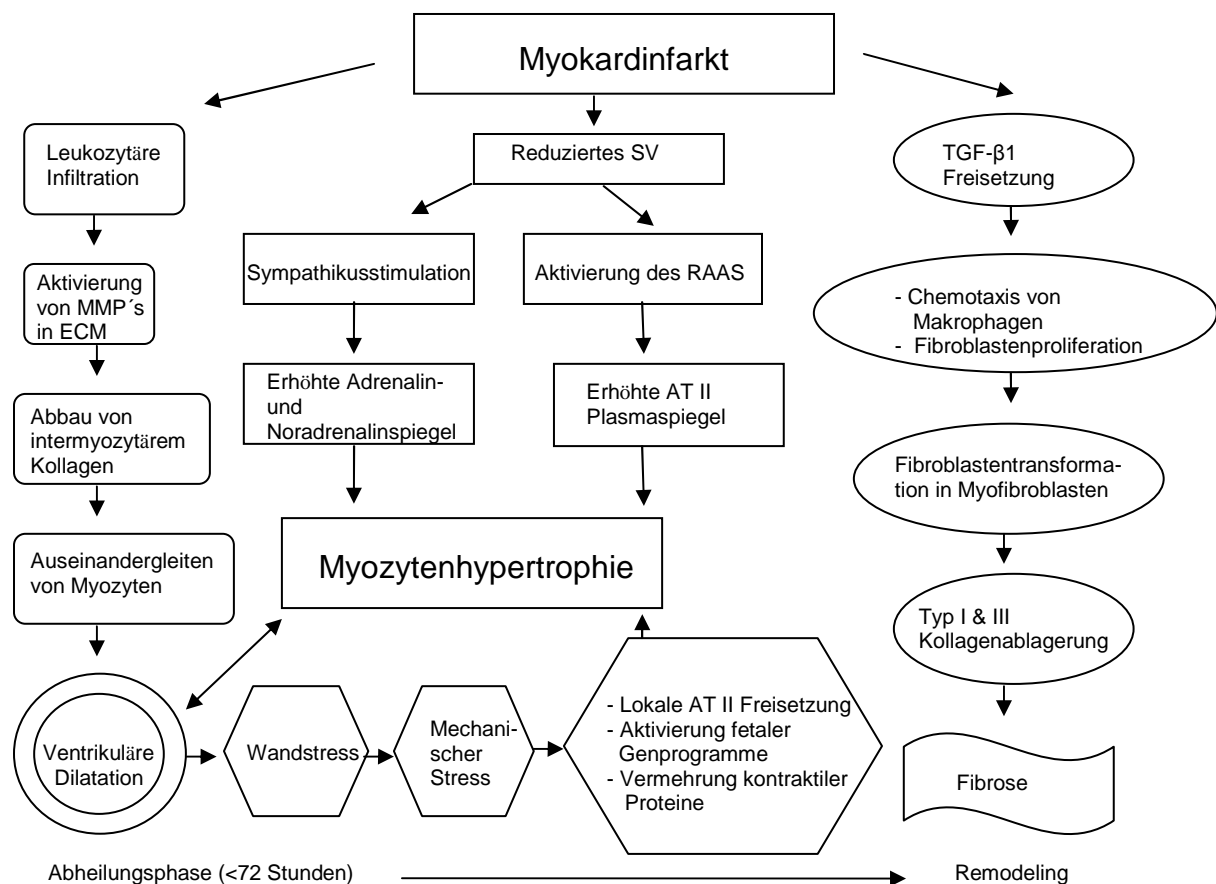
Mit Einsetzen der Gewebeschädigung beginnt die Aktivierung inflammatorischer Prozesse, die essentiell für eine schnelle Infarktheilung sind (KLONER et al., 1978; JUGDUTT 1997). Infiltration des geschädigten Myokards durch Leukozyten, Resorption nekrotischer/apoptotischer Zellen, sowie Infarktausdehnung sind hierbei entscheidende Abläufe, welche primär über eine Reihe von Zytokinen, freigesetzt von den geschädigten Herzmuskelzellen, mediiert werden. Dabei kommt es zur vermehrten Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (DETEN et al., 2002). Zudem ist die Hypoxie für die Bildung freier Radikale, auch Reactive Oxygen Species (ROS) genannt, verantwortlich, was wiederum die Freisetzung von Zytokinen veranlasst und zu einer direkten Schädigung von Kardiomyozyten und Endothel führt (LEFER et al., 2000). Auch eine Beteiligung adrenerger Stimuli an der Zytokinexpression wird propagiert (BÜRGER et al., 2001) Die Effekte der freigesetzten Zytokine sind mannigfaltig, synergistisch und teilweise ambivalent. Während

IL-1 $\beta$  die Kollagensynthese unterdrückt (SIWIK et al., 2000) ist IL-6 an der leukozytären Transmigration (ALI et al., 1999) und der Fibroblastenproliferation und damit an längerfristig ablaufenden Remodelingprozessen beteiligt. Die Wirkung von TNF- $\alpha$  hingegen erscheint ambivalent. Zum einen besitzt es über die Bindung an Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor 1 (TNF-R1) Apoptose stimulierende Eigenschaften (MAC EWAN et al., 2002) und übt direkte negativ inotrope Effekte aus (BOZKURT et al., 1998), zum anderen besitzt es über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zytoprotektive Wirkung (CHANDRASEKAR et al., 1997). Die entscheidende Rolle der Zytokine ist jedoch in der Rekrutierung leukozytärer Zellen zu sehen. Während der Infiltration von neutrophilen Granulozyten und deren Zytotoxizität ein erheblicher Anteil der Herzmuskelschädigung nach Reperfusion zuzuschreiben ist (JOLLY et al., 1986; LITT et al., 1989) ist die Einwanderung von Monozyten, die sich im Infarktgewebe zu Makrophagen differenzieren, und dort für die Phagozytose des nekrotischen Gewebes sorgen, essentiell für die beginnende Infarktheilung. Infolge der entzündlichen Reaktionen, in deren Verlauf es zur Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (insbesondere MMP 8, freigesetzt von neutrophilen Granulozyten) kommt (CLEUTJENS et al., 1995), lassen sich die ersten strukturellen Veränderungen am geschädigten Herzmuskel erkennen: MMP's sorgen für einen Abbau interzellulärer Kollagenverbindungen und damit für das Auseinandergleiten der Myozyten, was wiederum in einer Ausdehnung des Infarkts, auch Infarkt-Expansion genannt, resultiert (OLIVETTI et al., 1990). Das Ausmaß der Infarktausdehnung reicht von klinisch unauffälligen bis hin zu massiven Veränderungen mit Bildung von Aneurysmen oder gar Rupturen des linken Ventrikels (WEISMAN et al., 1988).

### 2.2.3.2 Remodelingphase

Neben den Alterationen die im Infarktareal stattfinden, unterliegt auch das nichtinfarzierte Myokard Umbauprozessen. Mit dem abruptem Verlust von kontraktilem Herzmuskelgewebe und dem plötzlichen Abfall des Schlagvolumens (SV) versucht das Herz zunächst über die Aktivierung von Sympathikus und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) sowie der Ausnutzung des Frank-Starling-Mechanismus ein ausreichendes Herzminutenvolumen (HMV) bei verminderter Ejektionsfraktion (EF) aufrecht zu erhalten. Dieser initiale Kompensationsmechanismus löst aber eine Dilatation des linken Ventrikels aus, die über die Erhöhung des Wandstress als Stimulus für die Hypertrophie des gesamten Herzens dient (PFEFFER et al., 1990). Während diese Mechanismen anfangs noch sinnvoll sind, ändert sich dies bei dauerhafter Aktivierung: Die gesteigerte Vor- und Nachlast belasten das Herz immer

mehr, die Myokardhypertrophie überschreitet eine kritische Grenze - ein Circulus vitiosus entsteht, der letztlich in myokardialer Insuffizienz resultiert. Einen Anteil an der fortschreitenden Dekompensation hat zudem die Ablagerung von Kollagen nicht nur im Infarktareal, sondern auch im „gesunden“ umliegenden Myokard, die zu einer zunehmenden Versteifung des Myokard mit vornehmlicher Relaxationsstörung führt. Ausgelöst wird dies über die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 aus geschädigten Myozyten, die über die Stimulation von Makrophagen zur Proliferation von Fibroblasten sowie zur Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten führt, welche letztlich mit einer Ablagerung von Kollagen Typ I und III vornehmlich in der Infarktzone, in geringerem Ausmaß aber auch im nichtinfarzierten Myokardgewebe, reagieren (SUTTON et al., 2000).



**Abb. 1:** Vereinfachte Veranschaulichung der Remodelingprozesse nach Myokardinfarkt (nach SUTTON et al., 2000) SV, Schlagvolumen; MMP's Matrixmetalloproteinasen; ECM, extrazelluläre Matrix; RAAS, Renin-Angiotensin-Aldosteron-System; AT II, Angiotensin II

### 2.2.4 Therapeutische Möglichkeiten

Der Remodelingprozess, der noch lange nach Infarktheilung andauert, und mit erhöhter Mortalität einhergeht, kann durch Modifikation der beeinflussenden Faktoren, wie Infarktgröße, Infarktheilung und ventrikulärer Wandstress, in seinem Ausmaß gebremst werden (HUTCHINS et al., 1978). Der effektivste Weg stellt hierbei sicherlich die Reduktion des initialen Gewebeschadens dar, was durch eine schnelle Reperfusion in Form von perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA), Thrombolyse oder koronarer Bypassoperation erreicht werden kann. Daneben lässt sich über pharmakologische Ansätze, insbesondere über die Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), Einfluss auf den ventrikulären Wandstress nehmen und damit eine Reduktion der myokardialen Umbauprozesse erzielen. Trotz des Einsatzes von mechanischer Intervention und Pharmakotherapie können beide nicht das ursächliche Problem des Herzmuskelzelluntergangs beheben, so dass es nicht verwunderlich ist, dass die momentan verfügbaren Therapiestrategien eine ventrikuläre Funktionsminderung oft nicht vermeiden können.

Seit einigen Jahren bemüht man sich, Stammzellen als Therapeutikum zu erforschen bzw. bereits in klinischen Studien einzusetzen, um eine kausale Therapie der Herzinsuffizienz zu erreichen. Die adulten Stammzellen bieten sich aufgrund ihres großen Potenzials und der Möglichkeit der Isolierung, Kultivierung und autologen Transplantation an. Zunächst muss man sich jedoch die Frage stellen, was transplantierte Stammzellen am infarzierten Herzmuskel leisten sollen. Denkbar wäre zum einen, Ersatz für die untergegangenen Kardiomyozyten zu generieren. Weitere Ansätze lägen z.B. in der Bereitstellung von Zellen, die an der Neovaskularisation beteiligt sind oder über parakrine Mechanismen (Antiapoptoseschutz u.a.) positive Einflüsse auf das Myokardgewebe ausüben können.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Studienprotokoll

Im Folgenden soll das zugrunde liegende Studienprotokoll kurz skizziert werden: Am Tag 0 wurde bei 124 acht bis zwölf Wochen alten weiblichen C57B16 Mäusen operativ ein Myokardinfarkt herbeigeführt. Nach 24 Stunden wurden 112 Tiere mit zuvor echokardiographisch geschätzter Infarktausdehnung  $\geq 30\%$  randomisiert um nachfolgend entweder unfraktionierte Knochenmarkszellen, unreife Lin<sup>-</sup>, reife Lin<sup>+</sup>-Zellen oder phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS) intrakardial injiziert zu bekommen. Mäuse bei denen echokardiographisch kein Myokardinfarkt erkennbar war, wurden als scheinoperierte, sogenannte Sham-Tiere, deklariert. Die Tiere wurden in der darauffolgenden Zeit wöchentlich gewogen und am Tag 21 sowie 42 nach Operation echokardiographiert. Am Tag 42 nach Operation erfolgte im Anschluss an die Echokardiographie die Tötung der Tiere.

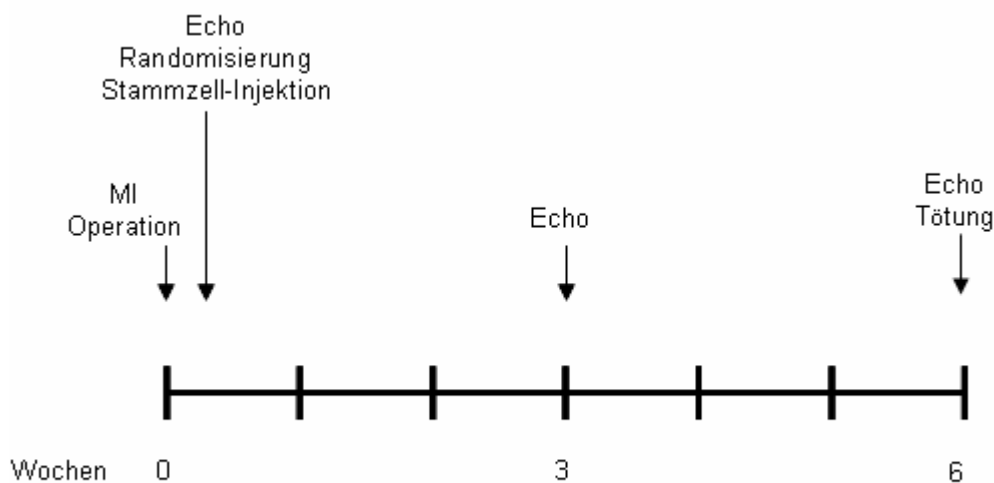


Abb. 2: Zeitlicher Studienaufbau

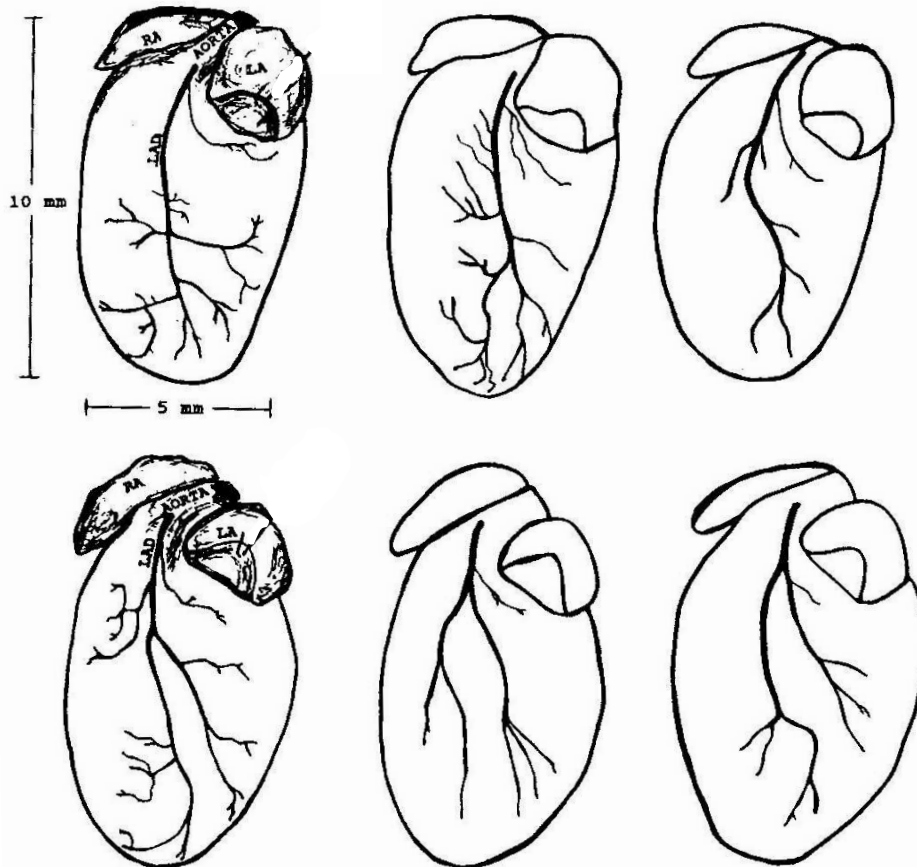
Das Tierschutzkomitee der Universität Würzburg hat das zugrunde liegende Studienprotokoll genehmigt. Die Untersuchungen entsprechen den Empfehlungen für die Haltung und Nutzung von Labortieren, die durch das Nationale Gesundheitsinstitut der USA herausgegeben wurden.

### 3.2 Versuchstiere

Verwendet wurden acht bis zwölf Wochen alte weibliche C57B16 Mäuse, bezogen von Charles River Laboratories (Sulzfeld, BRD), die zum Zeitpunkt des Versuchbeginns ein Körpergewicht von 20-25g aufwiesen. Die Tiere wurden bei 25°C und 52% Luftfeuchte in Käfigen zu zwei bis vier Tieren gehalten und mit handelsüblichen Nagetierfutter sowie Leitungswasser ad libitum versorgt. Licht und Dunkelheit wechselten im 12 Stunden Rhythmus.

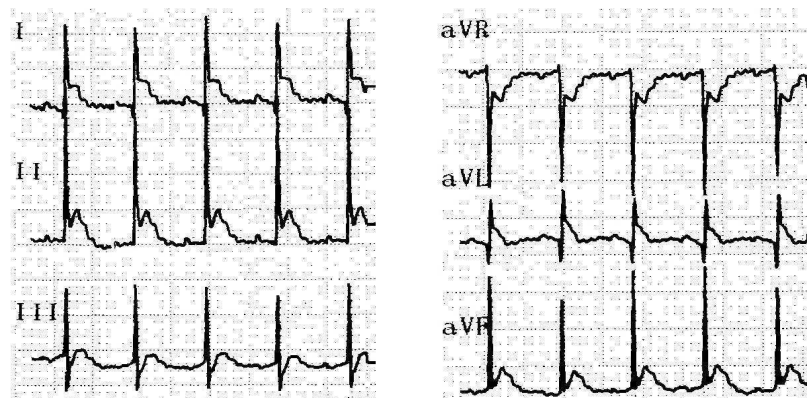
### 3.3 Herzinfarktchirurgie und Zellinjektion

Für die experimentelle Myokardinfarktinduktion wurde das Modell von Michael et al. herangezogen (MICHAEL et al., 1995). Die Mäuse wurden zunächst unter einer Etherglocke betäubt, anschließend mit einer Venenverweilkanüle (BD Venflon™ Pro, Beckton Dickinson, Heidelberg, BRD) intubiert und an ein Kleintierbeatmungsgerät (Mouse Ventilator, UGO BASILE biological research apparatus, Comerio, Italien) angeschlossen. Während der volumenkontrollierten Beatmung mit 10ml Atemzugvolumen bei einer Frequenz von 115/min wurde die Narkose mit Isofluran aufrecht erhalten, welches dem Sauerstoff zu einem Anteil von 1,5Vol% beigefügt wurde. Die narkotisierte Maus wurde auf dem Operationstisch in Rückenlage gelagert und an den Pfoten mit Klebeband an der Unterlage fixiert. Der Beatmungsschlauch wurde ebenfalls befestigt um eine Dislokation zu vermeiden. Die Elektroden des EKG-Geräts (cardiofax GEM, Nihon Kohden, Rosbach v.d.H., BRD) wurden angebracht und präoperativ ein EKG aufgezeichnet. Nachdem die chirurgische Toleranz geprüft worden war und keine Stellreflexe mehr auslösbar waren, wurde die OP mit einem linksthorakalen Hautschnitt zwischen dritter und vierter Rippe begonnen. Die Unterhaut wurde stumpf mobilisiert und an die Muskel- und Fasziengränder der durchtrennten Thoraxmuskulatur wurde je ein Haltefaden (Prolene 6-0, Ethicon, Norderstedt, BRD) gelegt, welcher nach Ankleben ein Offenhalten des OP-Gebietes ermöglichte. Nach dem stumpfen Durchtrennen der Musculi (Mm.) intercostales zwischen dritter und vierter Rippe wurde ein Wundspreizer eingeführt und das Perikard mit einem Mikrodissektor eröffnet. Die linke vordere absteigende Herzkranzarterie (Left descending artery = LAD) wurde aufgesucht und unter mikroskopischer Sicht (OPMI1-FR, Carl Zeiss, Oberkochen, BRD) mittels chirurgischen Nahtmaterials (Perma-Hand Seide 6-0, Ethicon, Norderstedt, BRD) proximal ligiert (siehe Abb. 3).



**Abb. 3:** Schematische Zeichnung der häufigsten Verlaufsformen der LAD bei der Maus. Obere Reihe: Verlaufsmuster mit einem großen Hauptgefäß. Untere Reihe: Verlaufsmuster mit früher Bifurkation. Die operative Ligation der LAD erfolgte zwischen rechten (RA) und linken (LA) Herzhohr (nach Michael et al., 1995).

Da eine direkte Sicht der LAD bei der Maus suboptimal ist, wurde durch eine weitere EKG Aufzeichnung überprüft, ob die Ligation erfolgreich war.



**Abb. 4:** EKG-Aufzeichnung zur Kontrolle der erfolgreichen Koronarligation. Die einsetzende Ischämie und die erfolgreiche Ligation der LAD ist erkennbar an den deutlichen ST-Hebungen in den Ableitungen I, II und aVL.

Anschließend wurde der Brustkorb durch Faszien- und Hautnaht wieder verschlossen, die Narkose beendet und der Beatmungstubus konnte bei suffizienter Eigenatmung entfernt werden. Danach wurden die Tiere zurück in den Isolator (Scantainer, Scanbur A/S, Karlslunde, Dänemark) gesetzt, der auf 25°C und 35% Luftfeuchte eingestellt war. Zur Schmerzausschaltung erhielt jedes Tier eine intramuskuläre Buprenorphin-Injektion (Temgesic) von 0,06 mg.

Zur Kontrolle wurde ein Teil der Mäuse nur scheinoperiert. Hierfür wurde der oben beschriebene Zugangsweg gewählt, wobei die Arterie aber lediglich umstochen wurde und keinerlei Ligatur erfolgte. Somit entstand auch kein erkennbarer Myokardinfarkt. Sinn dieser Scheinoperation ist es, zwischen den Auswirkungen des Myokardinfarkts und der Operation an sich unterscheiden zu können.

Nach 24 Stunden wurden 112 Tiere mit einer geschätzten Infarktausdehnung über 30% randomisiert um entweder unfraktionierte Knochenmarkszellen, unreife, sogenannte Lin<sup>-</sup>- oder reife Lin<sup>+</sup>-Zellen von männlichen Mäusen ( $5 \times 10^5$  Zellen in 50 µl PBS), oder PBS über intrakardiale Injektion zu erhalten. Hierzu wurden die Tiere erneut narkotisiert, intubiert und beatmet, der Brustkorb wurde über den gleichen Zugangsweg wieder geöffnet und die Zellen wurden unter mikroskopischer Sicht (OPMI1-FR, Carl Zeiss, Oberkochen, BRD) in den linken Ventrikel injiziert, wodurch eine sichere Applikation gewährleistet ist.

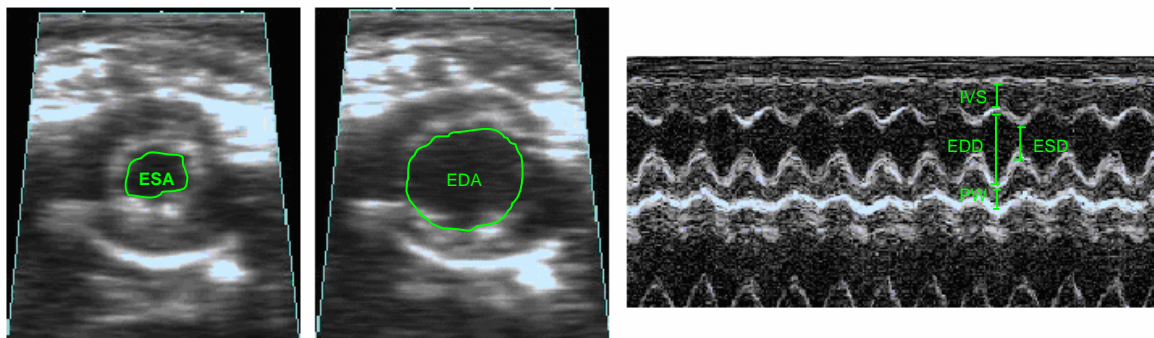
#### 3.4 Echokardiographische Untersuchung

Die Echokardiographie erlaubt als nicht invasive Untersuchungsmethode die Darstellung der zyklischen Bewegungsabläufe des Herzens sowie eine qualitativ/quantitative Beurteilung von Herzgröße, Wanddicken, Herzklappen und Funktionalität. Insbesondere für die serielle Verlaufsbeobachtung linksventrikulärer Parameter und damit der Einschätzung von Remodelingprozessen ist es ein etabliertes und standardisiertes Verfahren.

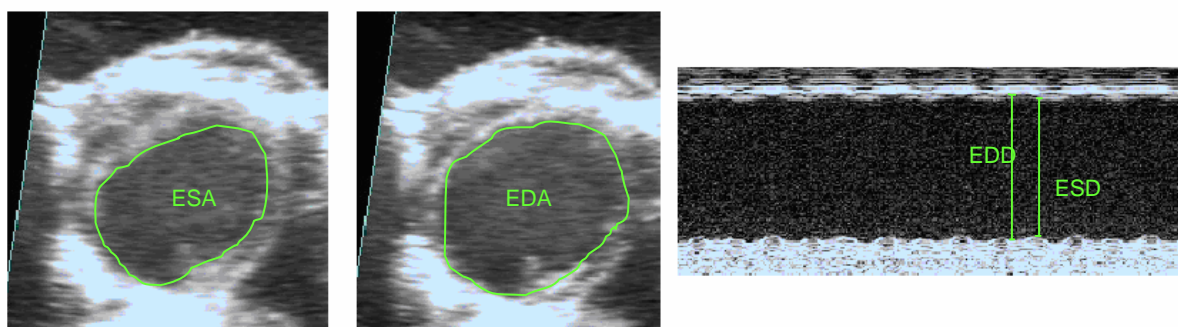
Für die echokardiographischen Untersuchungen, die am Tag 1, 21 und 42 nach Infarktinduktion durchgeführt wurden, war eine Narkose der Tiere notwendig. In der vorliegenden Arbeit wurde eine leichte Kurzanästhesie mit Isofluran bei spontaner Eigenatmung gewählt. Zunächst erfolgte die Narkoseeinleitung bei einer Konzentration von 4% Isofluran ad 100% Sauerstoff. Sobald keine Abwehrreaktion mehr auslösbar war, wurde die Konzentration des Inhalationsnarkotikums auf 0,4-1% gesenkt. Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage an den Extremitäten mit Heftpflaster fixiert und der Thorax wurde mit handelsüblichen Enthaarungsschaum enthaart. Die Echokardiographie wurde mittels eines



Toshiba Aplio Gerätes mit 15 MHz Schallkopf unter Verwendung von Übertragungsgel (Aquasonic 100, Parker, Hellendoorn, Niederlande) durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in der parasternalen Kurzachse auf zwei definierten anatomischen Levels bei zeitgleicher Erfassung der Herzfrequenz: in Höhe der Herzspitze und auf mittlerer Papillarmuskelebene. Mit ersterer können Veränderungen in der Infarktregion, mit letzterer im Bereich des überlebenden nicht infarzierten Myokards festgestellt werden. Hierzu wurden auf beiden Ebenen sowohl im 2D B-Mode als auch im eindimensionalen M-Mode die endokardialen systolischen und diastolischen Grenzen bestimmt. Von besonderem Interesse, da für das Remodeling entscheidende Parameter, sind die dabei im B-Mode gemessene linksventrikuläre endsystolische Fläche (ESA) und enddiastolische Fläche (EDA) sowie der im M-Mode bestimmte linksventrikuläre endsystolische Durchmesser (ESD) und enddiastolische Durchmesser (EDD) (siehe Abb. 5)



Sham-Tier



Tier mit großem Myokardinfarkt

Abb. 5: Beispielhafte echokardiographische B-Mode Bilder in Endsystole (links), Enddiastole (mitte) sowie M-Mode (rechts) auf Papillarmuskelebene von Sham-Tier (oben) und Tier mit großem Myokardinfarkt (unten). Das Infarkttier zeigt im Vergleich zum Sham-Tier wesentlich vergrößerte ESA, EDA, ESD und EDD als Zeichen einer massiven Dilatation des Herzens und gleichzeitig stattfindenden Remodeling. Zudem ist die stark verminderte systolische Durchmesserverkürzung des Infarktieres auffällig.

ESA = Endsystolische Fläche, EDA = Enddiastolische Fläche, ESD = Endsystolischer Durchmesser, EDD = Enddiastolischer Durchmesser, IVS = Interventrikularseptum, PW = Hinterwand

Unter Verwendung des gemessenen ESD und EDD ist es möglich die prozentuale systolische Durchmesserverkürzung des linken Ventrikels (fractional shortening = % FS) als 2D-Parameter zu ermitteln ( $\% \text{ FS} = \text{EDD} - \text{ESD} / \text{EDD}$ ).

Die Auswertung aller echokardiographischen Aufnahmen erfolgte ohne Wissen um die Behandlung des jeweiligen Tieres off-line unter Verwendung eines off-line Analyse Systems (NICE, Toshiba Medical Systems, Niederlande). Die Ergebnisse wurden durch Mittelwertbildung aus drei Einzelmessungen gewonnen.

#### 3.5 Probensammlung

Nach Durchführung der Echokardiographie wurden die Tiere am Tag 42 nach Injektion mittels einer intraperitoneal applizierten Überdosis von Tribromoethanol/Amylene Hydrat (Avertin) getötet. Zur Entnahme der Herzens wurde der Thorax eröffnet und das Herz mitsamt thorakaler Aorta entnommen. Nach Säuberung des Herzens von Geweberesten wurde es vor der weiteren Verarbeitung gewogen. Die weitere Präparation, die in steriler Kochsalzlösung durchgeführt wurde, erbrachte eine Trennung des Herzens in rechten und linken Vorhof, sowie rechten und linken Ventrikel, wobei das Septum am linken Ventrikel belassen wurde. Die beiden Vorhöfe wurden verworfen und von den Ventrikeln wurde jeweils das Gewicht bestimmt. Vom linken Ventrikel wurden drei Querschnitte angefertigt: Spitze, mittlerer Ring (ca. 3mm) und Basis. Herzspitze sowie rechter Ventrikel wurden in flüssigem Stickstoff, mittlerer Ring in Formalin und Basis in 2-Methylbutan gelegt. Anschließend wurden die Herzteile einzeln in Eppendorfcups gegeben, auf Trockeneis gelegt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für die nachfolgenden immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchungen gelagert.

#### 3.6 Infarktgrößenbestimmung

Zur Infarktgrößenbestimmung wurde der mittlere Ring herangezogen, der zunächst nach histologischen Standardverfahren paraffiniert wurde. Mittels Schlittenmikrotom (HN 40, Reichert-Jung, Heidelberg, BRD) wurden  $5\mu\text{m}$  dicke Präparate angefertigt, die nach Streckung im warmen Wasserbad und anschließender Transferierung auf Objektträger (Thermo Superfrost plus, Fa.Menzel, Braunschweig, BRD) über Nacht im Wärmeschrank bei  $56-58^{\circ}\text{C}$  zum Trocken kamen. Am Folgetag war zur Entparaffinierung der Schnitte zunächst ein jeweils fünfminütiges Bad in den Lösungen der Reihenfolge Xylol I, II, III, Xylol und

Alkohol abs. (1:1), Ethanol 100%, 95%, 50% nötig. Als Färbreagenzien diente gesättigte Pikrinsäure und Sirius-Rot 1% (1g Sirius-Rot auf 100ml Aqua destillata) (Firma Sigma-Aldrich, München, BRD). Der Ansatz bestand aus 90ml Pikrinsäure und 10ml Sirius-Rot-Lösung, welcher mindestens 24 Stunden vor Gebrauch hergestellt wurde. Die Präparate wurden 30 min gefärbt und anschließend mehrfach in Aqua destillata gespült. Das Entfärben erfolgte in aufsteigender Alkoholreihe mit Ethanol 50%, 75% und 95% über 1-2 Minuten. Daraufhin bedurfte es einer Überführung in Xylol und Ethanol (1:1), Xylol I, II, III für jeweils 5 Minuten. Zuletzt erfolgte das Eindecken mit Entellan (Entellan, Merck, Darmstadt, BRD). Die Schnitte wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 2, Jena, BRD) bei 2,5x Vergrößerung mit einer integrierten Kamera (Visitron Systems Model 14.2 Color Mosaic, Puchheim, BRD) abfotografiert. Transmurale, das heißt durchgehend vom Epikard zum Endokard reichende, rot gefärbte Areale wurden als Infarktgebiet definiert. Vor den Infarktgrößenmessungen erfolgte zunächst die Kalibrierung des Maßstabs mit Hilfe eines Eichbildes. Die Infarktgröße konnte dann am Computer mittels planimetrischer Messung unter zur Hilfenahme eines digitalen Bildanalysators (ImageJ) durch manuelles Umfahren der Grenzlängen von infarzierter und nicht infarzierter Endo- und Epikardialer Oberfläche und nachfolgender Berechnung gestellt werden:

$$\text{Infarktgröße [\%]} = (\text{Endokard Infarkt [\%]} + \text{Epikard Infarkt [\%]}) / 2$$

$$\text{Endokard Infarkt [\%]} = \text{Infarktareal Endokard [mm]} / \text{Areal Endokard gesamt [mm]} \times 100$$

$$\text{Epikard Infarkt [\%]} = \text{Infarktareal Epikard [mm]} / \text{Areal Epikard gesamt [mm]} \times 100$$



Abb. 6: Infarktgrößenbestimmung

Links: Foto eines PSR-gefärbten Herzchnitts auf mittlere Ebene. Transmural rot gefärbte Abschnitte markieren das Infarktareal. Ungefärbt stellt sich das intakte Myokardgewebe dar.

Rechts: Markierung von infarzierter und nicht infarzierter endo- und epikardialer Oberfläche zur Berechnung der Infarktgröße.

Nur Tiere bei denen eine histologische Infarktgröße über 30% vorlag, wurden für weitere Analysen herangezogen.

#### 3.7 Zellpräparation

Knochenmarkszellen wurden aus Tibia und Femur von männlichen C57/B16 Mäusen gewonnen. Um bei der nachfolgenden Zellseparation ein unspezifisches Bindungsverhalten der hierbei verwendeten Antikörper zu verhindern, wurden zunächst die Fc Rezeptoren der Knochenmarkszellen mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das CD32/16 Oberflächenprotein (2.4G2) geblockt. Anschließend wurde mit Hilfe von Ratten IgG Antikörpern, die gegen Oberflächenmarkern von reifen hämatopoetischen Zellen gerichtet waren, eine Markierung von Lin<sup>+</sup>-Zellen vorgenommen. Im Einzelnen handelte es sich um Antikörper gegen B220 (Oberflächenmarker v.a von B-Zellen, aber auch NK-Zellen, aktivierte T-Zellen, Subpopulationen von dendritischen Zellen), Gr-1 (Expression durch Granulozyten und Makrophagen), Mac-1 (Makrophagenzellmarker), CD4, CD8 (beides T-Zellmarker) und Ter-119 (Erythrozytenmarker). Für die nachfolgende Trennung von Lin<sup>+</sup>- und Lin<sup>-</sup>-Knochenmarkszellen wurde die Methode der magnetischen Zellseparation (MACS) angewandt. Hierfür erfolgte die magnetische Markierung der bereits mit den primären Antikörpern beladenen Lin<sup>+</sup>-Zellen durch Konjugate aus anti-Ratten IgG der Ziege und

superparamagnetischen Partikeln, genannt Microbeads. Diese bestehen laut Angaben des Herstellers Miltenyi Biotec aus Dextranpolymeren, die mit Eisenoxid beschichtet sind und bei einer Partikelgröße von durchschnittlich 50nm keinerlei Einfluss auf Struktur, Funktion oder Aktivitätsstatus der markierten Zellen nehmen. Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine Trennsäule, die eine Matrix aus ferromagnetischen Stahlkügelchen besaß, gegeben und in Kombination mit einem von außen angebrachten Permanentmagneten konnte ein Hochgradientmagnetfeld erzeugt werden, das eine Zellseparation ermöglichte. Hierbei wurden aufgrund des Magnetfeldes die mit Microbeads beladenen  $\text{Lin}^+$ -Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten  $\text{Lin}^-$ -Zellen die Säule ungehindert passieren konnten und als  $\text{Lin}^-$ -Zellfraktion gesammelt wurden. Nach Entfernung des Magnetfeldes und nachfolgender Spülung konnte auch die  $\text{Lin}^+$ -Knochenmarkzellpopulation gewonnen werden.

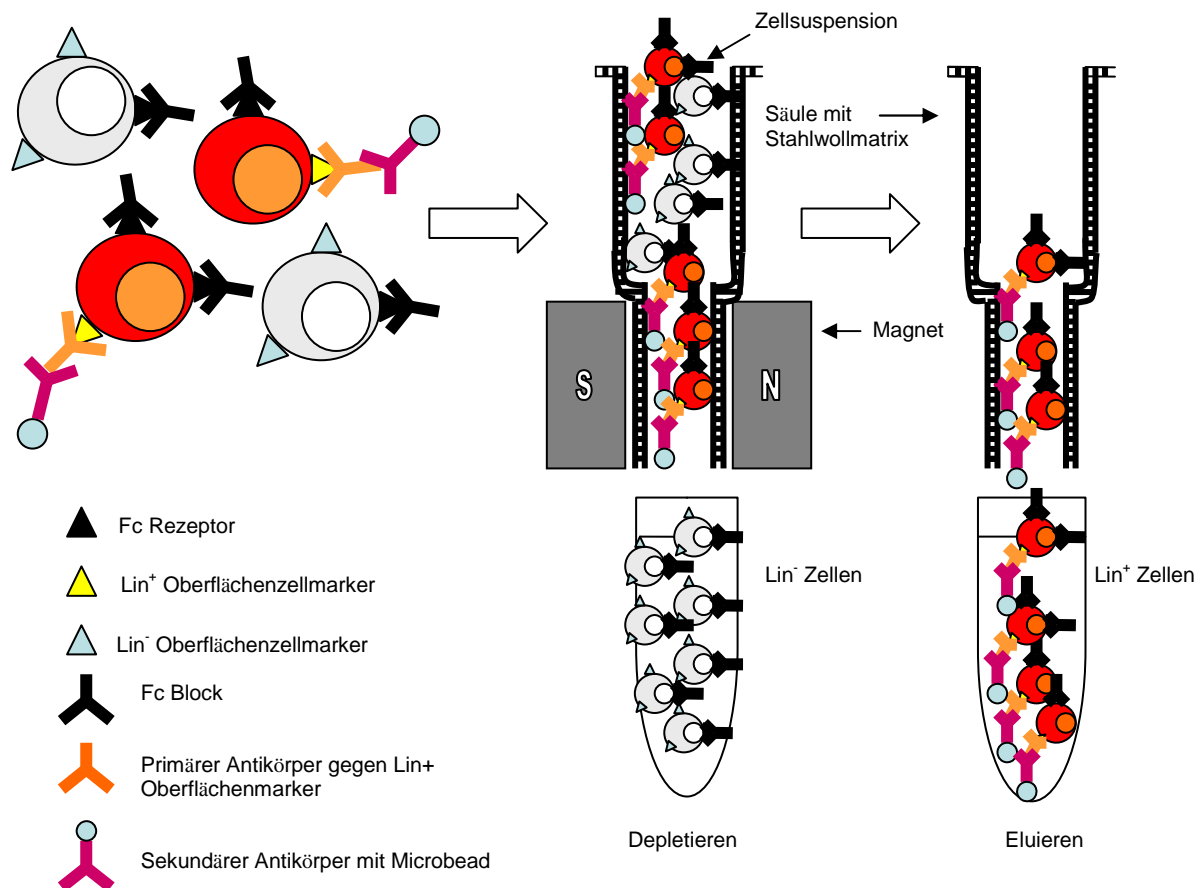


Abb. 7: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation. Fc Rezeptoren der Knochenmarkszellen werden mittels Fc Block abgedeckt. Primäre Antikörper binden an spezifische Oberflächenmarker reifer  $\text{Lin}^+$  Zellen. Sekundäre Antikörper, die mit Mikrobeads beladen sind, binden wiederum an die primären Antikörper. Die Zellsuspension wird nun über eine spezielle Trennsäule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Magnetisch unmarkierte  $\text{Lin}^-$  Zellen passieren die Säule ungehindert, während die markierten  $\text{Lin}^+$  Zellen zunächst zurückgehalten werden und erst nach Entfernung des Magnetfeldes eluiert werden können.

### 3.8 Y-Chromosom Detektion

Um die erfolgreiche Zelltransplantation der männlichen Spendertiere nachzuweisen und deren Ausmaß einzuordnen war eine spezifische Y-Chromosomen Detektion nötig. Hierfür erfolgte zunächst die Gewinnung von genomischer DNA aus dem infarzierten und nichtinfarzierten Anteil des linken Ventrikels sowie aus dem rechten Ventrikel. Mit diesem Gewebe wurden anschließend konventionelle und Real-Time PCRs unter Verwendung von Y-Chromosomen spezifischen Primern durchgeführt. Alle PCR Reaktionen enthielten zudem Primer, die spezifisch für das Myogenin-Gen waren, um eine interne PCR Kontrolle sicherzustellen. Für eine semiquantitative Y-Chromosomen Detektion wurde der Southern Blot herangezogen.

### 3.9 Parakrine Sekretion von Zytokinen

Mit dem Wissen, dass Knochenmarksstammzellen über parakrine Sekretion von Zytokinen in der Lage sind das ischämische Herz zu schützen und linksventrikulärem Remodeling entgegenzuwirken (UEMURA et al., 2006), bestimmten wir die Level verschiedener Zytokine in Kulturmedien von magnetisch separierten Lin<sup>-</sup>, Lin<sup>+</sup>- bzw. unfraktionierten Knochenmarkszellen. Hierfür wurde von jeder Zellfraktion in Dreifachbestimmung mit je  $1 \times 10^5$  Zellen pro Probe eine Zellkultur für 24 Stunden in 200µl Volumen angelegt. Als Kontrolle diente Kulturmedium ohne Zellen, womit eine Untersuchung von Hintergrund Zytokin Profilen möglich war. Die Zytokine [Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-17, Granulozyten Kolonie-Stimulations Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen Kolonie-Stimulations Faktor (GM-CSF), Interferon (IFN)- $\gamma$ , Keratinozyten-abstammendes Chemokin (KC), Makrophagen Inflammatorisches Protein (MIP) 1 $\alpha$ , RANTES, Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$ ] wurden mit Bioplex cytokine assays (Bio-Rad, München, Deutschland; Immumed GmbH, München, Deutschland) in Übereinstimmung mit dem Herstellerprotokoll gemessen.

### 3.10 Biochemische Nachweise

Als molekularer Marker für Myokardhypertrophie sollte der Gehalt von  $\beta$ - und  $\alpha$ MHC (myosin heavy chain) im infarzierten Myokardgewebe gemessen werden. Normalerweise lässt sich im adulten Mäuseherz eine Prädominanz von  $\alpha$ MHC gegenüber  $\beta$ MHC finden, die sich aber bei Eintritt von Myokardhypertrophie bzw. Herzinsuffizienz zu Gunsten der  $\beta$ -Isoform umdreht (JONES et al., 1996). Da wegen der geringen Mengen eine direkte Messung der

MCH Isoformen zu ungenau wäre, wählten wir eine indirekte Methode bei der wir zunächst RNA aus dem Gewebe extrahierten, anschließend in cDNA umschrieben, um dann per Real Time PCR eine Quantifizierung der im Gewebe enthaltenen  $\alpha$ - und  $\beta$ MHC mRNA's zu erhalten.

#### *3.10.1 RNA-Extraktion*

Die RNA-Gewinnung erfolgte in mehreren Einzelschritten bestehend aus Gewebehomogenisierung, Phasenseparation, RNA-Präzipitation, RNA-Waschung und RNA-Rekonstruktion. Zuletzt wurde der RNA-Gehalt der Probe photometrisch quantifiziert. Da bei allen Schritten die Gefahr bestand, dass die RNA durch in der Umgebung vorhandene RNAsen zersetzt wird, wurden nur direkt vorher autoklavierte Reaktionsgefäße benutzt und statt des üblichen destillierten Wassers wurde Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser verwendet, welches die Aktivität von RNAsen zerstört.

Zunächst wurde von den entnommenen Herzen ein etwa 150mg schweres gefrorenes Gewebestück aus der Herzspitze mit einem über Nacht im DEPC-Reagenz inkubierten und autoklavierten Homogenisierungsstab (Ultra Turrax Stab, Janke&Kunkel-IKA Labortechnik, Staufen, BRD) in 1ml Trizol-Reagenz (TRIZOL®Reagent, invitrogen, Karlsruhe, BRD) 30 bis 40 Sekunden lang homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Trizol, eine Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, führt dabei eine Auflösung von Zellwänden und anderen zellulären Strukturen herbei, ohne die Integrität der RNA zu beeinflussen. Für die Phasenseparation wurden 200 $\mu$ l Chloroform (Trichlormethan/Chloroform, Carl Roth, Karlsruhe, BRD) zur Probe pipettiert, die Probe für ca. 15 Sekunden kräftig geschüttelt, 2 bis 3 min inkubiert und dann über 15 min bei 10000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert (Zentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, BRD). Chloroform trennt dabei die Lösung in eine wässrige und eine organische Phase. Der wässrige Überstand enthält dabei die Gesamt-RNA, Proteine finden sich in der unteren organischen Phase während sich DNA und zelluläre Bestandteile dazwischen ansammeln. Der wässrige Überstand wurde anschließend abpipettiert und der Trennschritt mit Chloroform wurde noch zweimal wiederholt. Für die RNA-Präzipitation wurde 0,5ml Isopropranolol (2-Propranolol getrocknet, Merck, Darmstadt, BRD) zur Probe gegeben, diese kurz hin- und herbewegt, bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert und dann bei 10000 Umdrehungen pro Minute für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Vom erhaltenen RNA-Pellet wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und verworfen. Die RNA-Waschung erfolgte mit 1ml 75% iger EtOH-DEPC-Lösung (Ethanol absolute, J.T.

Baker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, BRD), die zum Pellet dazugegeben wurde. Danach erfolgte die Zentrifugation über 10 min bei 13000 Umdrehungen und 4°C. Nach Abkippen und Verwerfen des Überstandes wurde die Probe bei Raumtemperatur für 10-20 min getrocknet. Die RNA-Rekonstruktion erfolgte anschließend in 10µl DEPC-H<sub>2</sub>O. Abschließend wurde der RNA-Gehalt der Probe mittels photometrischer Messung (Ultraspec 3100 pro, Healthcare Europe, München, BRD) quantifiziert.

#### 3.10.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Diese spezifische RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt hierzu als Startpunkt einen Primer (kurzer, komplementärer DNA-Abschnitt) um ausgehend von diesem durch Anlagerung von Desoxynukleotiden den zur RNA komplementären cDNA-Strang zusammenzusetzen. Falls die cDNA aus der Gesamt-RNA einer Gewebeprobe hergestellt werden soll, so werden unspezifische Primer, meist Oligo-dT-Nukleotide (10-15 Desoxythymidine), die komplementär zum Poly-A-Schwanz der RNA sind, oder random Hexamer-Oligonukleotide (bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Oligonukleotiden) verwendet. Für das Umschreiben einer bestimmten RNA werden spezifische Primer eingesetzt.

Da bei jeder RNA-Isolation immer ein wenn auch nur geringer DNA Anteil in der Probe verbleibt, der bei der nachfolgenden quantitativen Real-Time PCR zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann, setzen wir dem Schritt der eigentlichen cDNA-Synthese den DNA-Verdau mittels DNase voraus. Pro Probe wurden hierzu 1µg RNA, 1µl 10xReaktion Puffer (10xReaction Puffer, Sigma-Aldrich, Hamburg, BRD) und 1µl DNase I (Amplification Grade DNase I, Sigma-Aldrich, Hamburg, BRD) in ein RNase freies Reaktionsgefäß (Eppendorf-Cup, Eppendorf, Hamburg, BRD) gegeben und das Gemisch mit destilliertem Wasser auf 10µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch darauffolgende Zugabe von 1µl EDTA haltiger Stop-Solution (Stop-Solution, Sigma-Aldrich, Hamburg, BRD) und 10 minütiger Inkubation bei 70°C auf dem Wärmeblock wurde die DNase I durch Chelatierung von Calcium- und Magnesiumionen inaktiviert und hitzebedingt denaturiert. Zudem führte das Aufheizen zu einer Denaturierung sekundärer RNA-Strukturen, welche bei der Reversen Transkription hinderlich sind.

Für die Herstellung der cDNA wurden zu der zuvor hergestellten 11µl DNase-Lösung 4µl 5xcDNA Synthese kit Puffer (iScript 5xcDNA Synthese kit Puffer, BioRad Laboratories,



München, BRD), welcher eine einheitliche Mischung aus Oligo-dT und random primers enthält, sowie 1µl Enzymmix (bestehend aus Reverser Transkriptase und RNase Inhibitor) (iscript enzyme mixture, BioRad Laboratories, München, BRD) und 4µl destillierten Wasser hinzugefügt. Das Gemisch wurde dann in einer PCR-Maschine (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, BRD) zuerst für 5 min auf 25°C erwärmt, anschließend 30 min bei 42°C inkubiert und dann für 5 min auf 85°C erhitzt. Abschließend erfolgte eine Kühlung der Proben auf 4°C.

#### 3.9.3 Realtime-PCR

Die Realtime-PCR stellt, beruhend auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion, eine Vervielfältigungsmethode vorhandener DNA dar, wobei hier zusätzlich eine gleichzeitige Quantifizierung der DNA möglich ist. Die PCR besteht grundsätzlich aus einer Anzahl von ca. 25-50 Zyklen mit jeweils drei Einzelschritten: Zuerst erfolgt bei 94-96°C durch Aufbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in ihre beiden Einzelstränge. Durch Senkung der Temperatur auf 55-65°C wird eine Hybridisierung der zugegebenen Primer an die vorhandene DNA ermöglicht. Ein Vorgang der auch als Primer-Annealing bezeichnet wird. Die Primer entsprechen dabei dem 5`- bzw. 3`-Ende des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts. Von diesen Startsequenzen ausgehend setzt die DNA-Polymerase bei 68-72°C durch Verwendung der beigemischten dNTPs (Deoxyribonukleotidtriphosphate) einen zum bereits vorhandenen komplementären Einzelstrang zusammen. Insgesamt kommt es also innerhalb eines Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation, zur Verdoppelung des genetischen Ausgangsmaterials und durch Durchlaufen mehrerer Zyklen zur exponentiellen Vermehrung der DNA-Ausgangsmenge.

Die Quantifizierung der DNA Menge bei der Realtime-PCR wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die wiederum eine Verwendung spezifischer Sonden nötig machen. Dazu gehören u.a. sogenannte TaqMan-Sonden, bestehend aus einer zum untersuchenden Zielgen komplementären Oligonukleotidsequenz mit Reporterfluoreszenzfarbstoff am 5`- und Quencherfarbstoff am 3`-Ende. Wird die Sonde durch Licht der Wellenlänge 488nm angeregt, so wird bei intakter Sonde die fluoreszierende Emission des Reporters durch den Quencher mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) unterdrückt. Trifft die Taq-Polymerase nun während eines PCR-Zyklus auf die mit dem komplementären DNA Strang hybridisierte Sonde so baut sie aufgrund ihrer 5`-3`-Exonukleaseaktivität das 5`-Ende der Sonde ab.

Dadurch kommt es zur räumlichen Trennung zwischen Reporter und Quencher und das Fluoreszenzemissionsspektrum des Reporters kann nunmehr gemessen werden.

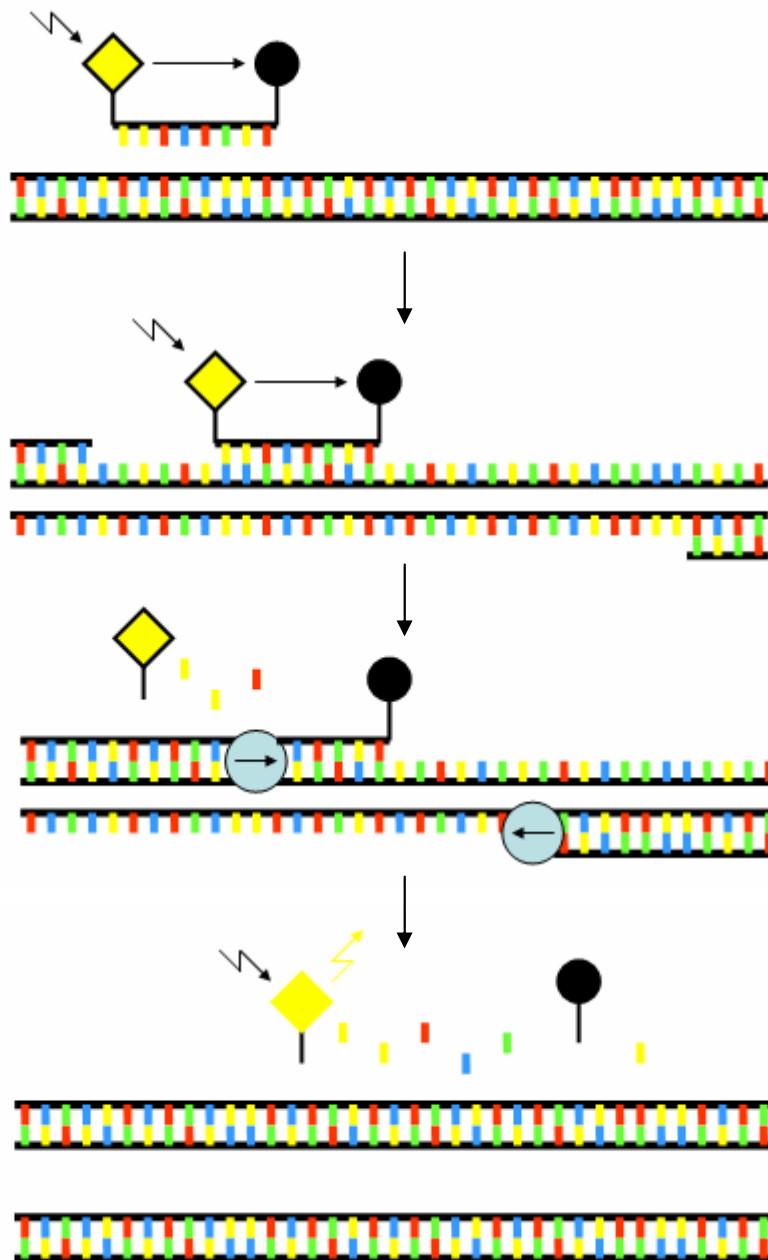
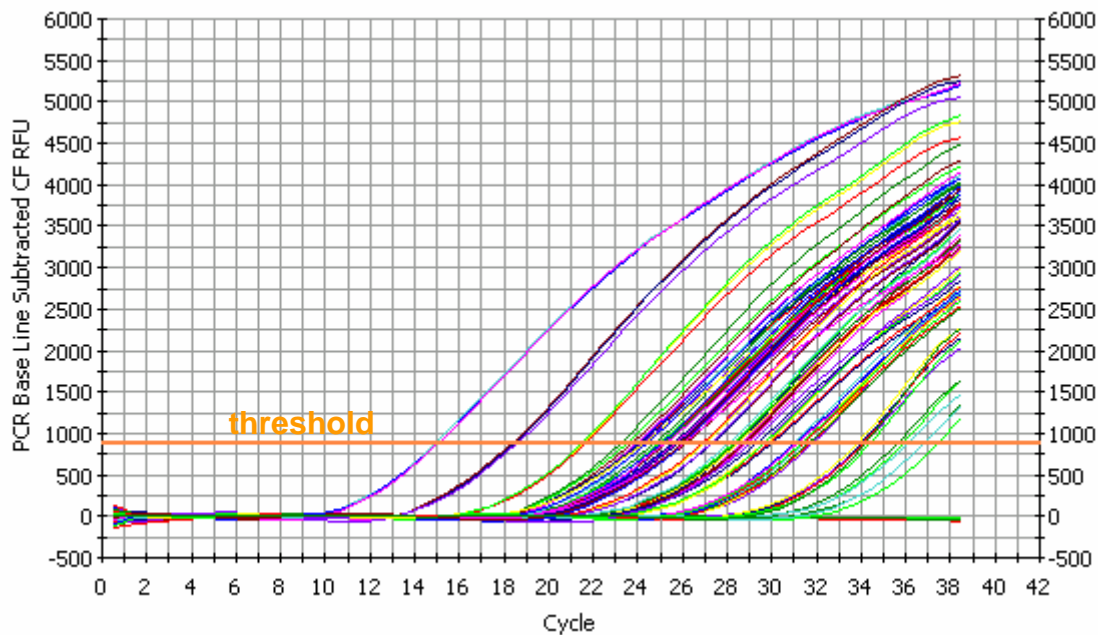


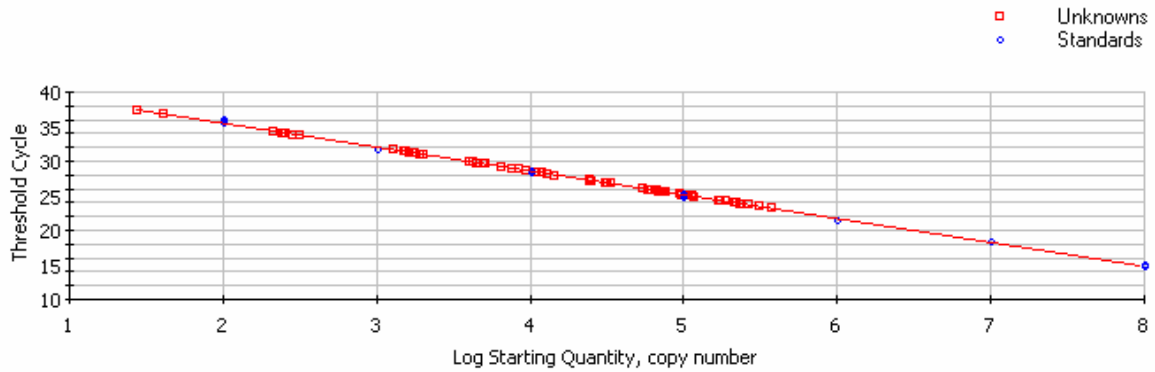
Abb. 8: Schematische Darstellung der Realtime-PCR mittels TaqMan-Sonden. Der vorgegebene cDNA-Doppelstrang wird zunächst denaturiert und in zwei Einzelstränge aufgeteilt. Anschließend erfolgt die Anlagerung der Primer und der TaqMan Sonde, welche am 5`-Ende einen Reporter- und am 3`-Ende einen Quencherfarbstoff trägt, an das Template. Bei intakter Oligonukleotidsonde wird die Fluoreszenzemission des Reporters durch den Quencher mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Führt die DNA-Polymerase bei der Elongation des DNA-Stranges zu einer Trennung von Reporter und Quencher läuft die Fluoreszenzemission des Reporters ungehindert ab und kann durch Messung als Maß für die amplifizierte DNA-Menge dienen. Nach Abschluss des Reaktionszyklus liegt die DNA erneut als Doppelstrang vor und kann im darauffolgenden Zyklus erneut als Template verwendet werden.

Geht man von einer 100% Effizienz der PCR aus, so kommt es parallel zum exponentiellen Anstieg der DNA-Menge auch zur exponentiellen Zunahme der Fluoreszenzsignalstärke. Der Zyklus, bei der die Fluoreszenzsignalstärke erstmalig über dem Wert der Hintergrundfluoreszenz ansteigt wird als sogenannter CT-Wert (threshold-Cycle = Schwellenwertzyklus) angegeben. Dabei verhält sich dieser umgekehrt proportional zum Logarithmus an eingesetzter DNA. So entspricht ein um eine Einheit geringerer CT-Wert der doppelten Menge an Ausgangs-DNA, respektive RNA Startmenge.



**Abb. 9:** Beispielhafte Darstellung eines RT-PCR Amplifikations-Zyklus-Graphen. Das Fluoreszenzsignal der unterschiedlichen Proben wird gemessen und gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Zykluszahl, bei der das Signal erstmals das Grundrauschen, markiert durch die threshold-Schwelle, überschreitet, stellt den CT-Wert dar. Dieser ist umso niedriger, je mehr DNA in der Ausgangsmenge vorhanden war. Im vorliegenden Beispiel überschreiten die Kurven ganz links bereits nach 15 Zyklen die Schwelle (CT-Wert =15) und enthielten damit am meisten Ausgangs-DNA, während die Kurve am rechten Bildrand erst nach 37 Zyklen die Schwelle übertrifft (CT-Wert = 37) und damit am wenigsten Ausgangs-DNA besessen hat.

Will man anstelle der relativen Vergleichswerte der CT-Wert-Bestimmung absolute Mengenangaben erhalten, so lässt sich dies erreichen, indem ein klonierter Standard mit bekannter DNA Konzentration mehrfach verdünnt wird und die CT-Werte der Verdünnungsreihe zusätzlich zu denen der Proben in der Real-Time PCR Reaktion mitgemessen werden. Durch anschließendes Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den gemessenen CT-Wert für jede Probe der Standardreihe lässt sich eine Standardkurve konstruieren, anhand derer für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden kann.



**Abb. 10:** Entsprechende Standardkurve mit Auftragung der unbekanntenen Proben. Durch die Messung einer Standardreihe mit bekannter Konzentration (hier  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  usw.) kann aus den erhaltenen CT-Werten eine Standardkurve erstellt werden, auf der dann die unbekanntenen Proben (Unknowns) anhand ihrer CT-Werte eingeordnet werden können. Somit lassen sich die absoluten Konzentrationswerte der unbekanntenen Proben von der Kurve ablesen und eine quantitative Aussage zur Ausgangs-DNA-Menge ist möglich.

Um eine höhere Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse zueinander zu erlangen, wird die Expression eines Zielgens auf ein weiteres sogenanntes Housekeeping-Gen bezogen, dessen Expression proportional zur Gesamtgenexpression einer Zelle ist. Dieser Vorgang wird auch Normalisierung der Expressionsergebnisse genannt. Dazu wird der CT-Wert des Referenzgens vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert bzw. bei Verwendung einer Standardkurve die errechnete Kopienzahl des Zielgens durch die Kopienzahl der internen Referenz dividiert. Der Vorteil dieser relativen Quantifizierung besteht darin, dass man Ergebnisse erhält, die unabhängig von der Gesamtproteinproduktion der Zelle sind, und die zudem eine niedrige Varianz aufweisen, da Störfaktoren wie unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der Realtime-PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen als auch das Housekeeping-Gen betreffen. GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und  $\beta$ -Aktin sind die dabei am meisten zur Normierung herangezogenen Housekeeping-Gene.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Durchführung der Realtime-PCR zunächst aus den Ausgangsverdünnungen der klonierten Standards von  $\alpha$ - und  $\beta$ MHC sowie 18S, welche jeweils  $2 \times 10^8$  Moleküle/ $\mu$ l enthielten, eine zehnfache Verdünnungsreihe ( $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ) erstellt. Jeweils  $5 \mu$ l dieser Proben, sowie der Proben, die durch cDNA-Synthese gewonnen wurden, wurden mit je  $1,25 \mu$ l ABI Sondenmix (Murine myosin heavy chain  $\alpha$  bzw.  $\beta$  (probe dye FAM) und Eukaryotic 18S rRNA endogenous control (probe dye FAM) Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),  $12,5 \mu$ l TaqMan universal PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und  $6,25 \mu$ l destillierten Wasser versetzt und in Dreifachbestimmung in die Vertiefungen einer PCR-Platte pipettiert. Durch Anzentrifugation

mit 1500 Umdrehungen/min für 10 Sekunden wurden eventuell in den Proben befindliche Luftblasen entfernt. Die Realtime-PCR wurde dann in einem iCycler (BIO-Rad Laboratories, München, BRD) mit folgendem Programm durchgeführt:

1. 2 min bei 50°C
2. 10 min 95°C
3. 40-fache Wiederholung von 15 Sekunden 95°C und im Anschluss 1 Minute 60°C
4. Belassen bei 15°C

Die nach Abschluss der Messungen erhaltenen CT-Werte wurden zunächst hinsichtlich etwaiger Ausreißer untersucht, um dann den Mittelwert jeder Probe aus der Dreifachbestimmung zu berechnen. Für die relative Quantifizierung wurden anschließend die CT-Werte der 18S-Bestimmung jeweils von den CT-Werten der  $\alpha$ - und  $\beta$ MHC-Bestimmungen abgezogen bzw. die anhand der Standardkurve errechnete Konzentrationswerte von  $\alpha$ - und  $\beta$ MHC durch die der 18S-Bestimmung geteilt.

#### 3.11 Statistische Auswertung

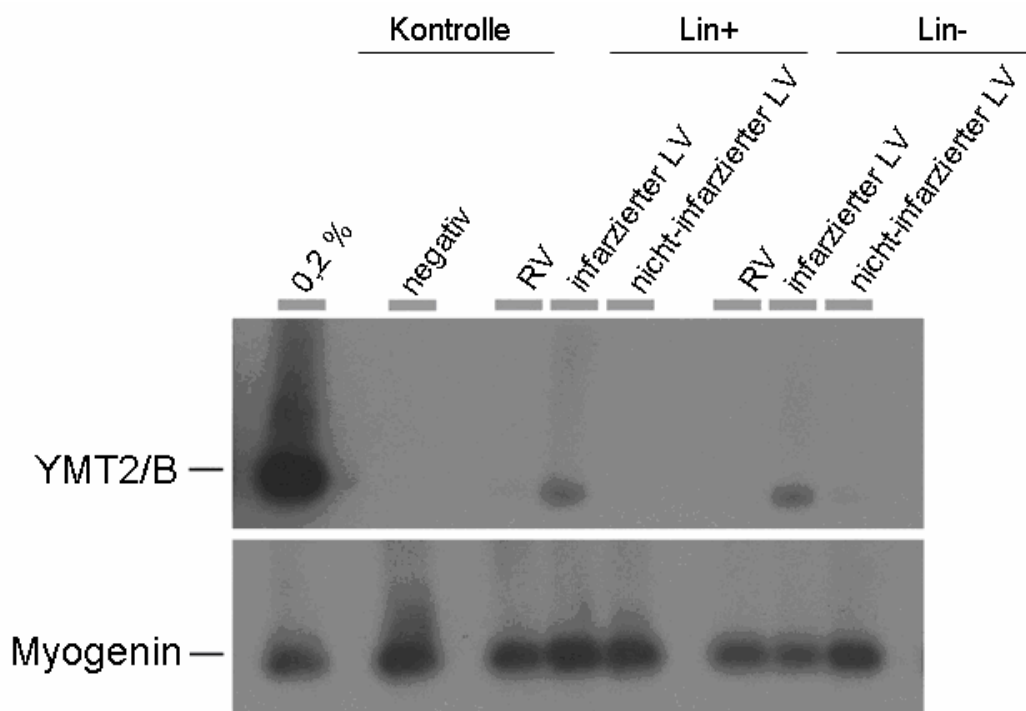
Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Überlebensraten wurden durch Anwendung eines Log Rang Tests verglichen. Absolute Unterschiede zwischen den Gruppen wurden verglichen durch Verwendung eines Mann-Whitney Test für den Vergleich zweier Gruppen und eines Wilcoxon Tests für den Vergleich von zeitabhängigen Unterschieden. Als signifikant wurden Ergebnisse bei zweiseitigem  $p \leq 0,05$  angenommen. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde das StatView Statistik Programm (Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA, USA) verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Intrakardiale Zellinjektion und Detektion männlicher Spenderzellen

Sechs Wochen nach intrakardialer Injektion von Knochenmarkszellen männlicher Spendermäuse in weibliche Empfängertiere wurde mittels semi-quantitativer PCR für Y-Chromosomen-spezifische Sequenzen das Ausmaß der Zelltransplantation bestimmt.

Hierbei konnten bei 75% der weiblichen Empfängermäuse im infarzierten Myokardgewebe männliche Donorzellen nachgewiesen werden, während sich im nicht-infarzierten Myokard sowie im rechten Ventrikel keine Zellen detektieren lassen.



**Abb.11:** Repräsentativer Southern Blot. Genomische DNA vom rechten Ventrikel und infarzierten bzw. nicht infarzierten Anteil des linken Ventrikels Lin<sup>+</sup> oder Lin<sup>-</sup> behandelter Mäuse wurde nach Gewinnung und Verarbeitung auf eine Zellulosemembran gebロットet. Daneben dienten weibliche und männliche genomische DNA, hier in weiblicher DNA auf 1/500 verdünnt, als positiv und negativ Kontrolle. Der männliche Spenderzellanteil konnte durch semiquantitative PCR, unter Verwendung Y-Chromosomen-spezifischer Primer (YMT 2/B) in Kombination mit Myogenin-spezifischen Primern als Normierungskontrolle, bestimmt werden.

Die Relation von Donor- zu Empfängerzelle lag dabei im Bereich von 1/100.000. Dies zeigt eine, wenngleich nur in geringem Ausmaß stattgefundene, erfolgreiche Ansiedelung der Donorzellen im Myokardgewebe nach Zelltransplantation.

#### 4.2 Mortalität

Die Überlebensraten nach Koronarligation und anschließender Injektion von unfraktionierten Knochenmarkszellen, Lin<sup>-</sup>- oder Lin<sup>+</sup>-Subpopulationen bzw. PBS unterschieden sich zwischen den vier Gruppen an Tag 42 nicht signifikant. Allerdings zeigte sich ein leichter Trend zur etwas besseren Überlebensrate innerhalb der mit unfraktionierten Knochenmarkszellen sowie Lin<sup>+</sup>-Subpopulation behandelten Mäusen.

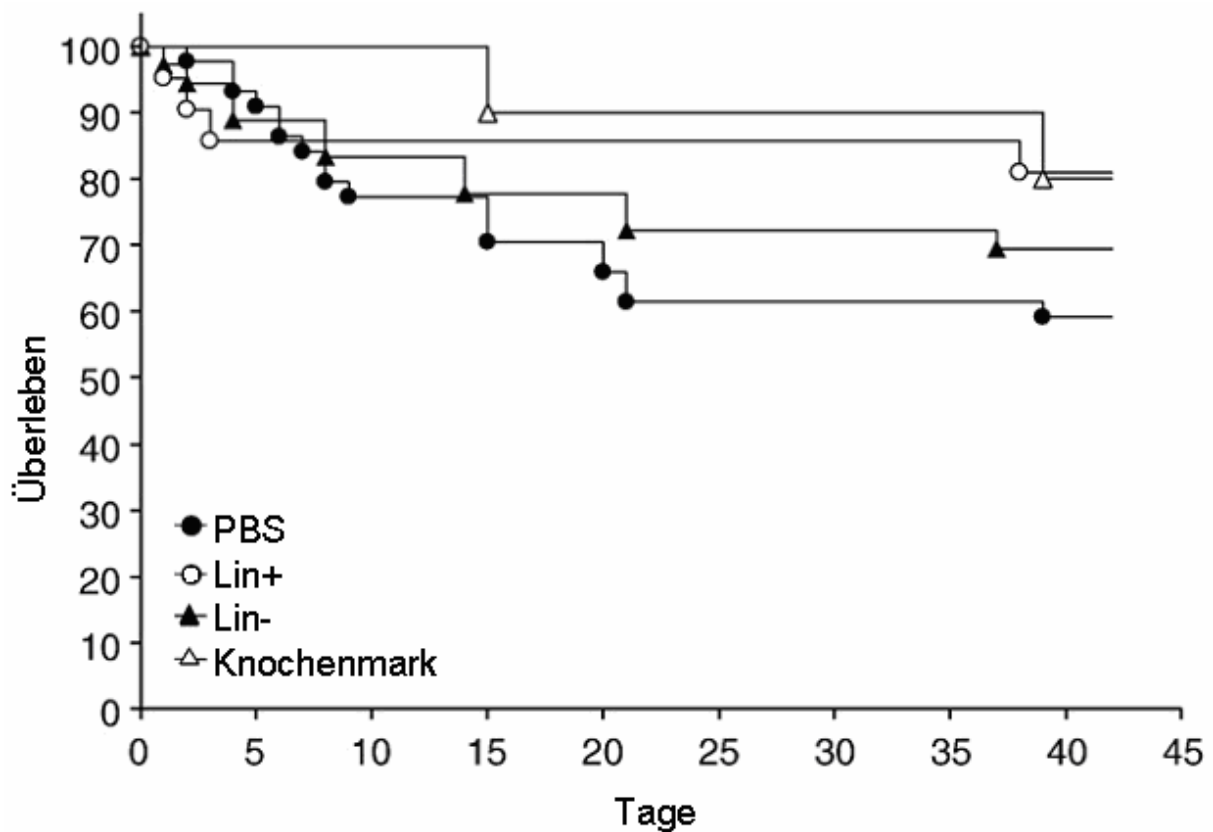


Abb. 12: Überlebenskurven nach Koronarligation und nachfolgender Injektion von unfraktionierten Knochenmarkszellen, Lin<sup>-</sup>- oder Lin<sup>+</sup>- Subpopulationen bzw. PBS. Es ließen sich keine Unterschiede im postoperativen Überleben zwischen den vier Gruppen erkennen.

#### 4.3 Infarktgrößenbestimmung

Die Infarktgröße wurde nach sechs Wochen mittels planimetrischer Messung PSR-gefärbter Herzschnitte auf mittlerer Papillarebene gemessen. Der Prozentteil des infarzierten Myokardgewebes an nichtinfarzierten Myokardgewebe zeigte zwischen den mit PBS, BM (Bone marrow, Knochenmark), Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> behandelten MI Tieren keine statistisch

signifikante Differenz und betrug für die PBS-behandelten Mäuse 51.1 ( $\pm 3.5$ ), BM 55.6 ( $\pm 6.4$ ), Lin<sup>-</sup> 57.8 ( $\pm 3.8$ ) und Lin<sup>+</sup> 56.7 ( $\pm 3.2$ ).

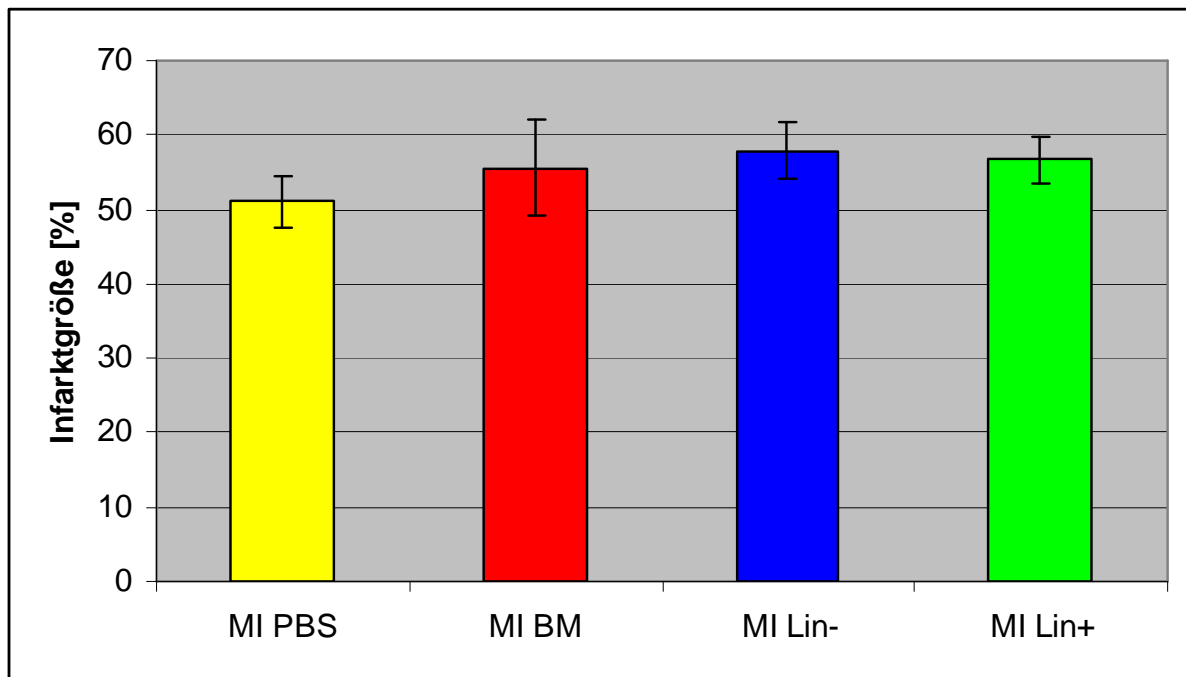


Abb. 13: Prozentualer Anteil der Infarktgröße am linken Ventrikel. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit PBS 51.1 ( $\pm 3.5$ ), BM 55.6 ( $\pm 6.4$ ), Lin<sup>-</sup> 57.8 ( $\pm 3.8$ ) und Lin<sup>+</sup> 56.7 ( $\pm 3.2$ ) behandelten Mäusen.

#### 4.4 Körper- und Herzgewicht

Die Körpergewichte zwischen den scheinoperierten Tieren und den mit PBS, Knochenmarks-, Lin<sup>-</sup> oder Lin<sup>+</sup>-Zellen behandelten Infarkttieren zeigten keine signifikanten Unterschiede. Das Verhältnis von linksventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht sowie rechtsventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht stieg nach Infarkt signifikant an. Während sich bei ersterem von allen Zellpopulationen die Knochenmarkszellen als wirksam bezüglich der Reduktion dieses Verhältnisses zeigten, war dies bei letzterem für keine Zellpopulation ersichtlich.



	Sham PBS	MI PBS	MI BM	MI Lin <sup>-</sup>	MI Lin <sup>+</sup>
Körpergewicht [g]	22.2±0.7	23.1±0.4	24.2±0.6	22.7±0.4	23.1±0.6
LV- Gewicht/Körpergewicht [mg/g]	3.5±0.1†	5.2±0.3*†	4.3±0.1*	5.3±0.2*†	5.0±0.2*†
RV- Gewicht/Körpergewicht [mg/g]	0.9±0.1	1.5±0.1*	1.8±0.2*	1.6±0.1*	1.5±0.1*

Tabelle 1: Körpergewicht, linksventrikuläres und rechtsventrikuläres Gewicht sowie deren Relationen. Die Daten sind als Mittelwert±SD angegeben. LV=Linker Ventrikel, RV=Rechter Ventrikel, \*p≤0.05 vs. Sham, †p≤0.05 vs. BM.

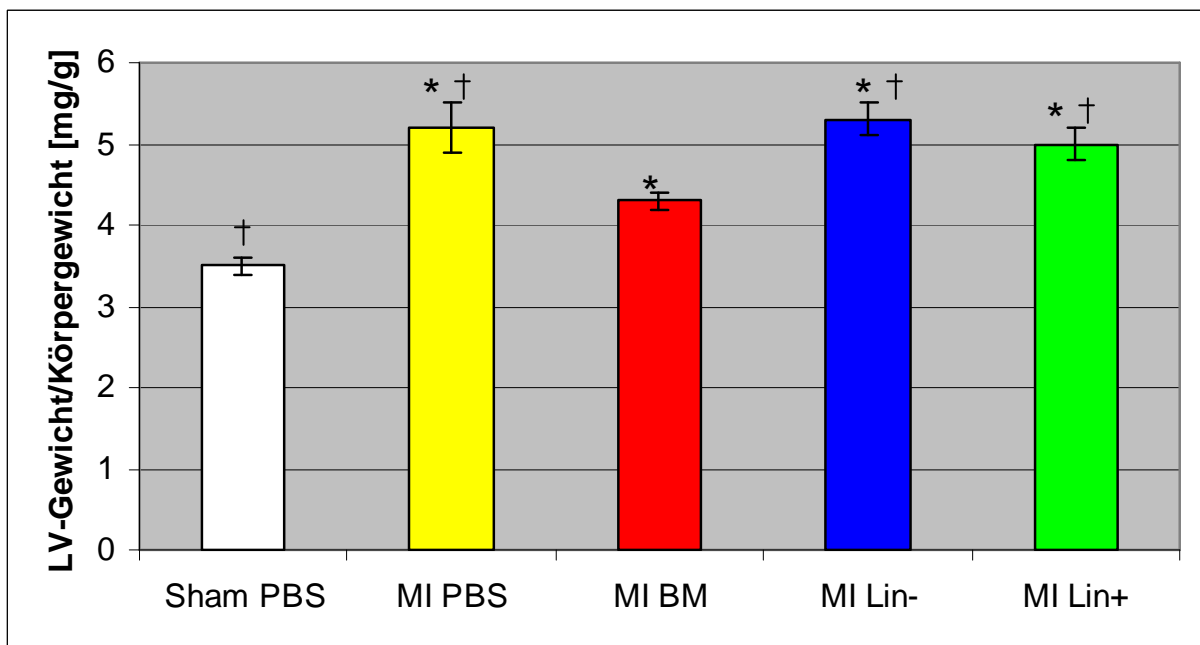


Abb. 14: LV-Gewicht/Körpergewicht [mg/g]. Es zeigt sich ein mit \*p≤0.05 signifikanter Anstieg des LV-Gewicht/Körpergewicht Verhältnisses bei den Infarkttieren im Vergleich zu den Sham Mäusen. Behandlung mit BM-Zellen war von allen injizierten Zellpopulationen als einzigstes in der Lage diese Relation zu reduzieren. †p≤0.05 vs. BM.

#### 4.5 $\beta$ MHC/ $\alpha$ MHC-Expression

$\beta$ MHC- und  $\alpha$ MHC-Expression wurden nach Organentnahme an Tag 42 aus der Herzspitze bestimmt und an der Expression von 18S normiert. Mit dem Verhältnis von  $\beta$ MHC- zu  $\alpha$ MHC-Expression konnte eine Aussage hinsichtlich myokardiale Hypertrophie gestellt werden.  $\beta$ MHC- zu  $\alpha$ MHC-Expression stieg nach Infarkt und PBS Injektion im Vergleich zu scheinoperierten PBS-behandelten Mäusen statistisch signifikant an ( $2.8 \pm 0.5$  vs.  $0.3 \pm 0.2$ ) und konnte durch die Injektion von Knochenmarkszellen ( $0.8 \pm 0.1$ ), aber nicht durch  $\text{Lin}^-$  ( $2.3 \pm 0.1$ ) oder  $\text{Lin}^+$  ( $2.7 \pm 0.0$ ) Zellinjektion gebessert werden.

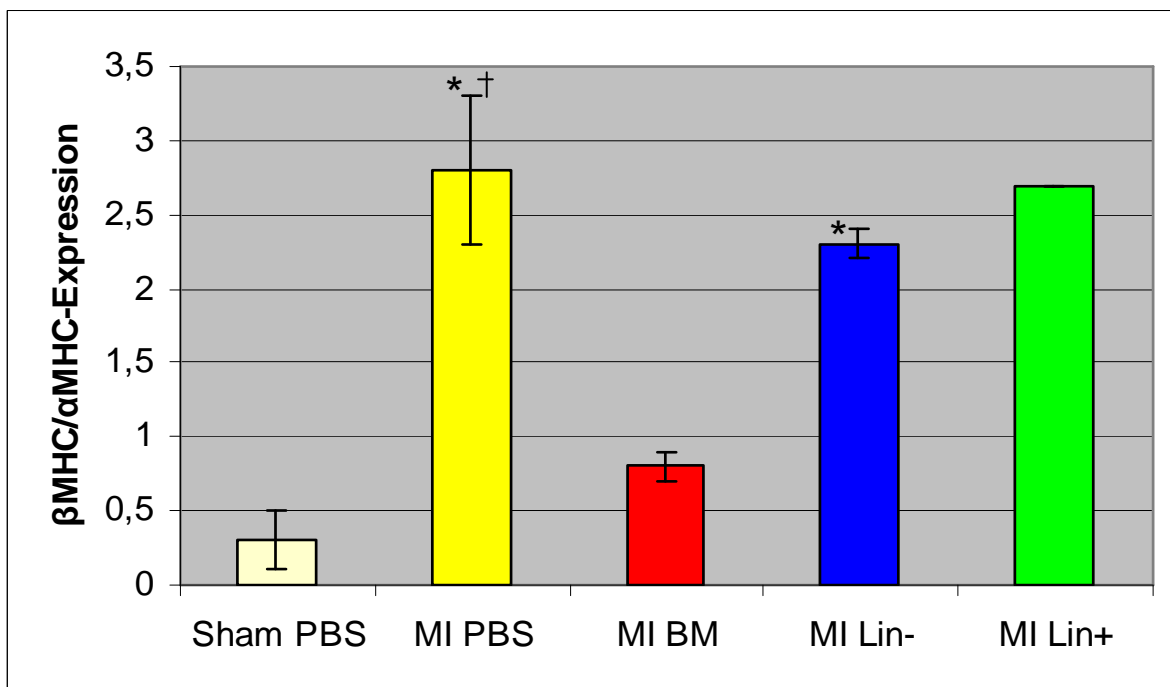
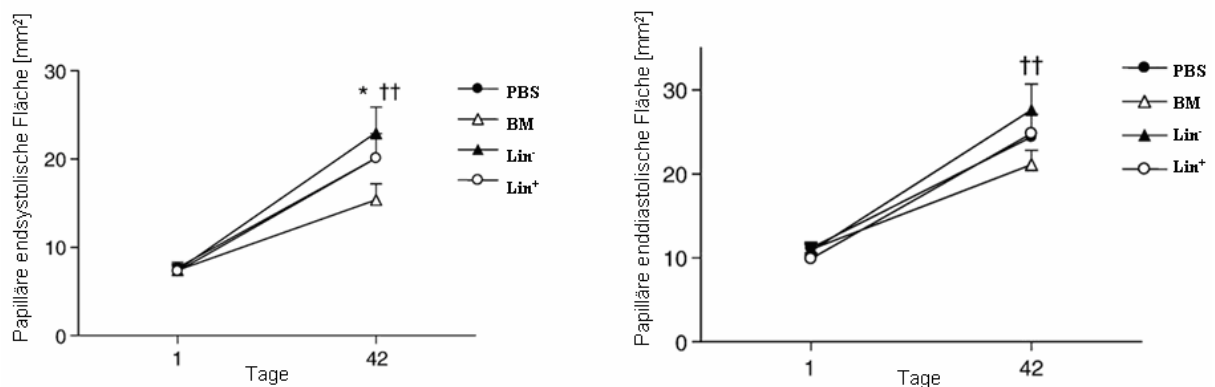


Abb. 15:  $\beta$ MHC/ $\alpha$ MHC-Expression. Der Unterschied zwischen MI PBS ( $2.8 \pm 0.5$ ) sowie MI Lin<sup>-</sup> ( $2.3 \pm 0.1$ ) zu Sham PBS Mäusen ( $0.3 \pm 0.2$ ) ist mit  $*p < 0,05$  signifikant. Signifikanz mit  $\dagger p < 0,05$  ergibt sich ebenso zwischen MI PBS ( $2.8 \pm 0.5$ ) und MI BM Mäusen ( $0.8 \pm 0.1$ ).

#### 4.6 Echokardiographische Messungen

Nach der initialen Echokardiographie zum Zeitpunkt der Randomisierung an Tag 1 nach Infarktchirurgie dienten die weiteren Untersuchungen an Tag 21 und 42 zur Verifizierung des Ausmaßes linksventrikulären Remodelings. Wie erwartet zeigten die infarzierten Ventrikel eine progressive Dilatation mit signifikant größeren ESA und EDA sowie Durchmessern sechs Wochen nach Myokardinfarkt. Während sich durch die Behandlung der Infarkttiere mit  $\text{Lin}^-$ - oder  $\text{Lin}^+$ -Zellen, im Vergleich zu PBS behandelten Tieren, linksventrikuläres Remodeling nicht verhindern ließ, konnte durch Injektion von Knochenmarkszellen eine vergleichsweise verminderte linksventrikuläre Dilatation beobachtet werden. Dies war vor allem in Höhe der mittleren Papillarebene ersichtlich.



**Abb. 16:** Echokardiographisch auf Papillarebene gemessene linksventrikuläre endsystolische und enddiastolische Fläche an Tag 1 und 42. Es zeigt sich eine signifikante Dilatation nach Myokardinfarkt ( $\dagger p \leq 0,05$ ,  $\dagger\dagger p \leq 0,01$  Tag 1 versus Tag 42). Die Behandlung mit Knochenmarkszellen nach Myokardinfarkt führte im Gegensatz zu  $\text{Lin}^-$ - oder  $\text{Lin}^+$ -Zellinjektion zu einer Verbesserung linksventrikulärer Dilatation im Vergleich zu PBS behandelten Mäusen ( $*p \leq 0,05$ ).

	MI PBS	MI BM	MI Lin <sup>-</sup>	MI Lin <sup>+</sup>
n	13	9	12	11
Herzfrequenz (bpm)	521±16	547±13	546±13	577±14
<b>Papillär</b>				
ESA [mm <sup>2</sup> ]	20.1±2.8	15.6±1.8	23.7±2.2+	20.1±2.2
EDA [mm <sup>2</sup> ]	24.4±2.7	21.1±1.7	27.6±3.1	24.8±2.3
ESD [mm]	5.6±0.3	5.1±0.3	5.8±0.3	5.6±0.4
EDD [mm]	6.2±0.3	5.9±0.2	6.4±0.3	6.2±0.4
2D FS [%]	20.2±2.3	28.6±3.6	27.0±4.9	23.9±3.3
<b>Apikal</b>				
ESA [mm <sup>2</sup> ]	21.6±2.8	20.7±2.4	25.8±3.0	23.3±2.3
EDA [mm <sup>2</sup> ]	24.7±2.6	24.5±2.4	29.8±3.2	26.6±2.2
ESD [mm]	5.5±0.4	5.5±0.4	6.0±0.4	5.4±0.4
EDD [mm]	5.9±0.3	6.0±0.3	6.4±0.4	6.0±0.4
2D FS [%]	15.5±3.5	19.7±3.4	17.1±3.4	13.3±1.8

**Tabelle 2:** Echokardiographiemessungen an Tag 42: Die Daten sind als Mittelwert±Standardfehler angegeben. n stellt die Anzahl der Tiere in der Studie dar. EDA = enddiastolische Fläche, ESA = Endsystolische Fläche, FS = Verkürzungsfraktion, EDD = Enddiastolischer Durchmesser, ESD = Endsystolischer Durchmesser, 2D = Zweidimensional, \*p≤0,05 vs. BM.

So war von allen Zellbehandlungen lediglich die Injektion von Knochenmarkszellen in der Lage linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt zu verbessern.

#### 4.7 Zytokinsekretion

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zytokinkonzentrationen in den Kulturmedien von Knochenmarks-, Lin<sup>+</sup> und Lin<sup>-</sup> Zellen sowie Medium ohne Zellzusatz bestimmt. Während IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-5, IL-10, IL-17, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, KC und TNF- $\alpha$  von allen Zellen in gleicher Menge produziert wurde, zeigten sich bei den Zytokinlevels von IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-12, GM-CSF und IFN- $\gamma$  signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen

Zellpopulationen. Überstände von Knochenmarks- oder Lin<sup>-</sup>-Zellen enthielten signifikant mehr IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-12, GM-CSF und IFN- $\gamma$  als Medium allein oder Überstände von Lin<sup>+</sup>-Zellen. Die Zytokinkonzentrationen von Medium und Lin<sup>+</sup>-Zellen unterschieden sich bis auf IL-12, was von den Lin<sup>+</sup>-Zellen signifikant mehr produziert wurde, nicht. Insgesamt zeigt sich hiermit, dass die verschiedenen Knochenmarkspopulationen diverse Zytokine in unterschiedlicher Menge produzieren.

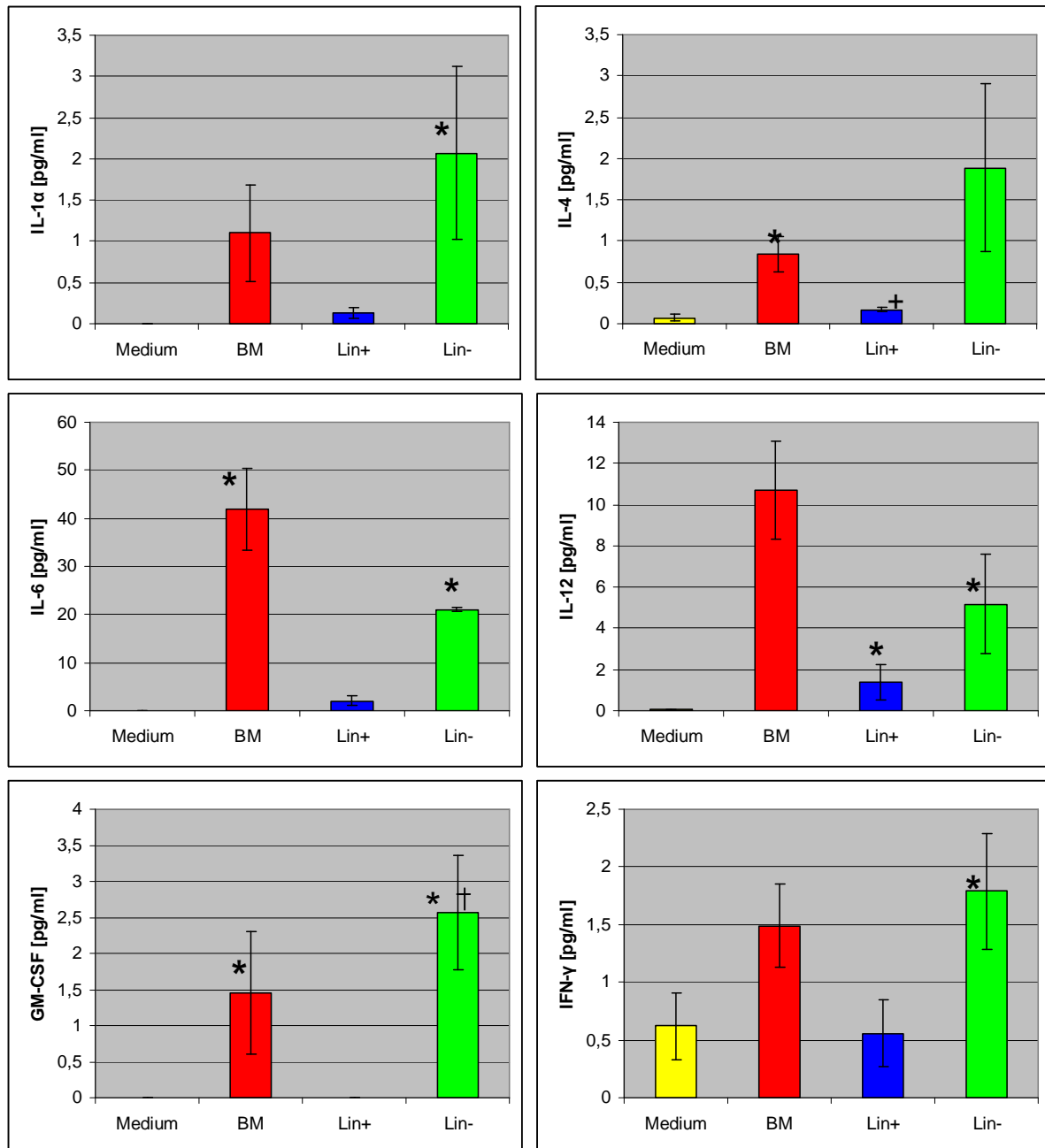


Abb. 17: IL-1 $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-12, GM-CSF, IFN- $\gamma$  Konzentrationen in den Kulturmedien von Knochenmarks-, Lin<sup>+</sup>- und Lin<sup>-</sup>-Zellen sowie Medium ohne Zellzusatz. Art und Ausmaß der sezernierten Zytokine variierte zwischen den verschiedenen Zelllinien.

\* p ≤ 0,05 vs. Medium, + p ≤ 0,05 vs. BM, † p ≤ 0,05 vs. Lin<sup>+</sup>.

## 5. Diskussion

Ende der neunziger Jahre wurden erstmals Studien publiziert, die behaupteten, dass adulte Knochenmarksstammzellen in der Lage sind Zelliniengrenzen zu überwinden und sich in Zellen nichtverwandten Gewebes zu differenzieren. Größtes Aufsehen rief 2001 die Studie von Orlic et al. hervor, die in großem Ausmaß von einer Transdifferenzierung unreifer Knochenmarkszellen in funktionsfähiges Herzmuskelgewebe sprach (ORLIC et al., 2001a). Hierbei wurden  $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+$  primitive Knochenmarkszellen isoliert und anschließend in die Randzone infarzierter Mäuseherzen injiziert. Nachfolgend wurde von einer massiven Regeneration von 60% des infarzierten Ventrikels durch Neubildung von Kardiomyozyten und endothelialen Zellen berichtet. Bei gleichzeitig verbesserten kardialen Funktionsparametern sahen die Autoren in der Applikation von Knochenmarksstammzellen nach Myokardinfarkt eine Möglichkeit das kurz- und langfristige Ergebnis von ischämischer Kardiomyopathie zu verbessern. Noch näher an die klinische Realität sollte eine weitere Studie derselben Autoren an Mäusen führen, welche durch mobilisierte Knochenmarkszellen, hervorgerufen durch Verwendung von Stammzellfaktor (SCF) und Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor (G-CSF), von einer ausgiebigen Regeneration des infarzierten Herzens sowie funktionellen Verbesserung berichteten (ORLIC et al. 2001b). Jedoch kann bei dieser Studienform über die Herkunft der Zellen, die für kardiale Struktur- und Funktionsverbesserung verantwortlich sind, gestritten werden, da durch die Zytokinbehandlung auch eine Aktivierung residierender kardialer Stammzellen denkbar ist, welche dann zu den beobachteten Ergebnissen geführt hätten. Jackson et al., die in ihrer Studie SP-Zellen aus dem Knochenmark isolierten, diese Zellen letal bestrahlten Mäusen transplantierten und nachfolgend einer Herzischämie durch koronarer Occlusion/Reperfusion zuführten, konnten eine Migration dieser Zellpopulation ins ischämische Myokardgewebe beobachten, wo eine Transdifferenzierung in Kardiomyozyten und Endothelzellen stattfand (JACKSON et al., 2001). Im Vergleich zu Orlic et al. war allerdings das Ausmaß der Beteiligung der Knochenmarksstammzellen an der kardialen Regeneration mit 0,02% neu gebildeter Kardiomyozyten bzw. 3% neu gebildeter Gefäßstrukturen sehr gering. Zudem konnte eine geringgradige Kontamination der injizierten Zellen mit nichthämatopoietischen Stammzellen, die möglicherweise für das beobachtete Ergebnis verantwortlich sind, nicht endgültig ausgeschlossen werden.

Ob solche Transdifferenzierungsvorgänge auch am menschlichen Herzen vonstatten gehen, wurde anhand von menschlichen Herztransplantaten untersucht, wo eine Frau als Spender für

einen Mann fungierte. Durch den Nachweis des Y-Chromosoms in den Transplantatherzen sollten männliche Zellen detektiert werden, welche von extrakardialen Progenitorzellen des Empfängers abstammen. Mehrere Gruppen haben hierbei gezeigt, dass nach Transplantation eine Repopulation männlicher extrakardialer Progenitorzellen ins Spenderherz stattfindet, welche sich nachfolgend in die Zellkomponenten menschlichen Myokardgewebes differenzieren (LAFLAMME et al., 2002; QUAINI et al., 2002). Das Ausmaß des beobachteten kardialen Chimerismus variiert jedoch erheblich untereinander. Während Laflamme et al. im Schnitt lediglich 0,04% der Kardiomyozyten männlichen Ursprungs zuordnete, waren dies bei Quiani et al. 18% der Fall. Verantwortlich für diese erhebliche Varianz der Ergebnisse könnten die unterschiedlichen Zeitintervalle der beiden Studien zwischen Transplantation und Tod des Empfängers sein, da in Regionen akuter Abstoßung die grösste Anzahl Y-positiver Kardiomyozyten zu finden ist (LAFLAMME et al., 2002).

Mit der Hoffnung durch Anwendung von Knochenmarksstammzellen nach Myokardinfarkt eine neue und erstmals kurative Therapiestrategie im Tiermodell gefunden zu haben, wurden mehrere klinische Studien durchgeführt, mit dem Ziel ähnlich positive Effekte beim Menschen beobachten zu können. In der Tat konnten die REPAIR-AMI (Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction) und die TOPCARE-AMI (Transplantation Of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) Studien sowie die Studie von Strauer et al. nicht nur die Durchführbarkeit und Sicherheit einer solchen Intervention, sondern auch geringgradige aber signifikante Verbesserungen der Herzfunktion, gemessen unter anderem in einem bis zu 10%igen Anstieg der Ejektionsfraktion, nachweisen (SCHÄCHINGER et al., 2006a; SCHÄCHINGER et al., 2006b; STRAUER et al., 2002). Ob die beobachteten Ergebnisse allerdings auf einer Transdifferenzierung extrakardialer Progenitorzellen in funktionelles Myokardgewebe beruhen ist äußerst fraglich, da nicht zuletzt eine Reihe experimenteller Studien am Tiermodell die Plastizität hämatopietischer Stammzellen und damit deren Potential zur Regeneration von Myokardgewebe in Frage stellen (WAGERS et al., 2002; BALSAM et al., 2004; MURRY et al., 2004; DETEN et al., 2004). Murry et al. stellte nach Injektion von Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>+</sup> Knochenmarkszellen nach Myokardinfarkt (die selbe Knochenmarkssubpopulation, die auch Orlic et al. in seiner Studie verwendete) keine Differenzierung in Herzmuskelzellen fest, eine Beobachtung die von Balsam et al. bestätigt wurde, der nach Injektion lediglich einen reifen leukozytären Phänotyp (vornehmlich Granulozyten) im Myokardgewebe auffinden konnte. Nygren et al. erweiterte diese Beobachtungen dadurch, dass er zeigen konnte, dass mobilisierte Knochenmarksstammzellen

in den Randzonen des Myokardinfarkts mit endogenen Kardiomyozyten fusionieren, aber keine Transdifferenzierungsfähigkeit besitzen (NYGREN et al., 2004). Nachfolgend brachten auch einige klinische Analysen wie die STEMI (ST-Elevation Myocardial Infarction) und die ASTAMI (Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction) Studien keine Verbesserung der globalen kardialen Funktion durch Applikation von Knochenmarksstammzellen nach Myokardinfarkt hervor (JANSSENS et al., 2006; LUNDE et al., 2005; LUNDE et al., 2006).

Insgesamt ist somit weiterhin neben der Frage der Plastizität von Knochenmarksstammzellen deren Einflussvermögen auf Remodelingvorgänge strittig. Da zudem weiterhin nach dem geeignetsten Zelltyp für solche Fragestellungen gesucht wird, wurden in dieser Arbeit die Wirkungen von drei verschiedenen Knochenmarkspopulationen (unfraktionierte Knochenmarkszellen, Lin<sup>-</sup>- bzw. Lin<sup>+</sup>-Subpopulationen) auf das ventrikuläre Remodeling untersucht. Hierbei konnte durch Injektion von unfraktionierten Knochenmarkszellen, aber nicht durch Lin<sup>-</sup>- oder Lin<sup>+</sup>-Zellinjektion, eine Verbesserung linksventrikulärer Hypertrophie und eine Abschwächung linksventrikulärer Dilatation beobachtet werden (FRANTZ et al., 2008). Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut zu denen der klinischen Studie von Assmus et al. (ASSMUS et al., 2006). In dieser randomisiert-kontrollierten Studie erhielten 75 Patienten mit Zustand nach Myokardinfarkt und stabiler ischämischer Herzerkrankung, entweder keine Zellinfusion, Infusion mit zirkulierenden Vorläuferzellen oder Infusion von unfraktionierten Knochenmarkszellen in die Koronararterie, welche für die Versorgung des meist dyskinetischen linksventrikulären Areals zuständig ist. Hier zeigte sich, dass lediglich Patienten, welche der Infusion von Knochenmarkszellen zugeführt wurden, eine moderate aber signifikante Verbesserung linksventrikulärer Ejektionsfraktion aufwiesen.

Worauf beruhen die unterschiedlichen Effekte der verschiedenen Zelllinien? Bei der geringen Ansiedelungsrate von donorspezifischen Knochenmarkszellen im infarzierten Myokardgewebe, welche in unserer Studie lediglich im Bereich von 1/100000 lag, scheint eine direkte Verbesserung der kardialen Funktion sowie Einflussnahme auf linksventrikuläre Remodelingvorgänge beruhend auf einer Neubildung von Kardiomyozyten, sei es durch Transdifferenzierung oder Zellfusion, eher unwahrscheinlich. Vielmehr rückt eine neue Hypothese in den Mittelpunkt des Interesses: Die transplantierten Stammzellen setzen lösliche Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die auf parakrine Art und Weise Remodelingvorgänge modifizieren, indem sie Einfluss auf Zytoprotektion, Neovaskularisierung und indirekte kardiale Regeneration nehmen. Uemura et al. beleuchteten die Potenz parakriner Faktoren, sezerniert von Knochenmarksstammzellen, linksventrikuläre



Remodelingvorgänge abzuschwächen (UEMURA et al., 2006). Hierbei konnten Knochenmarksstammzellen, nach in vitro Präkonditionierung unter hypoxischen Bedingungen, effektiver linksventrikuläre Dilatation abwenden und linksventrikuläre Ejektionsfraktion verbessern, als nicht konditionierte Zellen. Verantwortlich dafür scheint eine Hochregulierung verschiedenster Zytokine, Wachstumsfaktoren und insbesondere antiapoptotischer Proteine zu sein, die auf parakrine Wirkungsweise den Zelluntergang von Kardiomyozyten in der Randzone des Infarkts unterdrücken. Takahashi et al. zeigte, dass allein durch die Injektion des zellfreien Überstandes, gewonnen aus Kultur von Knochenmarkszellen, in akut infarzierte Rattenherzen ein Anstieg der Kappildichte, ein Rückgang der Infarktgröße sowie eine Verbesserung der Herzfunktion zu beobachten sei (TAKAHASHI et al., 2006). Ein Ergebnis, was ebenso auf die Freisetzung verschiedenster Zytokine zurückzuführen ist, und sich wie bei Uemura et al. durch Hypoxie weiter verstärken lässt. Gnechi et al. lieferte weitere Daten zur Unterstützung dieser parakrinen Hypothese: Der zellfreie Überstand von mesenchymalen Stammzellkulturen, insbesondere solchen, welche vorheriger Hypoxie ausgesetzt wurden, übt eine protektive Wirkung auf ischämisches Herzmuskelgewebe aus (GNECCHI et al., 2005). Um die parakrinen Wirkungsweisen von Knochenmarkszellen weiter aufzuschlüsseln führten wir in vitro Messungen von bestimmten Zytokinkonzentrationen in den Überständen der verschiedenen kultivierten Knochenmarkszellpopulationen durch. Wir fanden hierbei kein klares Muster in der Zytokinregulation in vitro. Während einige Zytokine, wie TNF und Chemokine, keinerlei Regulation unterlagen, wurden andere Zytokine der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort wie  $IL-1\alpha$ ,  $IL-4$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$  und  $IFN-\gamma$  hochreguliert (FRANTZ et al., 2008). Die Rolle von  $IL-1\alpha$ ,  $IL-4$ ,  $IL-6$ ,  $IL-12$  und  $IFN-\gamma$  bezüglich ihrer Einflussnahme auf Infarktheilung und linksventrikulären Remodelingprozessen ist gegenwärtig unklar, wengleich man weiß, dass all diese Zytokine nach Myokardinfarkt hochreguliert werden. Dagegen existieren zu den Zytokinen GM-CSF und  $IL-6$  mehrere Studien.  $IL-6$  spielt hauptsächlich in der Frühphase nach Myokardinfarkt eine Rolle, in der es über die Induktion von Oberflächenadhäsionsmolekülen auf Myozyten und nachfolgende Neutrophileninvasion (KUKIELKA et al., 1995) die Resorption von nekrotischen Gewebe beschleunigt und zur Wundheilung beiträgt (DETEN et al., 2002). Auf der anderen Seite erfüllt es langfristig keine zentrale Funktion in der Steuerung linksventrikulärer Remodelingprozesse (DETEN et al., 2002), was in der Studie von Fuchs et al. an einer vergleichenden Untersuchung von  $IL-6$  knockout Mäusen und Wildtyp-Mäusen nach Infarktinduktion beleuchtet wurde, wo sich die beiden Mäusetypen hinsichtlich Mortalitätsraten, linksventrikulärer Dilatation und

Hypertrophie nicht unterschieden (FUCHS et al., 2003). Über die Effekte, die GM-CSF auf das ischämische Myokard ausübt, herrschen divergierende Meinungen. Während unter den Autoren Einigkeit über die Potenz von GM-CSF besteht, Vorläuferzellen des Knochenmarks in die periphere Zirkulation zu mobilisieren, geht Kovacic et al. davon aus, dass GM-CSF multiple direkte und indirekte positive kardiovaskuläre Effekte besitzt, die neben einer Neovaskularisation des ischämischen Myokards auch eine Reduktion des myokardialen Schadens nach Infarkt inkludieren (KOVACIC et al., 2007). Dies soll vor allem über direkte protektive Wirkung von GM-CSF auf das umliegende Myokardgewebe bewerkstelligt werden. Auf der anderen Seite spricht Maekawa et al. GM-CSF negative Einflüsse auf das linksventrikuläre Remodeling nach akutem Myokardinfarkt zu (MAEKAWA et al., 2004). Hierbei konnte durch Induktion von GM-CSF eine Infarktexpansion in Assoziation mit einer inadäquaten Kollagenablagerung beobachtet werden, welche letztlich in einer verschlechterten kardialen Funktion mündete.

Letztlich muss man feststellen, dass unsere zelltypenspezifischen Effekte sich nicht durch die Hoch- oder Runterregulierung eines einzelnen Zytokins erklären lassen. Vielmehr scheint ein komplexes Expressionsmuster der verschiedenen Zytokine und Wachstumsfaktoren, abhängig von der jeweiligen Zellpopulation, zu existieren, welches durch wechselseitige Interaktion untereinander Einfluss auf die Remodelingprozesse nach Myokardinfarkt ausübt. Insbesondere das Expressionsmuster der unfraktionierten Knochenmarkszellen scheint dabei in der Lage zu sein das linksventrikuläre Remodeling günstig zu beeinflussen. Allerdings muss man einräumen, dass unsere in vitro Zytokinmessungen sich nicht eins zu eins auf in vivo Bedingungen übertragen lassen können.

Da immer noch der endgültige Beweis einer myokardialen Regeneration durch die Injektion von Vorläuferzellen ausgeblieben ist, postulierte Wall et al., dass die positiven Effekte, die unter Zellinjektion zu beobachten sind, allein passiver Natur sind, und hierbei vornehmlich auf Veränderungen linksventrikulärer Geometrie beruhen. In der Tat konnte durch Injektion von nicht-kontraktilen Material eine Verbesserung linksventrikulärer Remodelingprozesse nach Myokardinfarkt beobachtet werden (WALL et al., 2006). Dennoch sprechen die Daten der vorliegenden Arbeit klar gegen die Behauptung, dass unabhängig von injizierten Material die gleichen Ergebnisse zu finden sind, da die gleiche Injektionsmenge verschiedener Zellen verschiedene Effekte auf das linksventrikuläre Remodeling hatte.

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass durch die Transplantation von unterschiedlichen Knochenmarkszellsubpopulationen unterschiedliche Resultate hinsichtlich des Ausmaßes linksventrikulären Remodelings nach Myokardinfarkt erzielen lassen. Dass

dieser Prozess sich einzig und allein durch die Behandlung mit unfraktionierten Knochenmarkszellen bremsen ließ, führen wir auf parakrine Zytokineinflüsse zurück, da die Zytokinexpressionslevel der verschiedenen Zellpopulationen in vitro teils erheblich divergierten. Letzlich wird somit auch eindrucksvoll die Komplexität der Interaktion von Knochenmarkszellen mit ischämischen Myokardgewebe verdeutlicht und es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um den genauen Wirkmechanismus zu identifizieren, welcher für die positive Einflussnahme auf das linksventrikuläre Remodeling verantwortlich ist. Sollte dies gelingen, ist auch ein therapeutischer Einsatz von Knochenmarkszellen nach Myokardinfarkt denkbar.

## 6. Zusammenfassung

Der unbefriedigende Erfolg heutiger Standardtherapien zur Reduktion von Morbidität und Mortalität der ischämisch bedingten Herzinsuffizienz beruht zum Teil darauf, dass es sich hierbei nicht um einen kausalen Behandlungsansatz handelt. Bei Knochenmarksstammzellen hingegen hat man aufgrund ihrer Charakteristika der Klonalität, unbegrenzten Selbsterneuerung und Differenzierungsfähigkeit die Hoffnung den ursächlichen Prozess der Erkrankung, den progressiven Untergang von funktionellen Herzmuskelzellen, positiv beeinflussen zu können und somit eine Verbesserung kardialer Funktion nach Myokardinfarkt zu erzielen. Um die Rolle und das Potential verschiedener Knochenmarkszellpopulationen auf das linksventrikuläre Remodeling nach Myokardinfarkt zu untersuchen, wurde auf das Maus-Infarkt-Modell zurückgegriffen. Nach experimentellem Myokardinfarkt durch Ligation der vorderen absteigenden Koronararterie erfolgte entweder die intramyokardiale Injektion von unfraktionierten Knochenmarkszellen oder einer mit Vorläufer- ( $Lin^-$ ) bzw. reifen ( $Lin^+$ ) Zellen angereicherten Knochenmarkszellsubpopulation. Obgleich mit keiner Zellpopulation entscheidend Einfluss auf Überlebensrate und Infarktgröße genommen werden konnte, zeigte sich eine signifikante Verbesserung des linksventrikulären Remodelings nach Injektion von unfraktionierten Knochenmarkszellen, welche hingegen durch Behandlung mit  $Lin^-$  oder  $Lin^+$  Zellen ausblieb. Gemessen wurde dies einerseits auf molekularer Ebene, wo der linksventrikuläre Hypertrophiemarker, bestehend aus  $\beta$ MHC/ $\alpha$ MHC-Ratio signifikant gesenkt werden konnte, andererseits auf echokardiographischer Ebene, wo sich eine signifikante Verminderung linksventrikulärer Dilatation nachweisen ließ. Da sich die untersuchten Zellpopulationen hinsichtlich in vitro gemessener Zytokinexpressionslevel teilweise erheblich unterschieden, müssen die beobachteten Resultate im Zusammenhang mit stattgefundenener parakrine Zytokinsekretion gesehen werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich durch die Behandlung mit unfraktionierten Knochenmarkszellen, hingegen nicht mit  $Lin^-$  oder  $Lin^+$  angereicherten Knochenmarkszellsubpopulationen, eine partielle Verbesserung kardialer Remodeling- und Funktionsprozesse nach Myokardinfarkt am Mausmodell erzielen ließ, die womöglich auf parakrinen Zytokineffekten beruhen.

## 7. Literaturverzeichnis

ALI MH, Schlidt SA, Chandel NS, et al. (1999)

*Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia.*

Am J Physiol;277:L1057–L1065.

AMADO LC et al. (2005)

*Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction.*

Proc Natl Acad Sci USA 102,11474-11479.

ASSMUS B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grundwald F, Aicher A, Urbich C, Marin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM (2002)

*Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI).*

Circulation;106:3009-3017.

ASSMUS B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, et al. (2006)

*Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction.*

N Engl J Med;355:1222-32.

BADORFF C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. (2003)

*Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes.*

Circulation;107:1024-32.

BALSAM LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissmann IL, Robbins RC. (2004)

*Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium.*

Nature;428:668-73.

BARTHOLOMEW A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffmann R (2002)

*Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and pro-long skin graft survival in vivo.*

Exp Hematol;30:42-48.

- BELTRAMI AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. (2003)  
*Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.*  
Cell;114:763-76.
- BLEUMINK GS, Knetsch AM, Sturkenboom MCJM, et al. (2004)  
*Quantifying the heart failure epidemic: prevalence, incidence rate, lifetime risk and prognosis of heart failure: The Rotterdam Study.*  
Eur Heart J;25:1614-1619.
- BOZKURT B, Kribbs S, Clubb FJ Jr, Michael LH, Didenko VV, Hornsby PJ, Seta Y, Oral H, Spinale FG, Mann DL (1998)  
*Pathophysiologically relevant concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  promote progressive left ventricular dysfunction and remodeling in rats.*  
Circulation;97:1382-1391.
- BÜRGER A, Benicke M, Deten A, Zimmer H-G. (2001)  
*Catecholamines stimulate IL-6 synthesis in rat cardiac fibroblasts.*  
Am J Physiol;281:H14-H21.
- CHANDRASEKAR B, Freeman GL (1997)  
*Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium.*  
FEBS Lett;1:30-34.
- CLEUTJENS JP, Kandala JC, Guarda E, et al. (1995)  
*Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction.*  
J Mol Cell Cardiol;27:1281-1292.
- CONGET PA, Minguell JJ (1999)  
*Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells.*  
J Cell Physiol ;181:67-73.
- COWIE MR, Moster A, Wood DA, et al. (1997)  
*The epidemiology of heart failure*  
Eur Heart J; 18: 208-15.
- COWIE MR, Wood DA, Coats AJS, et al. (2000)  
*Survival of patients with a new diagnosis of heart failure: a population based study.*  
Heart;83:505-10.

- DETEN A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG (2002)  
*Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats.*  
Cardiovascular Research;55: 329-340.
- DETEN A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G, Zimmer HG (2005)  
*Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart.*  
Cardiovascular Research;65:52-63.
- D'IPPOLITO G, Diabira S, Howard GA, Menei P, Roos BA, Schiller PC (2004)  
*Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential.*  
J of Cell Sci;117:2971-2981.
- EVANS MJ, Kaufmann MH. (1981)  
*Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.*  
Nature;292:154-6.
- FERRARI G, Cusella-Deangelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F (1998)  
*Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.*  
Science;227:1528-1530.
- FRANTZ S, Vallabhapurapu D, Tillmanns J, Brousos N, Wagner H, Henig K, Ertl G, Müller AM, Bauersachs J (2008)  
*Impact of different bone marrow cell preparations on left ventricular remodelling after experimental myocardial infarction.*  
Eur J Heart Failure;10(2):119-24
- FRIEDENSTEIN AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. (2001)  
*Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.*  
Transplantation;6:230-247.
- FUCHS M, Hilfiker A, Kaminski K, Hilfiker-Kleiner D, Guener Z, Klein G, et al. (2003)  
*Role of interleukin-6 for LV remodeling and survival after experimental myocardial infarction.*  
Faseb J; 17: 2118-2120.

- FUCHS S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, Waksman R, Weissman NJ, Cerqueira M, Leon MB, Epstein SE (2003)  
*Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study.*  
J Am Coll Cardiol;41:1721-1724.
- GNECCHI M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. (2005)  
*Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells.*  
Nat Med;11:367-368.
- GNECCHI M et al. (2006)  
*Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement.*  
FASEB J;20, 661-669.
- GOLDMANN JM; Horowitz MM (2002)  
*The international bone marrow transplant registry.*  
Int J Hematol;76: 393-397.
- GOODELL MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP (1997)  
*Dye efflux studies suggest the existence of CD34-negative/low hematopoietic stem cells in multiple species.*  
Nat Med;3:1337-1345.
- HARRISON DE, Stone M, Astle CM (1990)  
*Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell.*  
J Exp Med;172:431-437.
- HO KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D (1993)  
*The epidemiology of heart failure: The Framingham study.*  
J Am Coll Cardiol;22; 6A-13A.
- HUTCHINS GM, Bulkley BH (1978)  
*Infarct expansion versus extension: Two different complications of acute myocardial infarction.*  
Am J Cardiol;41: 1127-1132.



ISNER JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T (2001)

*Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair.*

Ann N Y Acad Sci;953:75-84.

IWASAKI H, Kawamoto A, Ishikawa M, Oyamada A, Nakamori S, Nishimura H, et al. (2006)

*Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction.*

Circulation;113:1311–25.

JACKSON KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. (2001)

*Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells.*

J Clin Invest;107:1395-402.

JANSSENS S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. (2006)

*Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial.*

Lancet;367:113-21.

JIANG Y, Balkrishna N, Jahagirdar R, Reinhardt RL, Schwartz RE, Deene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002)

*Pluripotency of mesenchymal stem cell derived from adult marrow*

Nature;418:41-49.

JOLLY SR, Kane WJ, Hook BG (1986)

*Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: effect of duration of occlusion.*

Am J Heart;4:682-690.

JONES WK, Grupp IL, Doetschmann T, et al. (1996)

*Ablation of the murine alpha myosin heavy chain gene leads to dosage effects and functional deficits in the heart.*

J Clin Invest;98:1906-17.

JUGDUTT BI (1997)

*Effect of reperfusion on ventricular mass, topography, and function during healing of anterior infarction.*

Am J Physiol;3:H1205-H1211.

KAJSTURA J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, et al. (2005)

*Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion.*

Circ Res;96:127-37.

KAWAMOTO A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T (2003)

*Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia.*

Circulation;107:461-468

KEHAT I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. (2001)

*Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.*

J Clin Invest;108:407-14.

KLONER RA, Fishbein MC, Lew H, Maroko PR, Braunwald E (1978)

*Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids*

Circulation;1:56-63

KOYANAGI M, Urbich C, Chavakis E, Hoffmann J, Rupp S, Badorff C, et al. (2005)

*Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin.*

FEBS Lett;579:6060–6.

KOVACIC JC, Muller DW, Graham RM. (2007)

*Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease.*

J Mol Cell Cardiol;42:19-33.

KUCIA M, Reza R, Jala VR, Dawn B, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005)

*Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells.*

Leukemia;19:1118-1127.

- KUCIA M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2006)  
*A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+ SSEA-1+ Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow.*  
Leukemia;20:857-869
- KUCIA M, M. Wysoczynski, J. Ratajczak, M. Z. Ratajczak (2008)  
*Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow.*  
Cell Tissue Res;331:125-134.
- KUKIELKA GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML (1995)  
*Induction of Interleukin-6 synthesis in the myocardium.*  
Circulation;92:1866-1875.
- KUMAR V, Abbas AK, Fausto O (Hrsg.)  
*Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease.*  
7. Ausgabe, Elsevier, Philadelphia, PA, USA, 2004.
- LAFLAMME MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE (2002)  
*Evidence for Cardiomyocyte Repopulation by Extracardiac Progenitors in Transplanted Human Hearts.*  
Circ. Res.;90:634-640.
- LAGASSE E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000)  
*Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.*  
Nat Med;6:1229-1234.
- LAUGWITZ KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, et al. (2005)  
*Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages.*  
Nature;433:647-53.
- LEFER DJ, Granger DN (2000)  
*Oxidative stress and cardiac disease.*  
Am J Med;4:315-323.
- LINKE A, Muller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. (2005)  
*Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function.*  
Proc Natl Acad Sci U S A;102:8966-71.

LITT MR, Jeremy RW, Weismann HF, Winkelstein JA, Becker LC (1989)

*Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury.*

Circulation;6:1816-1827.

LLOYD-JONES DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D, for the Framingham Heart Study (2002)

*Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study.*

Circulation;106:3068 –3072.

LLOYD-JONES D, et al. (2009)

*Heart Disease and Stroke Statistics\_2009 Update. A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.*

Circulation. 2009;119:e1-e161.

LUNDE K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K (2005)

*Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects.*

Scand Cardiovasc J;39:150-8.

LUNDE K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. (2006)

*Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction.*

N Engl J Med; 355:1199-209.

MAC EWAN DJ (2002)

*TNF ligands and receptors – a matter of life and death.*

Br J Pharmacol;135:855-875.

MAEKAWA Y, Anzai T, Yoshikawa T, et al. (2004)

*Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor inducer on left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.*

J Am Coll Cardiol;44:1510–20.

MAKINO S, et al. (1999)

*Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.*

J Clin Invest;103:697-705.

- MARTIN CM, Meeson AP, Robertson SM, Hawke TJ, Richardson JA, Bates S, et al. (2004)  
*Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart.*  
Dev Biol;265:262-75.
- MESSINA E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. (2004)  
*Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart.*  
Circ Res;95:911-21.
- MEZEY E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000)  
*Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow.*  
Science;290:1779-1782.
- MICHAEL LH, ML Entman, CJ Hartley, KA Youker, J Zhu, SR Hall, HK Hawkins, K Berens, CM Ballantyne (1995)  
*Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model.*  
Am J Physiol;269(6 Pt 2): H2147-H2154.
- MIYAHARA Y, et al. (2006)  
*Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction.*  
Nature Med;12:459-465.
- MURRY CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. (2004)  
*Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.*  
Nature;428:664-8.
- NUSSBAUM J, et al. (2007)  
*Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response.*  
FASEB J;21:1345-1537.
- NYGREN JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. (2004)  
*Bone marrow-derived haematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation.*  
Nat Med;10:494-501.

- OH H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. (2003)  
*Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction.*  
Proc Natl Acad Sci U S A;100:12313-8.
- OLIVETTI G, Capasso JM, Sonnenblick EH, et al. (1990)  
*Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodelling acutely after myocardial infarction in rats.*  
Circ Res;67:23-34
- ORLIC D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. (2001a)  
*Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.*  
Nature;410:701-5.
- ORLIC D, et al. (2001b)  
*Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.*  
Proc Natl Acad Sci USA;98:10344-10349.
- OSAWA M, et al. (1996)  
*In vivo self-renewal of c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> Lin<sup>(low/-)</sup> hemopoietic stem cells.*  
J Immunol;156:3207-3214.
- PEICHEV M, et al. (2000)  
*Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34<sup>(+)</sup> cells identifies a population of functional endothelial precursors.*  
Blood;95:952-958.
- PFEFFER MA, Braunwald E (1990)  
*Ventricular remodelling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.*  
Circulation;81: 1161-1172.
- PITTENGER MF and MARTIN BJ (2004)  
*Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics.*  
Circ Res;95:9-20.
- PETERSON BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff IP (1999)  
*Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.*  
Science;284:1168-1170.

- QUAINI F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2002)  
*Chimerism of the transplanted heart.*  
N Engl J Med;Vol.346, No 1.
- QUIRICI N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, Deliliers GL (2001)  
*Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells.*  
Br J Haematol;115:186-194.
- RATAJCZAK MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. (2007)  
*A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4+ stem cells in adult bone marrow and other tissues.*  
Leukemia;21:860–867.
- REYES M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM (2001)  
*Purification and ex vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells.*  
Blood;98:2615-2625.
- RIBATTI D, Vacca A, Nico B, Ria R, Dammacco F (2002)  
*Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways.*  
Curr Mol Med;2:537-543.
- RUBIO D, Garcia-Castro J, Martín MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005)  
*Spontaneous human adult stem cell transformation.*  
Cancer Res;65:3035-3039.
- SCHÄCHINGER V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. (2006a)  
*Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial.*  
Eur Heart J;27:2775-83.
- SCHÄCHINGER V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM (2006b)  
*Transplantation Of Progenitor Cells And Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction.*  
Journal of the American College of Cardiology;44 (Vol.8): 1690-9.

SCHARENBERG CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002)

*The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors.*

Blood;99:507-512.

SIWIK DA, Chang DL, Colucci WS (2000)

*Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro.*

Circ Res;86:1259-1265.

SPANGRUDE GJ; Heimfeld S, Weissman IL (1988)

*Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells.*

Science;241:58-62.

STATISTISCHES BUNDESAMT DEUTSCHLAND

*<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/SterbefaelleInsgesamt.psml>*

Datum des Zugriffs: 20.01.2009

STEWART S, MacIntyre K, Hole DJ et al. (2001)

*More "malignant" than cancer? Five year survival following a first admission for heart failure.*

Eur J Heart Fail;3;315-22.

STRAUER BE, Brehm M, Zeus T, et al. (2002)

*Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.*

Circulation;106:1913-8.

SUTTON MG, Sharpe N (2000)

*Left ventricular remodelling after myocardial infarction; pathophysiology and therapy.*

Circulation;101:2981-2988.

TAKAHASHI M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. (2006)

*Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol;291:H886-H893.



- THEISE ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000)  
*Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation.*  
Hepatology;31:235-40.
- TIYYAGURA SR, Pinney SP (2006)  
*Left ventricular remodelling after myocardial infarction: past, present, and future.*  
Mt Sinai J Med;73(6):840-51.
- UEMURA R, Xu M, Ahmad N, et al. (2006)  
*Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodelling of ischemic heart through paracrine signaling.*  
Circ Res;98:1414-1421.
- WAGERS AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL (2002)  
*Little evidence for development plasticity of adult hematopoietic stem cells.*  
Science;Vol. 297: 2256-2259.
- WAKITANI S, Saito T, Caplan AI (1995)  
*Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal cells exposed to 5-azacytidine.*  
Muscle Nerve;18:1417-1426.
- WALL ST, Walker JC, Healy KE, Ratcliffe MB, Guccione JM. (2006)  
*Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation.*  
Circulation 2006;114:2627–35.
- WEISMAN HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B (1988)  
*Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion.*  
Circulation;78:186-201.
- WOODBURY D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB (2000)  
*Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.*  
J Neurosci Res;61:364-370.
- ZHAO LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC (2002)  
*Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain.*  
Exp Neurol;174:11-20

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen, die mir beim Erstellen dieser Dissertationsschrift mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Besonderer Dank gilt dabei zuvorderst Priv. Doz. Dr. S. Frantz für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas sowie für Beratung und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

Vielen herzlichen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die immer freundliche Atmosphäre und die unkomplizierte Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Frau Helga Wagner, Frau Babara Bayer, Frau Charlotte Dienesch und Frau Nadja Blömer bedanken.

Beim Direktor der Medizinischen Klinik, Herrn Prof. Dr. Ertl, bedanke ich mich für die Überlassung der Laborräume zur Durchführung der Arbeit.

Abschließend danke ich ganz herzlich meinen Eltern für ihre stete Förderung während des gesamten Studiums, meinem Bruder für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit und Dir, lieber Johannes, für die vielen aufmunternden Worte während der Zeit der Fertigstellung dieser Arbeit.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Kristina Miriam Henig  
Geburtsdatum: 23.06.1984  
Geburtsort: Würzburg

## Schulbildung

1990-1994 Burkarder-Grundschule Würzburg  
1994-2003 Deutschhaus-Gymnasium Würzburg

## Hochschulausbildung

10/2003-11/2009 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
9/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: „sehr gut“ (1,0))  
11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: „sehr gut“ (1,5))

## Praktisches Jahr

08/2008-12/2008 Chirurgie (Kantonsspital Walenstadt, Schweiz)  
12/2008-03/2009 Wahlfach Herz-, Thoraxchirurgie (Universitätsklinikum Würzburg)  
03/2009-07/2009 Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)

## Veröffentlichung

FRANTZ S, Vallabhapurapu D, Tillmanns J, Brousos N, Wagner H, Henig K, Ertl G, Müller  
AM, Bauersachs J (2008)  
*Impact of different bone marrow cell preparations on left ventricular remodelling  
after experimental myocardial infarction.*  
Eur J Heart Failure;10(2):119-24

Würzburg, den 01.01.10

Kristina Miriam Henig