

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

# **Mechanismen der Progenitorzell- induzierten Gefäßneubildung und myo- kardialen Funktionsverbesserung**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Dr. med. Thomas Ziebart**

geboren am 16.05.1976 in Bad Kreuznach

Mainz, 2007







## Veröffentlichung

Während der Zeit dieser Arbeit wurde folgende Arbeit mit eigener Beteiligung zur Publikation eingereicht und publiziert:

Ken-ichiro Sasaki, Christopher Heeschen, Alexandra Aicher, **Thomas Ziebart**, Joerg Honold, Carmen Urbich, Lothar Rossig, Ulrike Koehl, Masamichi Koyanagi, Annisuddin Mohamed, Ralf P. Brandes, Hans Martin, Andreas M. Zeiher, Stefanie Dimmeler (2006). "Ex vivo pretreatment of bone marrow mononuclear cells with the eNOS enhancer AVE9488 enhances their functional activity for cell therapy." Proc Natl Acad Sci U S A. **103 (39)** 14537-41.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	13
1.1 Allgemeines.....	13
1.2 Der Myokardinfarkt: Pathophysiologie und Folgen.....	14
1.3 Pathogenese des Remodeling und der Herzinsuffizienz.....	15
1.4 Aufbau des Blutgefäßsystems.....	17
1.5 Mechanismen der Blutgefäßentwicklung.....	18
1.6 Charakterisierung der Stammzellen.....	21
1.7 Charakterisierung der Endothelialen Progenitorzellen (EPC).....	23
1.8 Übersicht der tierexperimentellen Stammzelltherapie-Studien.....	25
1.9 Übersicht der klinischen Stammzelltherapie-Studien.....	28
1.10 Wirkungsweise und Mechanismen von Endothelialen Progenitorzellen.....	31
1.11 Überexpression von Genen in EPC mittels viraler Vektoren.....	32
1.12 Fragestellung.....	35
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>37</b>
2.1 Verwendete Organismen.....	37
2.2 Verwendete Zellen.....	37
2.3 Zellkulturmedien.....	37
2.4 Kultivierung von Endothelzellen.....	38
2.5 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK293T).....	38
2.6 Isolierung von Mononukleären Zellen und Kultivierung von EPC.....	39
2.7 Klonierte Konstrukte.....	40
2.8 Transfektion von Plasmiden.....	41
2.9 MTT-Messung zur Bestimmung der vitalen Zellen.....	41
2.10 Plasmidpreparation.....	41
2.11 Isolation von DNA aus Säugetierzellen.....	41
2.12 Isolation von RNA aus Säugetierzellen.....	42
2.13 PCR und RT-PCR.....	42
2.14 Herstellung von Lentiviren.....	43
2.15 Lentivirale Transduktion von humanen Zellen.....	44
2.16 Matrigel-Assay in der Nacktmaus.....	45
2.17 Hinterlaufischämie in der Nacktmaus.....	45
2.18 Myokardinfarkt in der Nacktmaus.....	46

# Inhaltsverzeichnis

2.19 Statistische Verfahren.....	46
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1 Gancyclovirbehandlung von TK-transfizierten HUVEC .....	47
3.1.1 Testung der Thymidinkinase in HUVEC.....	47
3.1.2 Transduktionseffizienz des Vektors SEW in verschiedenen Zellen.....	48
3.1.3 Klonierung der Konstrukte SETKW8 und SITKW7.....	49
3.1.4 Transduktionseffizienz unterschiedlicher lentiviraler Vektoren.....	50
3.2 Biologisches Verhalten von EPC nach Transduktion mit den lentiviralen Vektoren.....	51
3.2.1 Nachweis der Integration der TK in das Genom von HUVEC und EPC.....	51
3.2.2 Koloniebildungsfähigkeit und Migrationsverhalten von transduzierten versus untransduzierten EPC.....	52
3.2.3 Abtötung von TK-transduzierten HUVEC durch Gancyclovirbehandlung.....	53
3.2.4 Abtötung von TK-transduzierten EPC durch Gancyclovirbehandlung.....	55
3.2.5 Unspezifische Toxizität von TK-transduzierten Zellen bei Gancyclovirbehandlung.....	57
3.3 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Matri-gelmodell der Nacktmaus.....	58
3.4 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Hinter-laufischämiemodell der Nacktmaus.....	61
3.5 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Herzin-farktmodell der Nacktmaus.....	63
3.5.1 Auswirkung der intracavitären Zelltherapie nach Myokardinfarkt auf Infarkt-größe und Organgewicht (AMI-1).....	64
3.5.2 Auswirkung der intracavitären Zelltherapie nach Myokardinfarkt auf die Herzfunktion (AMI-2).....	65
3.5.3 Auswirkung der systemischen intravenösen Zelltherapie nach Myokard-infarkt (AMI-3).....	66
3.5.4 Untersuchung auf mögliche Gancyclovir-bedingte Organschäden an den Tieren von Versuch AMI-3.....	72
3.5.5 Nachweis von humanen Zellen im ischämischen Myokard.....	73
3.6 Aventis-eNOS-enhancer (AVE): Ein therapeutischer Ansatz zur Verbess-erung der eingeschränkten zelltherapeutischen Funktion von EPC und BMC.....	74

# Inhaltsverzeichnis

3.6.1 Gesteigerte eNOS-Expression nach Inkubation der EPC und BMC mit AVE70119.....	74
3.6.2 Einfluss von AVE70119 auf das Neovaskularisationspotential von Patienten-BMC.....	75
3.6.3 Einfluss von AVE9488 und AVE70119 im Rahmen der BMC-Zelltherapie im Herzinfarktmodell der Nacktmaus.....	76
3.6.4 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE9488 auf die Herzfunktion nach Stammzelltherapie.....	77
3.6.5 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE9488 auf das Gewicht der Ventrikel und der Lunge sowie der Infarktgröße.....	79
3.6.6 Einfluss von BMC-Vorbehandlung mit AVE70119 auf die Herzfunktion nach Stammzelltherapie.....	81
3.6.7 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE70119 auf das Gewicht der Ventrikel und der Lunge sowie der Infarktgröße.....	82
3.6.8 Vergleich von AVE9488 und AVE70119 an Hand der Infarktgröße.....	83
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>84</b>
4.1 Einsatz von lentiviralen Vektoren in der Erforschung von EPC.....	84
4.2 Vergleich der drei unterschiedlichen Tiermodellen zur Erforschung der EPC-Zelltherapie.....	85
4.3 Zelltherapie im Myokardinfarktmodell in der athymischen Nacktmaus.....	87
4.3.1 Diskussion der Versuchsdurchführung und Komplikationen beim Myokardinfarkt.....	87
4.3.2 Auswirkung der Zelltherapie und anschließende Depletion der EPC auf die Herzfunktion.....	88
4.3.3 Einsatz der Magnetresonanztomographie bei der Beurteilung EPC-Gabe auf die kardiale Dysfunktion im Mausmodell.....	90
4.3.4 Einfluss der Zelltherapie auf die Infarktgröße.....	90
4.4 Limitation des TK-tansduzierenden Vektorsystems.....	91
4.5 Biologische Wirkung von EPC im Rahmen der Zelltherapie.....	93
4.6 Beeinflussung der Stammzellfunktion durch die eNOS-Aktivität.....	97
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>7 Litheratur.....</b>	<b>103</b>



# Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b>	Aufbau und Struktur der Blutgefäße.....	18
<b>Abbildung 1.2:</b>	Mechanismen der Blutgefäßentwicklung: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese.....	20
<b>Abbildung 1.3:</b>	Entwicklung der humane und murinen hämatopoetischen Progenitorzellen und deren wichtigsten Oberflächenanti-Genen.....	22
<b>Abbildung 1.4.:</b>	Ursprung und Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen.....	24
<b>Abbildung 1.5:</b>	Zusammenfassung möglicher Mechanismen der Stammzelltherapie.....	32
<b>Abbildung 2.1:</b>	Struktur der lentiviralen Helferplasmide.....	43
<b>Abbildung 3.1:</b>	HUVEC transfiziert mit einem Leerplasmid oder dem TK-Plasmid.....	47
<b>Abbildung 3.2:</b>	Auftragung der Transduktionseffizienz für verschiedene Verdünnung des Virusüberstande mit frischem Medium im Verhältnis 1:9, 3:7 oder 1:1 im Vergleich zur Kontrolle, unterteilt in die Zellpopulationen MNC, EPC und HUVEC.....	48
<b>Abbildung 3.3:</b>	Klonierungsstrategie für die Vektoren SETKW8 und SITKW7.....	49
<b>Abbildung 3.4:</b>	Transduktionseffizienz der Vektoren SEW, SIEW und SITKW7.....	50
<b>Abbildung 3.5:</b>	Nachweis der Integration des Zielgens TK in das Genom von EPC und HUVEC nach Transduktion mit den Vektoren SITKW7 und SETKW8.....	51
<b>Abbildung 3.6:</b>	Anzahl der gebildeten Kolonien ausgehend von untransduzierten EPC und EPC transduziert mit dem Vektor SEW und SIEW.....	52
<b>Abbildung 3.7:</b>	Migrationsverhalten transduzierter EPC versus untransduzierter EPC mit oder ohne Stimulation mit.....	53
<b>Abbildung 3.8:</b>	MTT-Assay von transduzierten HUVEC mit der viralen Thymidinkinase (SITKW7) oder GFP (SIEW) als Kontrollgruppe nach Behandlung mit 0, 10 oder 50 µM Gancyclovir für	

## Abbildungsverzeichnis

	48 Stunden.....	54
<b>Abbildung 3.9:</b>	MTT-Assay von transduzierten HUVEC mit der viralen Thymidinkinase (SETKW8) oder GFP (SEW) als Kontrollgruppe nach Behandlung mit 0, 10 oder 50 $\mu$ M Gancyclovir für 48 Stunden.....	54
<b>Abbildung 3.10:</b>	Abtötung von TK-transduzierten EPC nach Gabe von Gancyclovir.....	55
<b>Abbildung 3.11:</b>	Abtötung der TK-transduzierten EPC (SITKW7) nach der Gabe von Gancyclovir.....	56
<b>Abbildung 3.12:</b>	Abtötung der TK-transduzierten EPC (SETKW8) nach Gabe von Gancyclovir.....	56
<b>Abbildung 3.13:</b>	Ausschluss der unspezifischen Toxizität von TK-transduzierten EPC bei Gancyclovirgabe.....	57
<b>Abbildung 3.14 :</b>	Versuchsdesign der in vivo Matrigelexperimente in der Nacktmaus.....	58
<b>Abbildung 3.15:</b>	Kurzzeitexperiment. Einfluss von gezielter Eliminierung der EPC auf die Anzahl von SMA+-Zellen in Matrigel-Plugs durch 5-tägige Gancyclovirgabe direkt im Anschluss an die Zellinfusion.....	59
<b>Abbildung 3.16:</b>	Langzeitexperiment. Einfluss von gezielter Eliminierung der EPC auf die Anzahl von SMA+-Zellen in Matrigel-Plugs durch 5-tägige Gancyclovirgabe eine Woche nach Zellinfusion.....	60
<b>Abbildung 3.17:</b>	Exemplarische konfokale mikroskopische Aufnahmen des Matrigellangzeitexperiments.....	60
<b>Abbildung 3.18:</b>	Einfluss von EPC auf die Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus.....	61
<b>Abbildung 3.19:</b>	Einfluss von EPC auf die Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus.....	62
<b>Abbildung 3.20:</b>	Einfluss der intracavitären Zelltherapie nach AMI auf die Organengewichte von Herz und Lunge in der Nacktmaus.....	64
<b>Abbildung 3.21:</b>	Visuell bestimmte Infarktgrößen in den einzelnen Gruppen nach intraventrikulärer Gabe von TK-transduzierten EPC mit nachfolgender Gabe von Gancyclovir oder PBS.....	65

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 3.22:</b>	Prozentuale Änderung der Herzleistung nach dreitägiger GV-Gabe.....	66
<b>Abbildung 3.23:</b>	Versuchsdesign des Herzinfarktversuches AMI-3.....	67
<b>Abbildung 3.24:</b>	Ejektionsfraktion (EF) in den einzelnen Tiergruppen nach intravenöser Zelltherapie.....	68
<b>Abbildung 3.25:</b>	Ermitteltes endsystolisches Volumen (ESV) aus den MRT-Daten.....	69
<b>Abbildung 3.26:</b>	Repräsentative MRT-Bilder von Versuchstieren aus AMI-3..	69
<b>Abbildung 3.27:</b>	Einfluss der intravenösen Zelltherapie nach AMI auf die Organgewichte von Herz und Lunge in der Nacktmaus.....	70
<b>Abbildung 3.28:</b>	Histologisch bestimmte Infarktgröße in den einzelnen Gruppen nach intravenöser Gabe transduzierter EPC mit teilweiser nachfolgender Gabe von Gancyclovir sowie repräsentative histologische Bilder aus den einzelnen Gruppen.....	71
<b>Abbildung 3.29:</b>	Histologische Aufnahmen muriner Organe nach Gancyclovirbehandlung.....	72
<b>Abbildung 3.30:</b>	Konfokalmikroskopische Aufnahmen.....	73
<b>Abbildung 3.31:</b>	eNOS-Expression in EPC nach 24-stündiger AVE-Inkubation.....	74
<b>Abbildung 3.32:</b>	eNOS-Expression in BMC nach 24 stündiger Inkubation mit unterschiedlichen AVE-Konzentrationen.....	75
<b>Abbildung 3.33:</b>	Signifikante Erhöhung der Kapillardichte durch Präinkubation für 24 Stunden mit 25 µM AVE im Vergleich zu DMSO behandelten BMC.....	76
<b>Abbildung 3.34:</b>	Exemplarische Druckvolumenkurven der einzelnen Versuchsgruppen ermittelt mit Hilfe eines Linksherzkatheters...	77
<b>Abbildung 3.35:</b>	Verbesserte Herzleistung nach Stammzelltherapie und Vorinkubation mit AVE.....	78
<b>Abbildung 3.36:</b>	Ermitteltes Körpergewicht, Gewicht von linkem und rechtem Ventrikel sowie der Lunge.....	79
<b>Abbildung 3.37:</b>	Ermittlung der Infarktgröße.....	80
<b>Abbildung 3.38:</b>	Infarktgröße in den einzelnen Gruppen.....	80
<b>Abbildung 3.39:</b>	Funktionelle echokardiographische Daten.....	81
<b>Abbildung 3.40:</b>	Ermitteltes Gewicht von linkem und rechtem Ventrikel so-	

## Abbildungsverzeichnis

	wie der Lunge und bestimmte Infarktgröße.....	82
<b>Abbildung 3.41:</b>	Infarktgröße nach Zelltherapie mit BMC.....	83
<b>Abbildung 3.42:</b>	Infarktgrößen nach systemischer intravenöser Behandlung mit und ohne vorbehandelten BMC.....	83
<b>Abbildung 4.1:</b>	Bystander Effekt.....	92
<b>Abbildung 4.2:</b>	Mögliche Mechanismen der kardialen Regeneration im Rahmen der Stammzelltherapie mit endothelialen Progeni- Torzellen.....	96

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind Haupttodesursachen in Europa und den USA (Selwyn et al., 2005). In Deutschland hat die koronare Herzkrankheit (KHK) eine Lebenszeitprävalenz von ca. 30% für Männer und ca. 15% für Frauen (Herold, 2003). Es ist zu erwarten, dass bis zum Jahr 2020 die ischämische Herzkrankheit auch weltweit die häufigste Todesursache darstellt (Selwyn et al., 2005). Unter dem Begriff „ischämische Herzkrankheit“ werden Krankheitsbilder zusammengefasst, die auf einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Myokards beruhen. Dabei wird die Sauerstoffversorgung der Herzmuskulatur vor allem durch Stenosen im koronaren Gefäßsystem gedrosselt, was als Koronarinsuffizienz bezeichnet wird. Der klinische Begriff „koronare Herzkrankheit“ (KHK) bezeichnet die durch Arteriosklerose der Herzkranzgefäße entstandene ischämische Herzkrankheit. Die dadurch bedingte Myokardischämie manifestiert sich in verschiedenen Erkrankungsbildern: Angina pectoris, Herzinfarkt, ischämische Herzmuskelschädigung mit Linksherzinsuffizienz sowie Herzrhythmusstörungen und Sekundentod sind nur eine Auswahl von Erkrankungen, die ihr zugeschrieben werden. Für das Auftreten einer KHK wurde eine Reihe von Risikofaktoren gefunden, die sich additiv verstärken können. Risikofaktoren sind: Alter, männliches Geschlecht, Hyperlipoproteinämie, Zigarettenrauch, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Hyperhomocysteinämie (Riede et al., 2003). Das heutige medikamentöse Behandlungsschema der weit verbreiteten Erkrankung beruht lediglich darauf, abgesehen von einem Risikofaktorenmanagement, einerseits durch Steigerung des Sauerstoffangebotes und andererseits durch Senkung des Sauerstoffbedarfs die Progredienz der Erkrankung zu verhindern (Schütz, 2001). Die Therapie mit Stamm- und Progenitorzellen zielt nicht nur darauf, die Progredienz der Erkrankung zu stoppen, sondern besitzt das Potential über eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion und der Vaskularisierung die koronare Herzkrankheit zu therapieren. Die Stammzelltherapie stellt somit eine ideal ergänzende Therapie zu den invasiven Verfahren wie perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) oder der Bypasschirurgie dar.

### **1.2 Der Myokardinfarkt: Pathophysiologie und Folgen**

Ein Großteil der Herzinfarkte entsteht im Rahmen einer koronaren Herzkrankheit (KHK). Wie beinahe alle akuten Koronarsyndrome beim Menschen werden sie fast immer durch eine Minderdurchblutung in einem Herzkranzgefäß hervorgerufen, die auf eine atherosklerotische Veränderung der Gefäße mit zusätzlichen Blutgerinnseln („Koronarthrombose“) zurückzuführen sind und von einer krampfartigen Gefäßverengung (Koronarspasmus) begleitet sein kann (Lip et al. 1998; Riede et al. 2003). Das sich daraus entwickelnde Krankheitsbild hängt von der Schwere, der Lokalisation und der Dauer der Durchblutungsstörung des Herzmuskels ab. Bei ST-Hebungsinfarkten (STEMI) zeigt sich im akuten Stadium bei über 90 % ein durch Blutgerinnsel (Thromben) verschlossenes Herzkranzgefäß. Bei einem „Nicht-ST-Hebungsinfarkt“ (NSTEMI) sind nur in etwa 50 % der Fälle Thromben in den Kranzgefäßen nachweisbar. 65-75 % der ST-Hebungsinfarkte entstehen durch die Ruptur eines „vulnerablen“ Plaques, also dem Einriss der dünnen fibrösen Kappe einer entzündlich veränderten lipidreichen Gefäßwandveränderung. Etwa 75 % der Infarkte entstehen an nur leicht oder mittelgradig veränderten Abschnitten der Herzkranzgefäße. Deutlich seltener ist ein Herzinfarkt Folge einer anderen Erkrankung. In Frage kommen Verschlüsse der Herzkranzgefäße durch andere Ursachen wie langanhaltende „Verkrampfungen“ (Spasmen) bei Prinzmetal-Angina und Embolien bei einer Endokarditis oder einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) (Bonello et al. 2006). Auch Blutungen oder Tumoren am Herzen sowie Einrisse der Gefäßinnenwand (Werner et al., 2003) bei einer Aortendissektion können zum Verschluss eines Kranzgefäßes und damit zum Herzinfarkt führen (Park et al., 2007). Wenn seine Blutzufuhr komplett unterbrochen ist, beginnt der Herzmuskel nach 15-30 Minuten abzusterben. Dieser Vorgang der Infarzierung beginnt innen, in der den Herzkammern zugewandten Schicht, und setzt sich zeitabhängig nach außen, zum Herzbeutel hin, fort (Riede et al., 2004).

### **1.3 Pathogenese des Remodeling und der Herzinsuffizienz**

Das Remodeling nach Myokardinfarkt ist ein entscheidender Faktor für das Auftreten einer Herzinsuffizienz. Direkt nach dem Auftreten des Myokardinfarktes beginnen sich Struktur, Größe und Form des Ventrikels zu ändern (Swynghedauw et al., 1999). Der segmentale Verlust an kontraktile Masse führt in der Regel bei großen transmuralen Infarkten innerhalb der ersten Woche zu Dehnung und Ausdünnung des Infarktgebietes, was auch als Expansion bezeichnet wird (Hutchins et al., 1978; Pfeffer et al., 1990). Patienten mit Infarktexpansion besitzen eine höhere Prädisposition für das Auftreten von Aneurysmen, Myokardrupturen und für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (Schuster et al., 1979; Erlebacher et al., 1982; Jugdutt et al., 1987). An die Infarktexpansion schließt sich eine fortlaufende Erweiterung des nichtinfarzierten Ventrikelabschnittes an, die abhängig von der Größe des Infarktes, von der ventrikulären Wandbelastung und von der Infarkttheilung ist (Pfeffer et al., 1990). Die größte Wandbeanspruchung im infarzierten Ventrikel liegt an der Grenze zwischen infarziertem und nichtinfarziertem Myokard (Bogen et al., 1980). Die Dilatation des Ventrikels kann als Kompensationsmechanismus im Hinblick auf die Dysfunktion des Ventrikels verstanden werden, um das Schlagvolumen trotz abnehmender Ejektionsfraktion aufrechtzuerhalten (Pfeffer et al., 1990). Als weiterer Pathogenitätsfaktor setzt eine Hypertrophie und Fibrose des verbleibenden nichtinfarzierten Restmyokards ein. Hierdurch wird zunächst die Kontraktionskraft gesteigert und, entsprechend dem La-Place-Gesetz, die Wandspannung gemindert.

Es ist bekannt, dass unter anderem Aldosteron, Angiotensin II und Superoxidanionradikale das Fibroblastenwachstum mit einer vermehrten Bildung von Kollagen anregen (Brilla et al., 1993; Siwik et al., 2004; Yamamoto et al., 2005). Das Fortschreiten der Herzinsuffizienz wird auch durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Relation zur Kardiomyozytenmasse begünstigt, welches zu einer Verminderung der Koronarreserve führt (Breisch et al., 1984; Cannon, 1987). Das anfänglich bestehende Gleichgewicht zwischen der kompensatorischen Dilatation und der Hypertrophie des Ventrikels gerät schnell ins Wanken, was Auswirkungen auf das Füllungsvolumen des Herzens hat und die ventrikuläre Erweiterung und Dysfunktion vorantreibt (Pfeffer et al., 1990). Neben der Hypertrophie kommt es auch im nichtinfarzierten Myokard zu Nekrosen und Apoptosen, die eine weitere Progression der Herzinsuffizienz fördern (Tan et al., 1991; Olivetti et al., 1997).

## Einleitung

Die Infarktfolgen und Komplikationen werden nochmals in kürze zusammengefasst:

- Im Rahmen der Defektheilung wird das entstandene nekrotische Gewebe in eine bindegewebige Narbe umgewandelt. Die Akinesie des Narbenbezirkes führt zu einer gestörten Synergie der Ventrikelkontraktion und wirkt sich ungünstig auf die Pumpfunktion aus.
- Murale Thromben im linken Ventrikel können wiederum Embolien im großen Kreislauf bewirken und so weitere Infarkte in Gehirn, Herz oder anderen Organen auslösen.
- Nach frischem Myokardinfarkt im Bereich des Septums kann es nach Perforation zur Ausbildung eines Links-rechts-Shunt oder zu einer Ruptur eines Papillarmuskels mit Mitralinsuffizienz kommen. Somit kommt zur Kontraktionsstörung bei Herzinfarkt eine hämodynamisch meist schwere Volumenbelastung des linken Ventrikels hinzu, die oft rasch zum Tode führt.
- Bei transmuraalem Infarkt einer Ventrikelwand kann es zu einer Perikardtamponade kommen. In einer Vielzahl der Fälle verläuft sie letal. Gedeckte Perforationen mit Ausbildung eines Aneurysma spurium, wobei das Perikard als Aneurysmawand dient, sind beschrieben worden.
- Im Rahmen des chronischen Verlaufs nach Myokardinfarkt kann es zur Ausbildung eines Ventrikelwandaneurysmasacks kommen. Durch systolische Ausbuchtung des Aneurysmas pendelt Blut innerhalb des Ventrikels hin und her. Dies bedingt eine Erhöhung der Wandspannung und die Dyskinese des Kontraktionsablaufs und führt zu einem Umbau des linken Ventrikels, der auch als Remodeling bezeichnet wird, mit deutlich erhöhtem diastolischem Druck und erniedrigtem Herzminutenvolumen. Der Vorgang des Remodeling kann wiederum zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz führen.



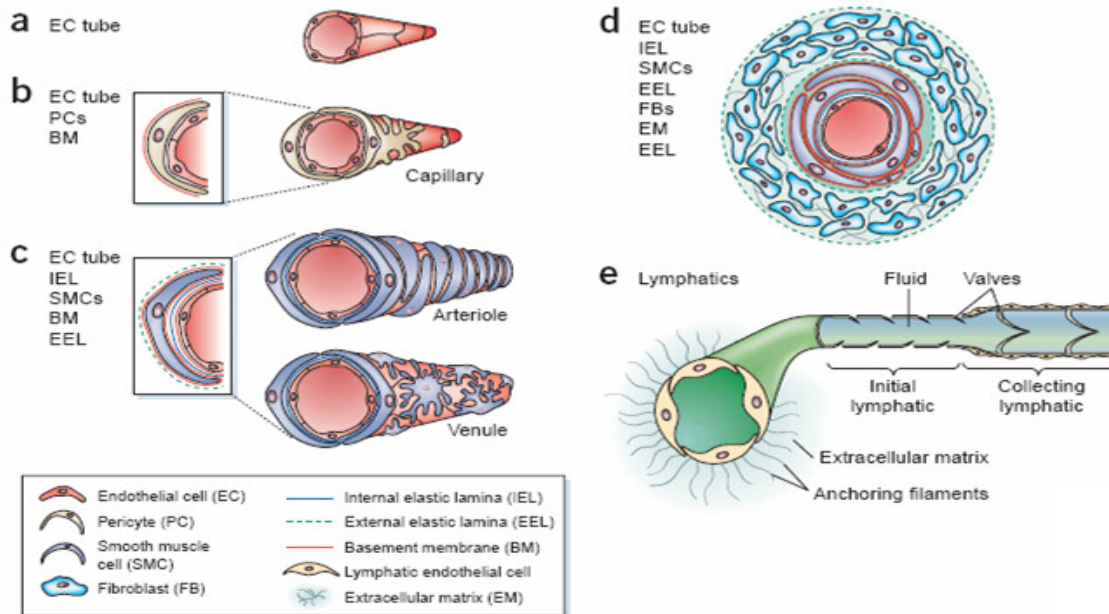
# Einleitung

## 1.4 Aufbau des Blutgefäßsystems

In Einzellern und niederen mehrzelligen Organismen laufen die Transportvorgänge von Sauerstoff und Nährstoffen mit Hilfe von Diffusionsprozessen ab. Unabdingbar für das Entstehen von höheren Organismen ist die Fähigkeit, Sauerstoff und Nährstoffe zu den einzelnen Zellen zu transportieren. In Vertebraten wird dies durch das Blutgefäßsystem bewerkstelligt. Das Blutgefäßsystem ist hierarchisch aufgebaut. Große, vom Herz wegführende Gefäße (Arterien), verzweigen sich immer weiter und führen schließlich zur Ausbildung eines dichten Kapillarnetzes, welches zum Austausch von Atmungsgasen und Nährstoffen dient. Im Anschluss vereinigen sich die Kapillargefäße und bilden den venösen Blutgefäßanteil, der wieder zum Herzen zurückführt. Neben dem venösen Anteil des Blutgefäßsystems dient auch das Lymphsystem neben seinen immunologischen Aufgaben dazu, interstitielle Flüssigkeit zu sammeln und wieder über den Venenwinkel in das Herz zu drainieren (Thews et al., 2007). Die größeren Gefäße besitzen einen dreischichtigen Aufbau: Die Tunica intima besteht aus einem einschichtigen Endothel und dem Stratum subendotheliale, ein feines lockeres Bindegewebe. Als Grenze zur Tunica media fungiert die Membrana elastica interna. Die Tunica media ist aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen aufgebaut. Daneben befinden sich in unterschiedlicher Menge Elastin, Kollagen und Proteoglykane. Nach außen hin befindet sich die Membrana elastica, die auch noch zur Tunica media gerechnet wird. Die Tunica externa, die auch als Adventitia bezeichnet wird, besteht aus Bindegewebe mit elastischen Fasern (Mulvany, 1992; Thews et al., 2007). Der Stoffaustausch zwischen Blut und Gewebe findet in den Kapillaren statt. Kapillaren bestehen aus Endothelzellen, die von Perizyten und einer Basallamina bedeckt sind. Die Funktion der Endothelzellen ist mannigfaltig und beschränkt sich nicht allein auf eine rein passiv auskleidende Funktion der Gefäßwand. Vielmehr erfüllen sie eine Reihe von sensorischen Aufgaben, nehmen Veränderungen des strömenden Blutes wahr, reagieren auf vasoaktive Substanzen und metabolische Faktoren und leiten Informationen an die umliegenden Zellen weiter. Dadurch greift das Endothel aktiv über die Steuerung des Gefäßtonus in die Gefäßregulation ein. Weiterhin erhält das Endothel die Homöostase von Thrombose und Fibrinolyse und tritt in Interaktion mit Leukozyten und ermöglicht so die Migration dieser durch das Endothel (Furchgott et al., 1980; Butcher, 1991; Hartwell et al., 1999).

# Einleitung

Auch spielt das Endothel eine wichtige Rolle in einer Reihe von pathologischen Prozessen wie Allergien, Vaskulopathien und der Atherosklerose.



**Abbildung 1.1:** Aufbau und Struktur der Blutgefäße, nach (Jain, 2003)

## 1.5 Mechanismen der Blutgefäßentwicklung

Die Entwicklung von Blutgefäßen ist ein essentieller Vorgang für die Entwicklung des Embryos. Sie spielt darüber hinaus auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle im Rahmen von Heilungs- und Regenerationsprozessen. Auch im Rahmen von pathophysiologischen Vorgängen wie dem Tumorwachstum ist sie von höchster Bedeutung und Gegenstand aktueller Forschung. Die Erkenntnisse über die Beeinflussung des Gefäß- und Kollateralwachstums mittels Wachstumsfaktoren und Cytokinen führte auch zu dem Ansatz der therapeutischen Angiogenese und Arteriogenese (Henry, 1999; Freedman et al., 2002; Losordo et al., 2004).

## Einleitung

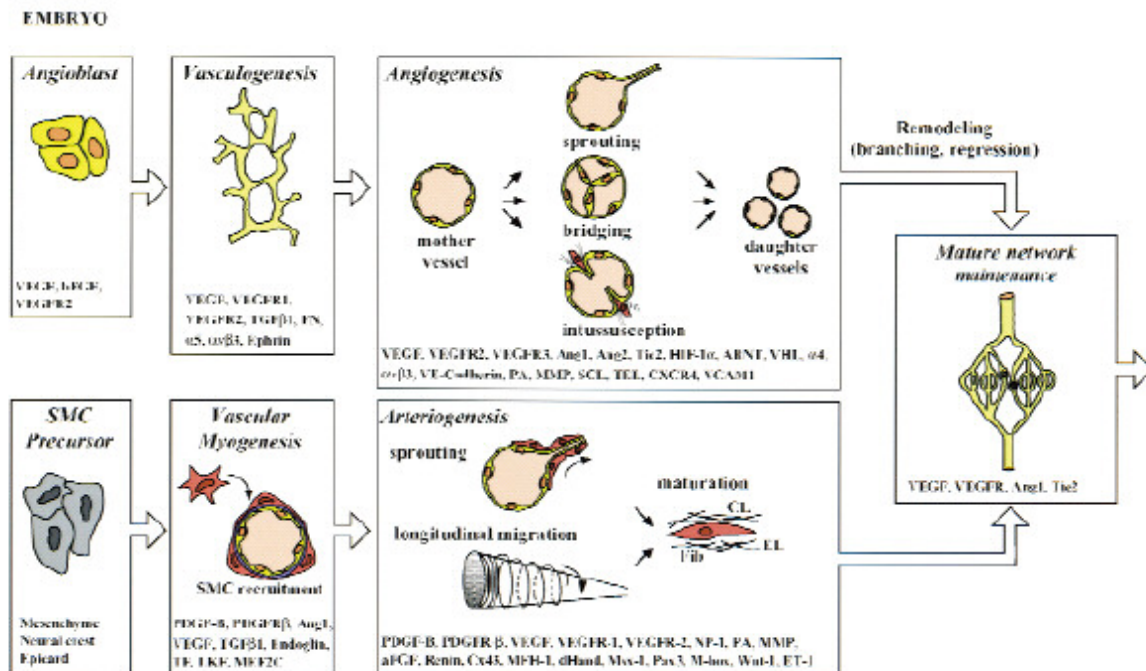
Es werden zwei Mechanismen der Blutgefäßentwicklung unterschieden:

- Vaskulogenese
- Angiogenese
- Arteriogenese

Die embryonale Blutgefäßentwicklung basiert auf der Bildung von Blutgefäßen durch Hämangioblasten (Carmeliet, 2003). Im Rahmen der Embryonalentwicklung formen Hämangioblasten im Dottersack Mesenchymalzellagregate, die auch als Blutinseln bezeichnet werden. Die inneren Zellen entwickeln sich zu hämatopoetischen Vorläuferzellen, die äußeren Zellen zu Endothelvorläuferzellen (Conway et al. 2001). In einem weiteren Schritt differenzieren die Endothelvorläuferzellen, die auch als Angioblasten bezeichnet werden, zu Endothelzellen, die ein erstes primitives Netzwerk formen. Die Angioblastendifferenzierung wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren getriggert und kontrolliert. Als Beispiel wichtiger Wachstumsfaktoren sind hier FGF-2 (bFGF, basic fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) zu nennen (Carmeliet, 2003). Shalaby et al. konnten bereits 1995 zeigen, dass in Mäusen die Inaktivierung des Flk-1-Gens (auch als VEGF-Rezeptor 2 bezeichnet) zu einer embryonalen Letalität aufgrund mangelnder Entwicklung von endothelialen als auch hämatopoetischen Zelllinien führt (Shalaby et al., 1995). In neuerer Zeit ist das Dogma verlassen worden, dass die Blutgefäßentwicklung aus endothelialen Vorläuferzellen auf die Embryogenese beschränkt ist (Conway et al., 2001). Tatsächlich findet ein reger Austausch von Progenitorzellen zwischen dem Knochenmark, Blut und Organen statt. Die Mobilisation und Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen wird auch im adulten Organismus durch Cytokine wie VEGF und GM-CSF (granulocyte-monocyte-colony-stimulating-factor) ermöglicht. Im Rahmen der Angiogenese kommt es zur Aussprossung von neuen Gefäßen aus bereits bestehenden Gefäßen (Carmeliet, 2000). Der Prozess der Aussprossung beginnt mit einer NO-vermittelten Vasodilatation der Gefäße. Es kommt zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, die zur Extravasation von Plasmaproteinen führt. Diese stellen ein Gerüst für die sich an dieser Stelle teilenden und migrierenden Endothelzellen dar. Die Migration der Endothelzellen wird dadurch ermöglicht, dass sich die intraendotheliale Zellkontakte lösen und die Extrazellulärmatrix durch eine Anzahl spezifischer Proteasen abgebaut wird. Im Rahmen der Angiogenese können sich auch bereits bestehende Gefäße durch Bildung endothelialer Zellbrücken in individuelle Tochtergefäße teilen (Conway et al., 2001). Der Mechanismus

## Einleitung

der Angiogenese besitzt auch im adulten Organismus eine große physiologische wie pathophysiologische Bedeutung. Physiologische Vorgänge der Angiogenese spielen sich im Rahmen des Ovarialzyklus und der Placentaentwicklung ab. Pathophysiologische Angiogenese findet sich im Rahmen des Tumorwachstums, ophthalmologischen und rheumatischen Erkrankungen als auch im Rahmen der Wundheilung. Eine Reihe von Wachstumsfaktoren regulieren sowohl die embryonale als auch adulte Angiogenese (Risau, 1997). Sowohl die Cytokine FGF, VEGF als auch ihre Rezeptoren beeinflussen die embryonale, neonatale und pathologische Angiogenese (Carmeliet, 2000). Jedoch zeigen sich auch Unterschiede in der Gefäßentwicklung des Embryos im Vergleich zur pathophysiologischen Angiogenese. Conway et al. konnten zeigen, dass adulte Gefäße weniger stark durch einen VEGF-Entzug beeinflusst werden als embryonale Gefäße (Conway et al., 2001). Im Rahmen des Gefäßwachstums ist ebenfalls die Arteriogenese von Bedeutung. Hierbei entstehen aus einem Geflecht bereits bestehender arterieller Verbindungen größere Arterien. De facto handelt es sich jedoch bei diesem Vorgang nicht um eine Neubildung von Gefäßen.

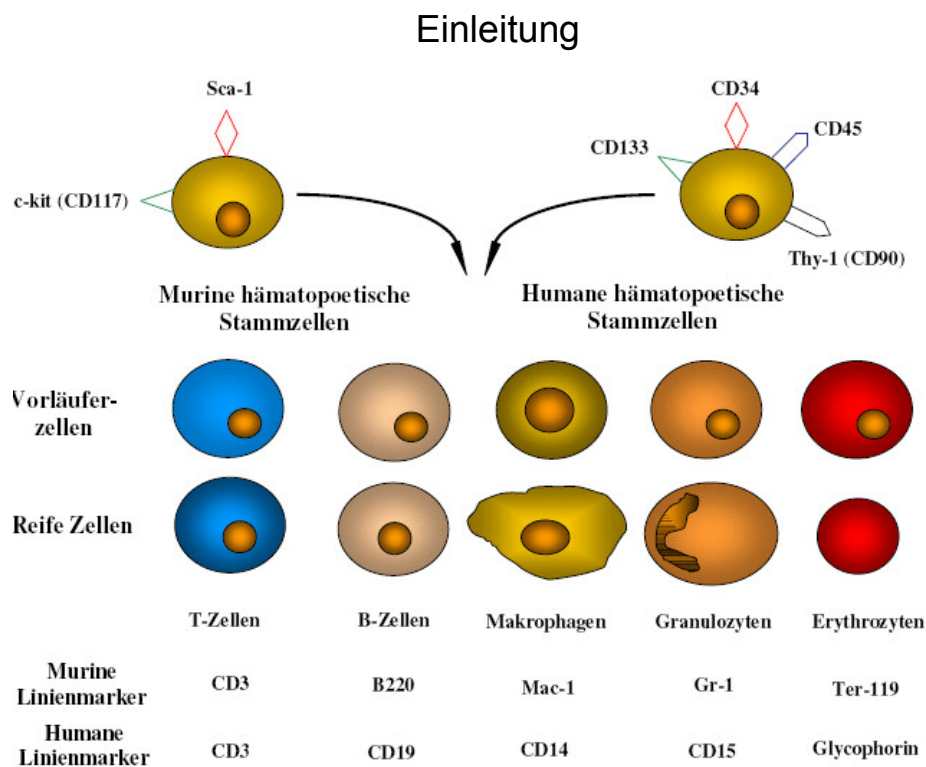


**Abbildung 1.2:** Mechanismen der Blutgefäßentwicklung: Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese (Carmeliet, 2000).

### **1.6 Charakterisierung der Stammzellen**

Stammzellen sind Körperzellen, die sich noch nicht differenziert haben. Das heißt, sie liegen noch nicht in einer Form vor, die sie für ihre Verwendung im Organismus spezialisiert, vielmehr ist ihre spätere Verwendung noch offen. Stammzellen sind in der Lage, ständig neue, organspezifische Tochterzellen zu erzeugen und sich dabei selbst zu erhalten. Hierzu befähigt sie ein noch nicht vollständig geklärter Mechanismus von asymmetrischer Zellteilung, der es ihnen erlaubt, einerseits Tochterzellen mit Stammzeleigenschaften zu generieren, andererseits andere Tochterzellen mit größerer Ausdifferenzierung hervorzubringen (Morrison et al., 1997). Unter Totipotenz wird die Fähigkeit verstanden, alle Zellarten und Organe bis hin zu einem selbständigen Organismus hervorzubringen. Als die ultimativ totipotente Zelle wird die Eizelle betrachtet. Die vollkommene Totipotenz bleibt bis zum 8-Zellstadium erhalten. Im Anschluss daran spricht man von pluripotenten embryonalen Stammzellen, da sie nicht mehr zu einem vollständigen Organismus heranwachsen können. Im Laufe der Embryogenese verlieren die Stammzellen ihr Entwicklungspotential, so dass letztendlich die sogenannten fetalen und adulten Stammzellen entstehen. Bis heute konnten in mehr als 20 Organen und Organsystemen wie unter anderem in Knochenmark, Blut, Herz und Leber adulte Stammzellen nachgewiesen werden. Sie haben die Aufgabe, lebenslang unterschiedliche organspezifische Ersatzzellen zu produzieren. Adulte Stammzellen lassen sich in hämatopoetische, mesenchymale, sidepopulation-Zellen und gewebeständige Stammzellen unterscheiden.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC) sind im Knochenmark lokalisiert. Als Kennzeichen hämatopoetischer Stammzellen gilt die Expression des Oberflächenmarkers CD34. Jedoch ist die Expression von CD34 nicht allein auf die hämatopoetischen Stammzellen beschränkt und wird auch von murenen Endothelzellen exprimiert. Somit wird zu weiteren Charakterisierung der Pan-Leukozytenmarker CD45 herangezogen.



**Abbildung 1.3:** Entwicklung der humanen und murinen hämatopoetischen Progenitorzellen und deren wichtigsten Oberflächenantigenen (nach Dimmeler 2005).

Mesenchymalen Stammzellen (MSC) sind ebenfalls im Knochenmark lokalisiert. Sie lassen sich aus der adhärenenten Fraktion des Knochenmarks kultivieren. Sie zeichnen sich durch eine fehlende Expression der Oberflächenantigene CD45 und CD34 aus. Typischerweise werden auf Stromazellen CD73, CD90 und CD105 exprimiert. Mesenchymale Stammzellen besitzen ein großes Differenzierungsspektrum. Neben einer Differenzierung in Knorpel-, Knochen- und Fettzellen (Pittenger et al., 1999) vermögen sie sich auch in Kardiomyozyten zu differenzieren (Makino et al., 1999).

Bei der Erforschung der Stammzellen konnte eine weitere Untergruppe identifiziert werden: die Nebenpopulationszellen „Side-population-cells“ kurz SP-Zellen. Namensgebend war die Fähigkeit dieser Zellen die Farbstoffe Hoechst 33342 und Rhodamin aktiv mittels eines ATP-bindenden Transporters aus der Zelle auszuschleusen. Durch diese Eigenschaft bilden sie eine Nebenpopulation in der FACS-Analyse Hoechst 33342 und Rhodamin gefärbter Stammzellen (Goodell et al., 1996). SP-Zellen werden neben dem Knochenmark in vielen Gewebearten gefunden, so dass es Hinweise gibt, dass sie mit gewebeständigen Stammzellen identisch sind (Dimmeler et al., 2005.). Interessanterweise können sich SP-Stammzellen auch zu Kardiomyozyten und Endothelzellen differenzieren (Jackson et al., 2001).

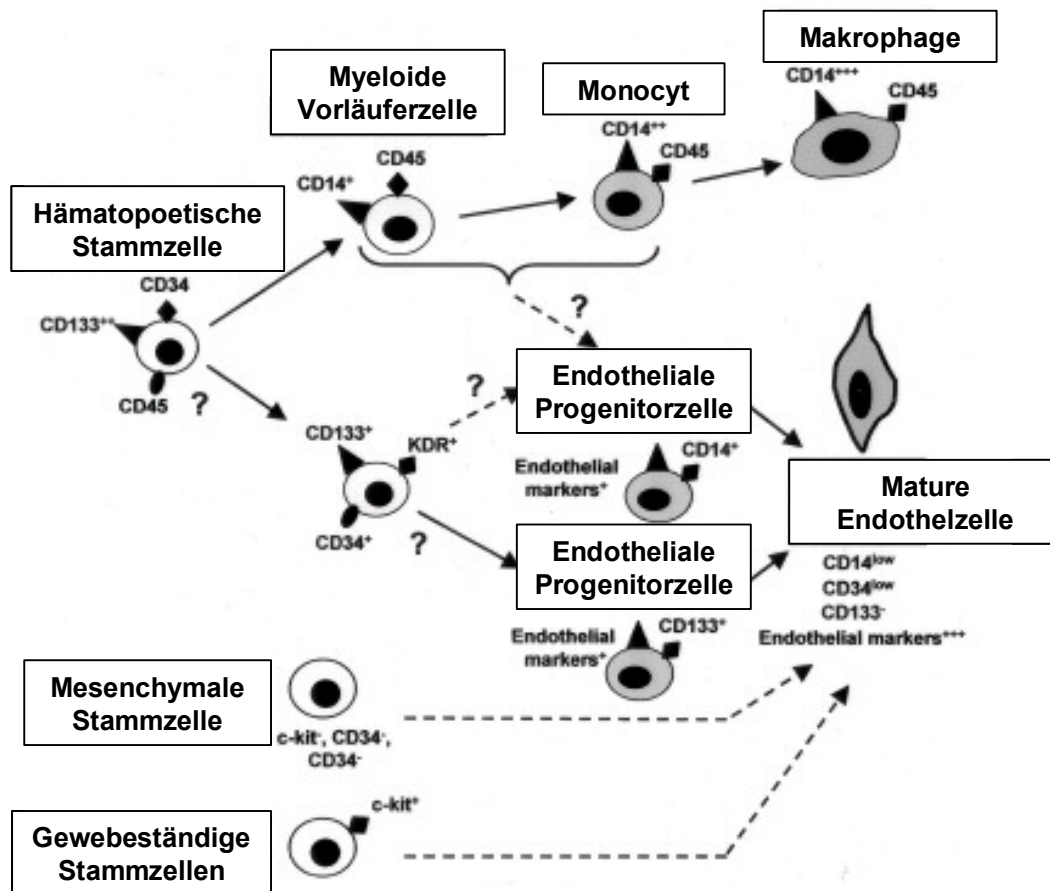
## Einleitung

Die gewebeständigen Stammzellen weisen zum Teil eine unterschiedliche Expression von Oberflächenmarker in den einzelnen Organen auf.  $\text{lin}^{-}/\text{c-kit}^{+}$ ,  $\text{Islet-1}$  oder  $\text{Sca-1}^{+}$  sind Oberflächenmarker, die bei gewebeständigen Stammzellen des Herzens gefunden werden können (Beltrami et al., 2003; Oh et al., 2003; Laugwitz et al., 2005). Gewebeständige Stammzellen haben die Aufgabe, untergegangenes Gewebe zu ersetzen. Als Beispiele für diese Art von Stammzellen seien die Kryptenzellen der Dünndarmzotten und die Satellitenzellen der Skelettmuskulatur genannt. Es ist vorstellbar, dass nach Erschöpfung des Pools der gewebeständigen Stammzellen zirkulierende Stammzellen deren Aufgabe übernehmen und in das ischämische Gewebe einwandern können und an den Reperationsprozessen teilhaben könnten (Dimmeler et al., 2005).

### **1.7 Charakterisierung der Endothelialen Progenitorzellen (EPC)**

Die Beschreibung der Endothelialen Progenitorzellen (EPC) geht auf die Arbeit von Asahara im Jahre 1997 zurück (Asahara et al., 1997). Er beschrieb die Existenz von Progenitorzellen im adulten Organismus, die sich in Endothelzellen differenzieren und zu einer Verbesserung der Vaskularisation nach Ischämie beitragen können. Folgestudien konnten weiterhin zeigen, dass EPC auch an der endothelialen Regeneration beteiligt sind (Walter et al., 2002; Werner et al., 2004). In den letzten 10 Jahren wurden verschiedene Arten von Stammzellen gefunden werden, die zur Differenzierung eines endothelialen Phänotyps fähig sind. Jedoch besteht bis heute Unklarheit über den zellbiologischen Ursprung der endothelialen Progenitorzellen. Aus dem peripheren Blut und Knochenmark lassen sich  $\text{CD34}^{+}$  oder  $\text{CD133}^{+}$  hämatopoetische Stammzellen isolieren, die neben den Stammzellmarker der hämatopoetischen Linie endotheliale Marker wie zum Beispiel  $\text{VEGFR2}$  exprimieren können.

## Einleitung



**Abbildung 1.4:** Ursprung und Differenzierung von Endothelialen Progenitorzellen nach (Urbich et al., 2004).

Neben den Stammzellen hämatopoetischen Ursprungs wurden auch Zellen des myeloiden Subtyps gefunden, die auch die Möglichkeit besitzen, sich in Endothelzellen zu differenzieren (Urbich et al., 2003; Rehman et al., 2003). Auch die im vorigen Abschnitt beschriebenen Nebenpopulationszellen „Side-population-cells“ und gewebeständige Stammzellen konnten als Ursprung endothelialer Zellen identifiziert werden (Reyes et al., 2002; Beltrami et al., 2003). Somit ist die Differenzierung zur Endothelzelle nicht auf eine einzige Stammzellpopulation beschränkt.

Neben Unterschieden in der Expression von Oberflächenmarker lassen sich die unterschiedlichen EPC-Populationen auch an Hand von morphologischen und funktionellen Kriterien klassifizieren. In der Literatur wurden „spindelförmige“ Progenitorzellen mit einer niedrigen Proliferationsrate und „kopfsteinpflasterartige“ Zellen mit ei-



## Einleitung

nem großen Proliferationspotential beschrieben (Lin et al., 2000, Hur et al., 2004). Im Vergleich zum murenden Endothel unterscheiden sich endotheliale Progenitorzellen auch durch ein spezifisches Expressionmuster, welches sie innert gegen eine Reihe von Stressfaktoren macht. Diese aktivierten Gene werden auch als Stammzellgene „stemness genes“ bezeichnet (Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002). Im Gegensatz zur aerob versorgten Herzmuskulatur kommt es in der Ischämiephase des Herzinfarkts zur Bildung eines anaeroben Milieus, der Freisetzung von proteolytischen Enzymen und toxischen Substanzen von absterbenden Kardiomyozyten. Im weiteren Prozess führt das Einwandern von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen zur Freisetzung von Sauerstoffradikalen und weiteren digestiven Enzymen. Dies verdeutlicht, dass EPC resistent gegenüber proteolytischen Enzymen und oxidativen Stress sein müssen um ihr proangiogenetisches Potential im Ischämiegebiet entfalten zu können. Dernbach und Urbich konnten 2004 nachweisen, dass EPC auf einem hohen Niveau antioxidative Enzyme wie Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), Katalasen und Glutathionperoxidasen exprimieren. Eine kombinierte Hemmung von den drei Enzymen führte zu einer Erhöhung der Reaktiven Sauerstoffspezies (Dernbach et al., 2004). Weiterhin besitzen EPC eine geringe Apoptosesensitivität im Vergleich zu murenden Endothelzellen (Urbich et al., 2005; Yao et al., 2006).

### **1.8 Übersicht der tierexperimentellen Stammzelltherapie-Studien**

In unterschiedlichen Untersuchungen konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass endotheliale Progenitorzellen (EPC) sowohl an der physiologischen als auch pathologischen Gefäßneubildung beteiligt sind. Die Bedeutung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) an der Regeneration des Gefäßendothels in verschiedenen Organsystemen konnte zuerst von der Arbeitsgruppe Asahara gezeigt werden. Nach Transplantation von Knochenmarkszellen transgener Mäuse konnten EPC im peripheren Blut, im Knochenmark, in der Milz sowie im Gefäßnetz bzw. im Stroma von Lunge, Darm, Leber, Skelettmuskulatur, Ovar und Uterus der Empfängermäuse nachgewiesen werden (Asahara et al., 1997, Asahara et al., 1999).

In Matrigelexperimenten konnte in vitro und in vivo eine positive Beeinflussung der Neovaskularisation durch EPC nachgewiesen werden (Gulati et al., 2003).

## Einleitung

Das regenerative Potential einer Stammzelltherapie von EPC im Rahmen von ischämischen Erkrankungen wie zum Beispiel Myokardinfarkt oder periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) konnte in verschiedenen tierexperimentellen Modellen belegt werden. Im Hinterlaufischämiemodell der Maus oder Ratte wurde eine einseitige Ischämie eines Hinterlaufs herbeigeführt und anschließend eine Stammzelltherapie mit EPC oder anderen adulten Progenitorzellen wie Knochenmarksstammzellen (BMC) durchgeführt. Hierbei konnten verschiedene Arbeitsgruppen unabhängig voneinander zeigen, dass durch die Transplantation von EPC im Vergleich zu Kontrolltieren (Transplantation ausdifferenzierter humaner mikrovaskulärer Endothelzellen bzw. NaCl-Lösung) die Rate an Nekrosen des Hinterlaufs und Autoamputationen verhindert werden konnte (Takahashi et al., 1999, Kalka et al., 2000, Urbich et al., 2003). Weiterhin zeigte sich, dass eine Zelltherapie mit EPC zu einer signifikanten Erhöhung der Kapillardichte und des Blutflusses führt. Anzumerken ist, dass transplantierte EPC nahezu ausschließlich in der ischämischen Region des Hinterlaufs nachweisbar waren (Kalka et al., 2000; Urbich et al., 2003; Hur et al., 2004).

In Herzinfarktmodellen der Ratte und der Maus zeigte sich nach der Transplantation von EPC eine erhöhte Kapillardichte und ein vermindertes Remodeling (bindegewebiger Umbau des Herzens) im Infarktareal sowie eine deutlich bessere linksventrikuläre Herzfunktion im Vergleich zu Kontrolltieren (Kocher et al., 2001, Kawamoto et al., 2003). Diese erfolgsversprechenden Ergebnisse führten zur Initiierung klinischer Studien, die den Einsatz endothelialer Progenitorzellen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt prüfen und im Kapitel 1.7 beschrieben werden. Neben der Gefäßneubildung sind EPC auch an der Wiederherstellung einer intakten Endothelschicht beteiligt, der so genannten Reendothelialisierung (Walter et al., 2002; Werner et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass EPC als vaskulogenetische Komponente an der physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung (Vaskulogenese) im Rahmen der Wundheilung (Asahara et al., 1999), bei ischämischen Prozessen (Asahara et al., 1999; Kalka et al., 2000; Kocher et al., 2001; Urbich et al., 2003) der Endothelialisierung von Gefäßprothesen (Peichev et al., 2000) oder geschädigten Gefäßarealen (Werner et al., 2003) und beim Tumorwachstum (Asahara et al., 1999) beteiligt sind. Darüber hinaus konnte in Tierversuchen nachgewiesen werden, dass EPC an der zerebralen (Zhang et al., 2002), retinalen (Grant et al., 2002) und lymphoiden Gefäßneubildung (Salven et al., 2003) Anteil haben.

Tabelle 1.2 gibt die wichtigsten tierexperimentellen Versuche wieder.

## Einleitung

GULATI et al. <i>Circ. Res.</i> 2003	Matrigel-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neovaskularisation ↑</li> <li>• Anzahl der Kapillare ↑</li> </ul>
TAKAHASHI et al. <i>Nat. Med.</i> 1999	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
KALKA et al. <i>PNAS USA.</i> 2000	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
MUROHARA et al. <i>J Clin Invest.</i> 2000	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
IWAGURO et al. <i>Circulation</i> 2002	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Autoamputation ↓</li> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
HEESCHEN et al. <i>Blood</i> 2003	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
URBICH et al. <i>Circulation</i> 2003	Hinterlaufischämie-Modell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Blutfluss ↑</li> </ul>
KOCHER et al. <i>Nat. Med.</i> 2001	Herzinfarktmodell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herzfunktion ↑</li> <li>• Remodeling ↓</li> <li>• Apoptoserate ↓</li> </ul>
KAWAMOTO et al. <i>Circulation</i> 2001	Herzinfarktmodell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herzfunktion ↑</li> <li>• Remodeling ↓</li> <li>• Infarktgröße ↓</li> </ul>
ORLIC et al. <i>Nature</i> 2001	Herzinfarktmodell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herzfunktion ↑</li> <li>• Infarktgröße ↓</li> </ul>
ORLIC et al. <i>PNAS USA.</i> 2001	Herzinfarktmodell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herzfunktion ↑</li> <li>• Kapillardicht ↑</li> <li>• Remodeling ↓</li> </ul>
KAWAMOTO et al. <i>Circulation</i> 2003	Herzinfarktmodell	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herzfunktion ↑</li> <li>• Remodeling ↓</li> <li>• Infarktgröße ↓</li> </ul>

**Tabelle 1.2:** Übersicht der wichtigsten tierexperimentellen Stammzellstudien.

### **1.9 Übersicht der klinischen Stammzelltherapie-Studien**

Die Stammzelltherapie steht heutzutage nicht mehr allein im Focus der Grundlagenforschung. Seit dem ersten klinischen Fallbericht im Jahre 2001 hat sie sich rasant weiterentwickelt. In einer ersten Fallstudie konnten Strauer et al. mononukleäre Knochenmarkszellen über einen Ballonkatheter in ein infarziertes wiedereröffnetes Infarktareal injizieren (Strauer et al., 2001). Hierfür wurde am Tag des Infarktes das Knochenmark punktiert, Knochenmarkszellen isoliert und für sechs Tage extrakorporal kultiviert und dem Patienten im Anschluss injiziert. Vorher sowie 10 Wochen danach wurden die Auswirkungen der Stammzelltransplantation auf Ventrikelfunktion, Infarktgröße, Ventrikelgeometrie und Myokardperfusion unter Ruhe- und Belastungsbedingungen untersucht. Es zeigte sich eine Verbesserung der Auswurfraction, Herzindex und Schlagindex und einer Reduktion der Infarktgröße (Strauer et al., 2002). Im Jahre 2002 wurde unter Strauer eine größere Studie mit 20 Patienten veröffentlicht. Neben einer Standardtherapie mit Medikamenten, Reperfusion mittels Ballondilatation und Stentimplantation erhielten 10 Patienten autologe, mononukleäre Knochenmarkszellen. Nach drei Monaten zeigten sich eine Verringerung der Infarktgröße und eine signifikante Zunahme der Kontraktilität (Strauer et al., 2002). Ein weiterer Schritt stellte die TOPCARE-AMI-Pilotstudie dar: Hier wurden 31 Patienten Guideline-gemäß therapiert. Neun Patienten erhielten autologe BMC (Bone marrow cells), weitere 11 Patienten aus dem Blut gewonnene CPC (Circular progenitor cells). Als Kontrollarm dienten 11 Patienten, die keine Zelltherapie erhalten hatten. Nach vier Monaten zeigte sich eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraction („Left ventricular ejection fraction“ = LVEF) als auch ein Anstieg des WMSI („Wall motion score index“) bei beiden Gruppen mit Zelltherapie. In der standardbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich in dem Untersuchungszeitraum keine Verbesserung der Herzfunktion. Diese Pilotstudie zeigte eindrücklich eine Verbesserung nach Stammzelltherapie insbesondere in den angrenzenden Regionen des Infarktgebietes (Assmus et al., 2002). In der BOOST-Studie wurden von der Drexler-Gruppe in Hannover 60 Patienten untersucht. 30 Patienten erhielten lediglich eine Standardtherapie, 30 Patienten wurden zusätzlich mittels BMC therapiert. Die Zellapplikation erfolgte mittels Niedrig-Ballon-Katheter. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der LVEF in the Zelltherapiegruppe. Hauptverantwortlich für die Verbesserung der globalen Herzfunktion war auch hier eine Erholung der Randgebiete

## Einleitung

des Infarktes (Wollert et al., 2004). 2004 wurde die TOPCARE-AMI-Studie erweitert: 59 Patienten mit akutem transmuralem Myokardinfarkt wurden gemäß der Guidelines therapiert und mechanisch rekanalisiert. 29 Patienten erhielten eine intracoronare BMC-Therapie, die restlichen 30 Patienten eine coronare Zelltherapie von Stammzellen aus dem peripheren Blut (circulating progenitor cells, CPC) 3-7 Tage nach primärer Intervention. Eine Angiographie nach vier Monaten konnte die Ergebnisse der Pilotstudie bestätigen: Es zeigte sich in beiden zellbehandelten Gruppen ein signifikanter Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Pfeffer et al., 1990) und eine gleichzeitige signifikante Verringerung des linksventrikulären endsystolischen Volumens. Die Kontrast-MRT-Untersuchung belegte weiterhin eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zwischen dem 4. und 12. Monat nach Zelltherapie. Daneben zeigten sich eine Reduktion der Infarktgröße und eine ausbleibende linksventrikuläre Hypertrophie. Dies lässt eine funktionelle Regeneration des infarzierten Ventrikels vermuten (Schächinger et al., 2004). In der Studie von Janssens et al. wurden 67 Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingeschlossen. Nach Eröffnung des verschlossenen Gefäßes mittels PTCA wurden 33 Patienten eine Stammzelltherapie mit Knochenmarkzellen 24 Stunden nach Intervention intracoronar verabreicht. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Herzinfarktgröße jedoch keine Verbesserung des linksventrikulären Funktion (Janssens et al., 2006). Die fehlende Funktionsverbesserung könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Zellen in einem zu frühen Intervall nach Myokardinfarkt appliziert wurden. Ein zu den bisherigen Studien konträres Ergebnis erbrachte die ASTAMI-Studie 2006. 47 Patienten erhielten neben der Standardtherapie nach Myokardinfarkt BMC intracoronar appliziert. Die Kontrollgruppe aus 50 Patienten bekam keine Stammzelltherapie. Sechs Monate nach Infarkt konnte die Gruppe keine Verbesserung der Herzfunktion oder eine Reduktion der Infarktgröße finden (Lunde et al., 2006). Ursächlich für das Therapieversagen der Stammzelltherapie der ASTAMI-Studie könnte in einer unterschiedlichen Zellpräparation und Lagerung der BMC vor Injektion im Vergleich zur REPAIR-AMI-Studie liegen (Seeger et al., 2007). Die REPAIR-AMI-Studie stellt die bislang größte Multizenterstudie im Rahmen der intrakoronaren Stammzelltherapie bei akutem Myokardinfarkt dar. Eingeschlossen wurden 204 Patienten. Davon erhielten 101 Patienten 3-7 Tagen nach Herzinfarkt neben einer Standardtherapie eine intrakoronare Stammzelltherapie aus BMC. Es konnte gezeigt werden, dass sich die linksventrikuläre Herzleistung signifikant nach vier Monaten und einem Jahr verbes-

## Einleitung

sert hatte. Auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines erneuten Herzinfarktes, Todes oder erneuter Katheterintervention in der Zelltherapiegruppe war deutlich reduziert.

Strauer et al. <i>Circulation</i> 2002	BMC = 10 Kontrolle = 10	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Regionale Kontraktilität ↑</li> <li>• Endsystolisches Volumen ↓</li> <li>• Perfusion ↑</li> </ul>
TOPCARE-AMI-Studie <i>Circulation</i> 2002 <i>J Am Coll Cardiol</i> 2004	BMC = 29 Kontrolle = 11 CPC = 30	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Globale Kontraktilität ↑</li> <li>• Endsystolisches Volumen ↓</li> <li>• Flussreserve ↑</li> </ul>
BOOST-Studie <i>Lancet</i> 2004	BMC = 30 Kontrolle = 30	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Globale Kontraktilität ↑</li> </ul>
Fernandez-Aviles et al. <i>Circulation Research</i> 2004	BMC = 20 Kontrolle = 13	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Globale Kontraktilität ↑</li> <li>• Endsystolisches Volumen ↓</li> </ul>
ASTAMI-Studie <i>Scand Cardiovasc J.</i> 2005	BMC = 47 Kontrolle = 50	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No difference in global contractility or infarct size</li> </ul>
Janssens et. al. <i>Lancet</i> 2006	BMC = 33 Kontrolle = 34	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Änderung der globalen Kontraktilität</li> <li>• Infarktgröße ↓</li> </ul>
REPAIR-AMI-Studie <i>New England Journal of Medicine</i> 2006	BMC = 101 Kontrolle = 103	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Globale Kontraktilität ↑</li> <li>• Endsystolisches Volumen ↓</li> <li>• Flussreserve ↑</li> </ul>

**Tabelle 1.3:** Übersicht der wichtigsten klinischen Stammzellstudien nach Myokardinfarkt.

### **1.10 Wirkungsweise und Mechanismen von Endothelialen Progenitorzellen**

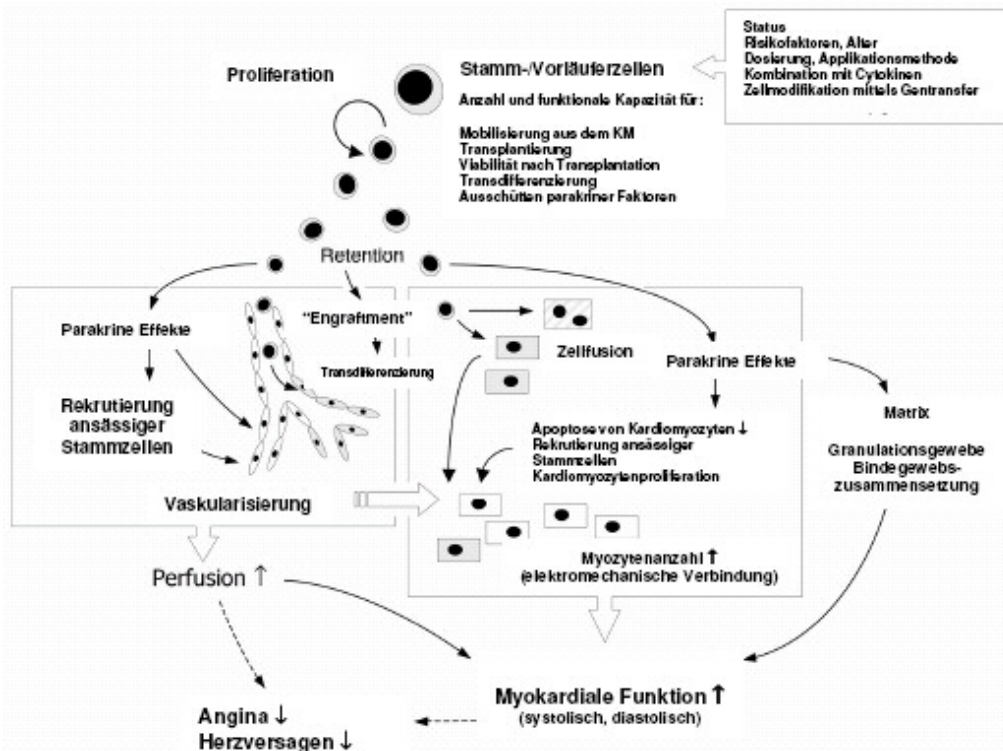
Sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien (siehe vorige Kapitel) konnte gezeigt werden, dass EPC ein großes therapeutisches Potential besitzen. Jedoch ist der genaue biologische Mechanismus bis heute Gegenstand intensiver Forschung. In der letzten Zeit haben sich zwei große Wirkungsansätze der EPC im Rahmen der Neovaskularisation herauskristallisiert: Zum einen scheinen EPC die Fähigkeit zu besitzen, aktiv in ein Ischämiegebiet einzuwandern zu können und dort zu muren Endothelzellen zu differenzieren, zum anderen scheinen sie durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen die Vaskularisierung zu fördern, ortsständige Stammzellen zu rekrutieren und die Apoptose von Myozyten zu verhindern.

Die Migration von EPC im Rahmen der Vaskulogenese aus dem Knochenmark in das Ischämiegebiet wird auch als „homing“ bezeichnet. Dieser Vorgang vollzieht sich in verschiedenen Stufen: Zuerst erfolgt die Mobilisation der Stammzellen aus Ihren Knochenmarksnischen in das Blut (Aicher et al., 2005), der Transport mit dem Blut zum Ort der Geweberegeneration, der Adhäsion an das Endothel (Walter et al., 2002), die Transmigration durch das Epithel, die Invasion und Migration durch die extrazelluläre Matrix mit Hilfe von Integrinen und Proteasen wie Cathepsin L und die abschließende Differenzierung (Urbich et al., 2005). Im Verlauf der Differenzierung exprimieren die Zellen erhöhte Spiegel typischer Marker der endothelialen Differenzierung wie „vascular endothelium-cadherin“ (VE-Cadherin), PECAM-1 (CD31), von Willebrand Faktor (vWF), endotheliale NO-Synthase (eNOS) und E-Selectin (Asahara et al., 1999; Griese et al., 2003; Masuda et al., 2003). Das Differenzierungspotential von EPC ist jedoch nicht auf die endotheliale Linie beschränkt. Badorff et al. konnten 2003 zeigen, dass eine Co-Kultivierung von humanen EPC mit RattenKardiomyozyten zu einer Differenzierung funktionell aktiver Kardiomyozyten führt (Badorff et al., 2003).

Neben der Fähigkeit der Differenzierung können EPC über eine parakrine Sekretion von Cytokinen und Wachstumsfaktoren die Neovaskularisation im betroffenen Gebiet beeinflussen. Eine Reihe von Wachstumshormonen wie der „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), „Stromal cell-derived factor-1“ (SDF-1), Insulin-like growth

# Einleitung

factor-1 (IGF-1) und „Hepatocyte growth factor (HGF) konnten in „in vitro“-Versuchen identifiziert werden (Urbich et al., 2005).



**Abbildung 1.5:** Zusammenfassung möglicher Mechanismen der Stammzelltherapie nach (Wollert et al., 2005).

## 1.11 Überexpression von Genen in EPC mittels viraler Vektoren

Im Rahmen der Doktorarbeit war es notwendig, lentivirale Überexpressionstechniken zu etablieren. Daher soll in diesem Kapitel mögliche virale Expressionssysteme in eukaryotischen Zellen vorgestellt werden. Virale und nichtvirale Expressionssysteme dienen dazu Fremd-DNA in eukaryote Zellen einzuschleusen und das Expressionsverhalten der Zelle zu verändern. Allen gemeinsam ist der Transfer einer angemessenen Menge eines therapeutischen Gens, eine möglichst geringe Immunogenität und Toxizität des viralen Vektors sowie eine möglichst hohe Biosicherheit des verwendeten Modells. Nicht-virale Transfektionssysteme besitzen eine hohe Biosicher-



## Einleitung

heit (Nishikawa et al., 2001), jedoch verläuft die Transfektion von primären Zellen wie EPC noch sehr ineffizient. Viren hingegen sind biologische Systeme, die ihre Gene effizient in ihre Wirtszellen einschleusen können. Dieses wird bei der Entwicklung von viralen Vektorsystemen genutzt. Der adenovirale Gentransfer zeichnet sich durch einen hohen Titer, guter Transduktionseffizienz bei sich teilenden Zellen und ein großes Wirtsspektrum aus. Der Nachteil liegt in der hohen Immunogenität und der transienten Expression des eingeschleusten Gens, da das Adenovirus episomal in der Zelle vorliegt (Ritter et al. 2002). Weniger immunogen sind Adeno-assoziierte Viren (AAV), die jedoch nur eine begrenzte Verpackungskapazität besitzen.

Virale Vektoren	Expression	Virusart	Verpackungskapazität	Infektion von ruhenden Zellen	Titer	Immunogenität
<b>Adenoviren</b>	Transient	DNA	< 8 kb	gering	hoch	Hoch
<b>Adeno-assoziierte Viren (AAV)</b>	Stabil	DNA	4 – 5 kb	gering	hoch	Gering
<b>Herpes simplex Virus</b>	Transient	DNA	< 50 kb	gering	hoch	Hoch
<b>Epstein-Barr-Virus</b>	Stabil extrachromosomal	DNA	< 150 kb	gering	gering	Gering
<b>Retroviren</b>	Stabil	RNA	< 10 kb	gering	gering	Gering
<b>Lentiviren</b>	Stabil	RNA	< 10 kb	hoch	gering	Gering

**Tabelle 1.4:** Virale Expressionssysteme

Das Genom von Retroviren besteht aus RNA. Der Vorteil der Retroviren besteht in der stabilen Integration in das Wirtsgenom. Jedoch ist ein transkriptionelles „Silencing“ der eingeschleusten Zielgene in Retroviren beschrieben worden, welches zu einer Verkürzung der Transgenexpression führte (Pannell et al., 2001). Der Virustiter von Retroviren weist häufig nur einen geringen Titer auf, so dass die Transduktionseffizienz mittels Ultrazentrifugation oder Beschichtung der Kulturgefäße und an-

## Einleitung

schließende Zentrifugation nach Aufbringen der Wirtszellen gesteigert werden muss. Ein weiterer Nachteil ist auch die geringe Transduktionseffizienz in sich nicht teilenden Zellen wie EPC.

Der große Vorteil von Lentiviren liegt in der stabilen Integration der Zielgene in das Genom von ruhenden und sich nicht teilenden Zellen (Naldini, 1998). Die Integration erfolgt über die LTR-Integrationssequenzen (Naviaux et al., 1992). Der große Nachteil von Retroviren und Lentiviren liegt in der Entstehung von Onkogenen während der Integration in das Genom der Wirtszelle (Hu et al., 2000).

Da sich EPC auf Grund ihrer geringen Teilungsrate und einer hohen Proteasomenaktivität nur schlecht transfizieren lassen, stellen virale Vektoren ein intelligentes System dar, um das Genom der Progenitorzellen zu verändern (Iwaguro et al., 2002; Kong et al., 2004; Santoni et al., 2006). In der Literatur sind Transduktion von EPC mit Adenoviren (Iwaguro et al., 2002), Herpes simplex Viren (Gomez-Navarro et al., 2000), Retroviren (Griese et al., 2003; Kong et al., 2004) und Lentiviren (Herder et al., 2003; De Palma et al., 2003) beschrieben worden.

### 1.12 Fragestellung

Trotz einer verbesserten medikamentösen Therapie und der Möglichkeit einer mechanischen Reperfusion ist die Selbstregeneration des Herzens nicht erreicht worden. In diesem Zusammenhang stellt die Therapie mit adulten Stammzellen eine faszinierende Therapieoption dar. Erste Studien, klinisch wie experimentell, zeigen den Nutzen der Stammzelltherapie. Nichts desto trotz ist der genaue Mechanismus der Regeneration mittels Stammzelltherapie unklar. Ziel dieser Arbeit ist das Verständnis der Vorläuferzellbiologie im Rahmen der Zelltherapie weiter zu ergründen. Insbesondere soll erforscht werden, ob der Effekt der Stammzelltherapie hauptsächlich auf einen kurzzeitigen parakrinen Effekt beruht oder ob langfristige Mechanismen wie Differenzierung oder Zellfusion eine wichtige Rolle spielen. Zu diesem Zweck sollen die Stammzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgetötet werden. Diese spezifische Abtötung soll mit Hilfe eines Suizidgens, der viralen Thymidinkinase, erforscht werden. Weiterhin sollen unterschiedliche Applikationswege im Rahmen der Stammzelltherapie erforscht werden. Darüber hinaus soll versucht werden, die Effizienz der Zelltherapie durch den Einsatz eines eNOS-Enhancer zu erhöhen.

Zusammenfassend werden in dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Etablierung eines lentiviralem Vektorsystems zum Gentransfer in Stammzellen. Erstes Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Klonierung eines lentiviralen Vektorsystems zur Integration des Selbstmordgens der viralen Thymidinkinase und des Fluoreszenz-Proteins GFP in das Genom von Stammzellen. Daneben soll die Beeinflussung der Transkription von EPC durch Transduktion abgeschätzt werden.
2. Untersuchung der physiologischen Inkorporation von Stammzellen in vivo zu unterschiedlichen Zeiträumen im Matrigelmodell und Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus. Das Neovaskularisationspotential von Stammzellen soll zu unterschiedlichen Zeiten ermittelt werden. Hierfür sollen TK-transduziert EPC zu unterschiedlichen Zeitpunkten in vivo abgetötet werden und die Neovaskularisation ermittelt werden.
3. Analyse der kardialen Funktion nach Ischämie und Knochenmarkzelltherapie im Herzinfarktmodell der Nacktmaus. Nach Stammzellapplikation soll ein möglicher pro-

## Einleitung

tektiver bzw. regenerativer Effekt der Zellen auf die kardiale Funktion mittels Echokardiographie und MRT untersucht und histomorphologische Analysen erhoben werden. Durch gezieltes Abtöten von TK-transduzierten Zellen zu unterschiedlichen Zeiträumen soll ihr Verhalten im Gesamtorganismus untersucht werden.

4. Analyse des Neovaskularisationspotentials und der kardialen Funktion nach Vorbehandlung der Stammzellen mit zwei „eNOS-enhancer“ (eNOS-Transkriptionsaktivatoren) im Rahmen der Zelltherapie. Die eNOS ist eines der bedeutsamsten Enzyme in der Biologie des Endothels. Darüber hinaus scheint es auch eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Stammzelltherapie zu spielen. Da die eNOS gerade in Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Diabetes reduziert ist, soll die Funktion von adulten Patientenzellen durch eine Vorbehandlung mit zwei „eNOS-enhancer“ im Rahmen der Stammzelltherapie verbessert werden. Die Untersuchung soll in Vivo- und in Vitro-Versuchen erfolgen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Organismen

Für die in vivo-Experimente Matrigelversuche, Hinterlaufischämie und anteriorer Myokardinfarkt wurden jeweils athymische Nacktmäuse NMRI-nu:nu verwendet. Nahrung und Wasser stand den Tieren ad libidum zur Verfügung. Auf eine adäquate Schmerztherapie nach Operation wurde geachtet. Alle Tierversuche wurden vom Veterinärdezernat des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigt.

### 2.2 Verwendete Zellen

Zelltyp	Anmerkung
HUVEC	Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (Fa. Cambrex)
HEK293	Humane embryonale, mit dem Adenovirus 5 transformierte, Nierenzellen
EPC	Endotheliale Progenitorzellen aus humanem Peripherblut
MNC	Mononukleäre Zellen aus humanem Peripherblut
BMC	Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark

Tabelle 2.1: Verwendete Zellen

### 2.3 Zellkulturmedien

Zelltyp	Medium	Zusätze
HUVEC	Endothelial cell basal medium (EBM), Fa. Cambrex	10% fötales Kälberserum (FCS), Fa. Böhringer Mannheim, hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamycin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 mg/ml). Alle Fa. Cambrex
HEK293	DMEM 4500 Glucose with Glutamax, Fa. Gibco	10% hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin/Streptomycin (500 U/ml), Fa. Gibco
EPC	Endothelial cell basal medium (EBM), Fa.	20% fötales Kälberserum (FCS), Fa. Böhringer Man-

## Material und Methoden

	Cambrex	nheim, hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamycin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 mg/ml).Alle Fa. Cambrex
MNC	Endothelial cell basal medium (EBM), Fa. Cambrex	20% fötales Kälberserum (FCS), Fa. Böhringer Mannheim, hEGF (10 µg/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Bovine brain extract (3 µg/ml), Gentamycin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 mg/ml).Alle Fa. Cambrex
BMC	X-VIVO, Fa. Cambrex	

**Tabelle 2.2:** Nährmedien

### 2.4 Kultivierung von Endothelzellen

Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden in EBM-Medium in T-75 Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, und 95% Luftfeuchtigkeit bis zur 3. Passage kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte nach Waschung der Zellen mit 6 ml Phosphatpuffer (PBS; GibcoBRL, Karlsruhe) und gefolger Trypsinierung der Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA (Böhringer Mannheim) bis zur Abkuglung der Zellen. Nach Absaugung des Trypsins wurden die Zellen mit 10 ml Medium von Flaschenboden gespült und zur Zellerhaltung in 250 ml Zellkulturflaschen ausgebracht und für 18 h kultiviert. Zur Durchführung von Versuchen wurden die Zellen in 6-Well-Platten (Greiner) ausgebracht und für 18 Stunden kultiviert. Die eingesetzte Zellzahl pro Well betrug  $2 \times 10^5$  Zellen.

### 2.5 Kultivierung von humanen embryonalen Nierenepithelzellen (HEK 293T)

Zur Kultivierung von HEK293 verwendeten wir DMEM 4500 inkl. Zusätze in T 75-Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit. Das verwendete FCS wurde vor Gebrauch bei 56°C für 35 min hitzeinaktiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgte nach Waschung der Zellen mit 6 ml Phosphatpuffer (PBS; GibcoBRL, Karlsruhe) und gefolger Trypsinierung der Zellen mit 3 ml

## Material und Methoden

Trypsin/EDTA (Böhringer Mannheim) bis zur Abkugelung der Zellen. Nach Absaugung des Trypsins wurden die Zellen mit 10 ml Medium vom Flaschenboden gespült und zur Zellerhaltung in 250 ml Zellkulturflaschen ausgebracht. Im Rahmen der Virusproduktion wurden  $4 \times 10^5$  Zellen 24 Stunden vor Transfektion in 10 cm-Zellkulturschalen ausgebracht.

### **2.6 Isolierung von Mononukleären Zellen und Kultivierung von EPC**

Die Isolierung von mononukleären Zellen (MNC) aus dem peripheren Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation nach Vasa et al. (Vasa et al. 2001). Hierfür wurden 15 ml Ficoll (Biochrom AG) mit 25 ml, zuvor 1:1 mit PBS verdünnten Blut überschichtet und mit 800 g für 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befinden sich die mononukleären Zellen (MNC) in einer Interphase zwischen den Schichten. In der Zwischenzeit wurden je nach weiterem Versuchsdesign 6-well Platten, 24-well Platten oder T-75 Zellkulturflaschen (alle Greiner) mit Fibronectin (10 ng/ml PBS, Fa. Sigma) für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Ausbringen der Zellen wurde das Fibronectin sorgfältig abgesaugt. Die in der Interphase enthaltenen Zellen wurden vorsichtig mit einer 5 ml Pipette (Greiner) entnommen und in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Im Anschluss erfolgte die Zentrifugation für 10 min bei 800 g und Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 50 ml PBS (GibcoBRL, Karlsruhe) aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und in EPC-Medium aufgenommen. Eine Konzentration von  $8 \times 10^6$  Zellen pro ml EPC-Medium wurde eingestellt. Pro Well 6-well Platte wurden  $20 \times 10^6$ , pro Well 24-well Platte wurden  $8 \times 10^6$  und pro T-75 Zellkulturflasche wurden  $80 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte für drei Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit ohne weiteren Mediumwechsel. An Tag 0 und 1 nach Isolation erfolgte für MNC die Transduktion, für EPC erfolgte sie nach Transdifferenzierung an Tag 3 und 4 nach Isolation.

## 2.7 Klonierte Konstrukte

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zwei lentivirale Vektoren kloniert, die die virale Thymidinkinase als Zielgen enthalten. Die Ausgangsvektoren wurden uns von der AG Grez, Georg Speyer Haus, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um die Verpackungsplasmide 8.91 und PMD2. Als Vektoren der Zielgene dienten die Plasmide SEW und SIEW. Der SEW enthält einen „Spleen focus forming virus Promoter“ (SFFV-Promoter) gefolgt von dem Zielgen eGFP, beim SIEW handelt es sich um einen bicistronischen Vektor mit einem SFFV-Promoter gefolgt von einer Insertionsstelle für ein Zielgen über eine SAC II Schnittstelle. Daran schließt sich eine IRES-Sequenz an und das zweite Zielgen eGFP. Als DNA-Donor der viralen Thymidinkinase des Herpes simplex Virus Typ I diente das Plasmid pDC316srTK, eine Gabe von Frau Dr. Anton, LMU München. Mittels PCR-Amplifikation wurde ein TK-PCR-Produkt mit den passenden Schnittstellen generiert. Über TOPO-Zwischenvektoren wurde die TK in den SEW an Stelle des eGFP-Genes über die Schnittstellen BamH I und SBF I inseriert, im Falle des SIEW in die SAC II Schnittstelle eingebaut. Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht der klonierten Konstrukte, Tabelle 2.4 die Sequenz der verwendeten Primer.

Konstrukt	Insert	Zievektor	Schnittstelle 5´-3´
SETKW8	Virale Thymidinkinase Typ I	SEW	BamHI /SBF I
SITKW7	Virale Thymidinkinase Typ I	SIEW	SACII / SACII

**Tabelle 2.3:** Klonierte Plasmidkonstrukte

Konstrukte	sense Primer (5´ - 3´)	antisense Primer (3´ - 5´)
SETKW8	<u>GGATCC</u> GAACGCAGATCGAAT TCGTATGGC	<u>CCTGCAGGG</u> CAATAACAAGTT GCTCGAAGTCG
SITKW7	<u>CCGCGGC</u> ACCGTAGAACGCAG ATCGAATTC	<u>CCGCGGG</u> GCTGCAATAACAAG TTGCTCGAAG

**Tabelle 2.4:** Oligonukleotid-Primer zur Klonierung; Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.



### **2.8 Transfektion von Plasmiden**

Im Rahmen der Testung des „TK-München-Plasmid“ wurde HUVEC transfiziert. Hierfür wurden 3 µg Plasmid mit 20 µl Superfect (Invitrogen) und 150 µl serumfreies EM-Medium für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In Anschluss wurde 1,2 ml EBM-Vollmedium mit dem Ansatz gemischt, auf die Zellen gegeben und diese für 3 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit 3 ml EBM-Vollmedium und die Zellen wurden für weitere 18-24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Medium abermals gewechselt unter Zugabe von Gancyclovir zum Medium. Nach 24 Stunden erneuter Mediumwechsel mit Gancyclovirgabe. Zur Auswertung des Experimentes wurde die Zellzahl pro Bildausschnitt bestimmt bzw. ein MTT-Test angewandt.

### **2.9 MTT-Messung zur Bestimmung der vitalen Zellen**

Die Chemikalie Dimethylthiazol-2-yl-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird in einer Konzentration von 0,5 mg/ml dem Medium zur relativen Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in der Kultur zugesetzt. In der Inkubationszeit von vier Stunden vermögen die lebenden Zellen MTT in einen violetten Farbstoff zu verstoffwechseln. Nach einem PBS-Waschschritt werden die Zellen mittels eines Lysispuffer, bestehend aus 49 ml Isopropanol und 1 ml zwei normaler Salzsäure, aufgeschlossen und die Extinktion der Farblösung photometrisch bei 550 nm Wellenlänge bestimmt.

### **2.10 Plasmidpreparation**

Die Plasmidpräparationen wurden mit kommerziell erwerblichen Kits zur Spin-, Midi- oder Maxipräparation von Plasmid-DNA (Firma Qiagen) durchgeführt. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt.

### **2.11 Isolation von DNA aus Säugetierzellen**

Die DNA Isolation aus Säugetierzellen erfolgte nach Aufschluss der Zellen über QIAshredder-Säulchen und anschließende DNA-Aufreinigung mittels DNeasy-Säulchen (beides Qiagen) nach Herstellerangaben.

### 2.12 Isolation von RNA aus Säugetierzellen

Der Aufschluss der Zellen erfolgte ebenfalls mittels QIAshredder-Säulchen. Im Anschluss daran wurden RNeasy-Säulchen (Qiagen) zur RNA-Aufreinigung nach Herstellerangaben benutzt. Zusätzlich erfolgte ein Verdau mit DNase (Qiagen) um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden.

### 2.13 PCR und RT-PCR

Der Nachweis der Integration der viralen Thymidinkinase nach Transduktion in das Genom der Zellen erfolgte mittels konventioneller PCR. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ebenfalls die Expression der eNOS untersucht. Hierfür wurde die aus den Zellen isolierte mRNA in cDNA unter Nutzung eines M-MLV Reverse Transkriptase Systems (Invitrogen) überführt. Im anschließend erfolgte die semiquantitative Analyse mittels konventioneller PCR (Invitrogen). Als Gleichladungskontrolle wurde die Expression der GAPDH untersucht und die Expression der eNOS als Quotient mit der GAPDH angegeben. Ein Pipettieransatz für eine Probe setzt sich wie folgt zusammen:

- 1 µl cDNA (Maximalkonzentration 250 ng DNA/µl)
- 0,25 µl dNTP (10mM, Invitrogen)
- 3 µl 10 x PCR-Puffer (Platinum Taq Polymerase Reaction Buffer, Invitrogen)
- 1,2 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM)
- 125 ng je Primer
- 0,25 µl Platinum Taq Polymerase (1,4 U; Invitrogen)
- Add 30 µl destilliertes H<sub>2</sub>O

Die gewählte Annealing –Temperatur lag bei 59°C. Die gewählte Zyklenzahl lag je nach Versuch zwischen 18-40 Zyklen. In Tabelle II.5 sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide für die PCR und RT-PCR aufgeführt.

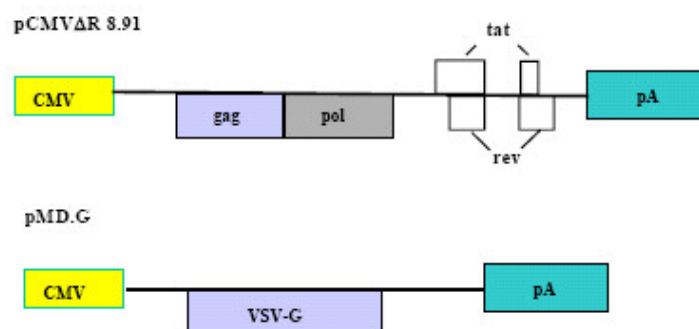
## Material und Methoden

Konstrukte	sense Primer (5' - 3')	antisense Primer (3' - 5')
TK (Integrationsnachweis)	CCGGAGCAGAAAATGCCCA CGC	GGGCCCCAAGCACGATGTTGG T
eNOS	CACATTTGGCAATGGGGATC	TGCACTGTCTGTGTTGCTAGAC TC
GAPDH	TTGGTATCGTGGAAGGACTC A	TGTCATCATATTTGGCAGGTTT

**Tabelle 2.5:** Oligonukleotid-Primer für RT-PCR

### 2.14 Herstellung von Lentiviren

Die Lentiviren wurden in 293T-Zellen gezüchtet, die mittels Kalziumphosphatmethode transfiziert worden waren. Die Kalziumphosphat-basierte Transfektion beruht auf der Möglichkeit von Säugetierzellen DNA-Kalziumphosphat-Prezipitate über Endozytose aufzunehmen. Die Erbinformation des Virus war auf drei Plasmide verteilt: Das Plasmid pCMV ΔR.8.91, im Weiteren kurz 8.91 abgekürzt, beinhaltet die Gene *gag* und *pol*. Die Hüllproteine *env* waren in dem Plasmid pMD2.G, kurz PMD2, kodiert. Abbildung II.1 verdeutlicht den Aufbau der Plasmide (Zufferey et al., 1997). Die Zielgene zur stabilen Integration in das menschliche Genom waren in dem dritten Plasmid SEW oder SIEW untergebracht.



**Abbildung 2.1** Struktur der lentiviralen Helferplasmide. Neben der lentiviralen Kasette beinhalten die Plasmide ein bakterielles Origin, ein SV40 Origin sowie eine Ampicillin-Resistenz-Gen.

## Material und Methoden

24 Stunden vor Transfektion wurden  $4 \times 10^5$  293T-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen (Greiner) ausgebracht. 30 Minuten vor Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 9 ml DEMEM-Medium durchgeführt, dem 1  $\mu$ l Chloroquin (100 mM) zugesetzt war. Das Transduktionsgemisch wurde hergestellt und dem Medium zugesetzt. Der genaue Ansatz für eine 10 cm Zellkulturschale mit 293T-Zellen ist in Tabelle II.4 festgehalten. Danach erfolgte ein Mediumwechsel mit 10 ml DEMEM-Medium.

Nach weiteren 24 Stunden erfolgte der Mediumwechsel mit dem Medium (z.B. EPC-Medium) der zu transduzierenden Zellen. Nach 24 und 48 Stunden konnte das virus-haltige Medium bei  $-80^\circ\text{C}$  weggefroren und gelagert werden.

**Tabelle 2.4:** Transfektionsansatz für eine 10 cm Zellkulturschale

Substanz	Menge/Volumen
CaCl <sub>2</sub> 2,5M	50 $\mu$ l
Plasmid 8.91	6,5 $\mu$ g
Plasmid PMD2	3,5 $\mu$ g
Plasmid mit Zielgen (z.B. SEW mit eGFP)	10 $\mu$ g
HBS Puffer (50mM HEPES pH 7,05; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,12)	500 $\mu$ l
Aqua destilata	500 $\mu$ l

### 2.15 Lentivirale Transduktion von humanen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden EPC, MNC und HUVEC mit lentiviralen Vektoren transduziert. EPC wurden an Tag 3 nach Isolierung, MNC am Tag der Isolierung und HUVEC 24-48 Stunden nach Passagierung transduziert. Vor der eigentlichen Transduktion erfolgte ein Mediumwechsel. Parallel wurde das virushaltige Medium im Wasserbad aufgetaut und auf  $36^\circ\text{C}$  erwärmt. Nach Zugabe des virushaltigem Mediums (virushaltiges Medium im Verhältnis zu Zellmedium: 3:7), wurde ein Inkubationszeit von 6-8 Stunden eingehalten. Daran schloss sich ein erneuter Mediumwechsel an. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Erhöhung der Transduktionsrate erneut transduziert. Die Transduktionseffizienz und Integration in das Genom wurde nach drei Tagen bestimmt, im Rahmen der Tierversuche wurden die EPC 24 Stunden nach zweiter Transduktion i.v. appliziert.

### **2.16 Matrigel-Assay in der Nacktmaus**

Das Matrigelmodell der Maus wird benutzt um die Bildung neuer kleiner Gefäße und gefäßähnlicher Strukturen in vivo zu erforschen. Hierfür wird am Tag 0 200 µl vorgekühltes und damit flüssiges Matrigel s.c. in die Rückenpartie der analogosedierten Mäuse injiziert. Durch die Erwärmung auf Körpertemperatur wird die Matrigelmasse fest. Tieren, die kein Hämatom ausbildeten, wurden einer intravenösen Zelltherapie mit  $1-2 \times 10^6$  EPC unterzogen. Je nach Versuchsansatz und Gruppe erhielten die Tiere an unterschiedlichen Tagen intraperitoneale PBS- oder Gancyclovirinjektionen (100 mg pro kg/Körpergewicht). Am Ende des Experiments wurden die Tiere abhängig vom Versuchsansatz nach einer oder zwei Wochen eingeschläfert und die Matrigele vorsichtig rauspräpariert. Zur Fixierung der Matrigele verwendeten wir 10% Formalinlösung. Nach Entwässerung und Überführung in einen Paraffinblock wurden die Gele geschnitten und immunhistochemisch für die Konfokalmikroskopie z.B. mit einer Lektin- oder „smooth-muscle-actin“-Färbung (SMA-Färbung) aufgearbeitet.

### **2.17 Hinterlaufischämie in der Nacktmaus**

Die Induktion der Hinterlaufischämie erfolgt in den analogosedierten Nacktmäusen durch Ligation des proximalen Anteils der femoralen Arterie und des distalen Teils der Saphena-Arterie sowie sämtlichen arteriellen Verzweigungen zwischen den Ligaturen mit Hilfe eines elektrischen Koagulators. Die darüberliegende Haut wurde im Anschluss mit chirurgischen Klammern verschlossen. 24 Stunden nach Setzung der Ischämie erfolgte die intravenöse Zelltherapie mit  $1-2 \times 10^6$  EPC. Je nach Versuchsansatz und Gruppe erhielten die Tiere an unterschiedlichen Tagen intraperitoneale PBS- oder Gancyclovirinjektionen (100 mg pro kg/Körpergewicht). Abhängig vom Versuchsdesign wurden nach 2 und/oder 3 Wochen der Blutfluss mit einem Laserdoppler-Blutfluss-Image-System (moorLDI-Mark 2, Moor Instruments) ermittelt. Nach Ermittlung des letzten Scannwertes wurden die Tiere getötet und die ischiocrurale Muskulatur auf beiden Seiten entfernt, kryofixiert und der Histologie zugeführt.

### 2.18 Myokardinfarkt in der Nacktmaus

Der Myokardinfarktversuch in der Nacktmaus unterteilt sich in drei Teile:

- Die Induktion des Myokardinfarkts (Myokardinfarkt-OP)
- Die intracavitäre oder intravenöse Zelltherapie
- Terminale Narkose mit Organentnahme

Nach Analogosedierung der Tiere werden die Tiere zunächst oral Intubiert und an das Beatmungsgerät angeschlossen. Es folgte die Desinfektion des Thorax. Nach Hautschnitt und Präparation der Brustmuskulatur wurde der dritte oder vierte Interkostalraum links aufgesucht. Es erfolgte die Thorakotomie mit einer feinen Schere und die Darstellung des Herzens. Daraufhin wurde mit dem Operationsmikroskop der Ramus interventricularis anterior der Arteria coronaria sinistra aufgesucht und ligiert. Bei den Tieren mit intracavitärer Zelltherapie erfolgte nun die Injektion der Zellen in das Lumen des linken Ventrikels. Nach Verschluss des Thorax und Hautnaht, wurde das Tier vorsichtig erwachen gelassen. Zur Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere eine orale Antibiose mit Ampicillin über das Trinkwasser. Die intravenöse Zelltherapie von  $1-2 \times 10^6$  EPC/BMC erfolgte 24 Stunden nach Myokardinfarkt. Je nach Versuchsansatz und Gruppe erhielten die Tiere an unterschiedlichen Tagen intraperitoneale PBS- oder Gancyclovirinjektionen (100 mg Gancyclovir pro kg/Körpergewicht). Die Herzfunktion der Mäuse wurde je nach Versuchsdesign nach zwei, drei oder vier Wochen mittels Echokardiographie und/oder Magnetresonanztomographie ermittelt. Nach der letzten Messung wurden die Tiere in tiefster Narkose ausbluten gelassen und die Organe insbesondere das Herz entnommen, gewogen, histologisch aufgearbeitet und die Infarktgröße bestimmt.

### 2.19 Statistische Verfahren

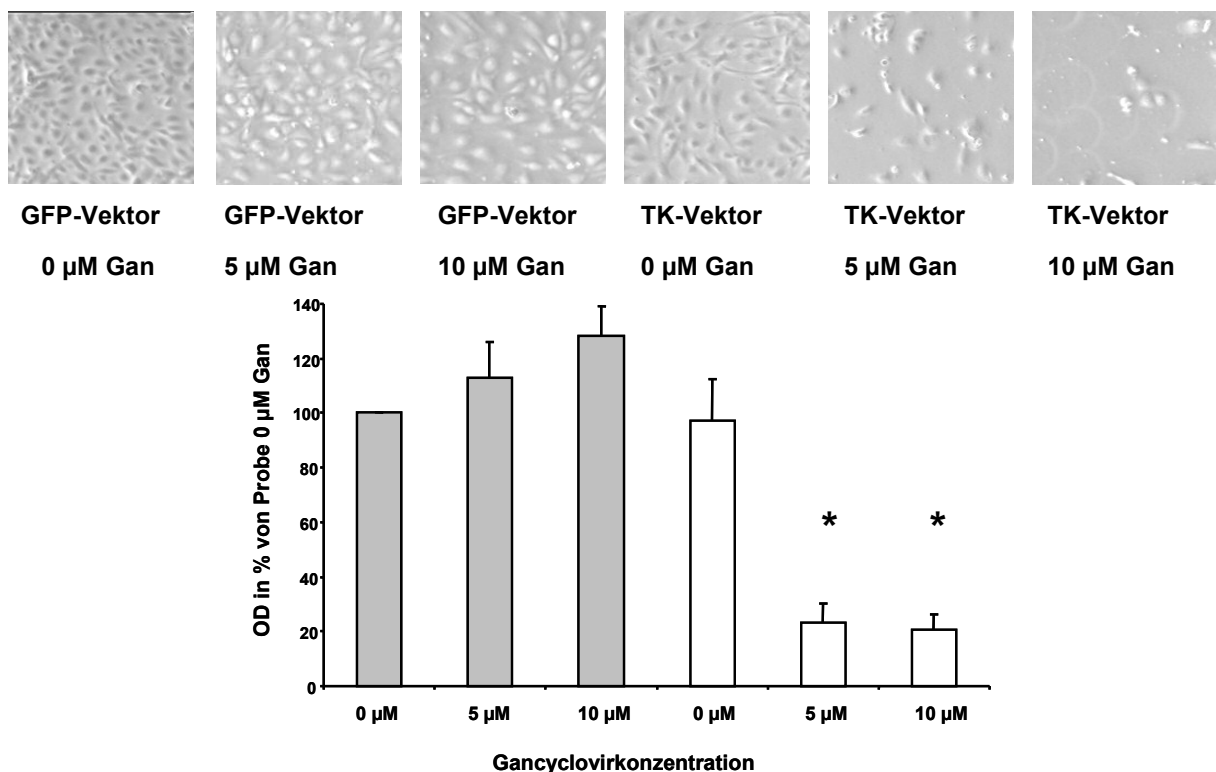
Die statistischen Analysen erfolgten mit dem ungepaarten t-Test mit Hilfe des Statistik-Computerprogramm SPSS für Windows (SPSS Inc, USA) und/oder der Office-Software Exel (Microsoft, USA). Ein P-Wert von kleiner 0,05 (\*) wurde als signifikant bezeichnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Gancyclovirbehandlung von TK-transfizierten HUVEC

##### 3.1.1 Testung der Thymidinkinase in HUVEC

Um Zellen in vitro und in vivo spezifisch abtöten zu können, entschieden wir uns für den Gebrauch der viralen Thymidinkinase (TK) des Herpes simplex Virus Typ I. Zellen, die das Gen der Thymidinkinase exprimieren, vermögen das Medikament Gancyclovir (GV), welches chemisch ein Pronukleotid darstellt, zu aktivieren. Die aktivierte Form des Gancyclovir hemmt irreversibel die Polymerasen der Zelle und führt zu ihrem Absterben. In einem Vorversuch wurden HUVEC mit dem Plasmid pDC316srTK transfiziert und 24 Stunden später für zwei Tage mit Gancyclovir behandelt. Anschließend wurde die Vitabilität der Zellen mit einem MTT-Test ermittelt.



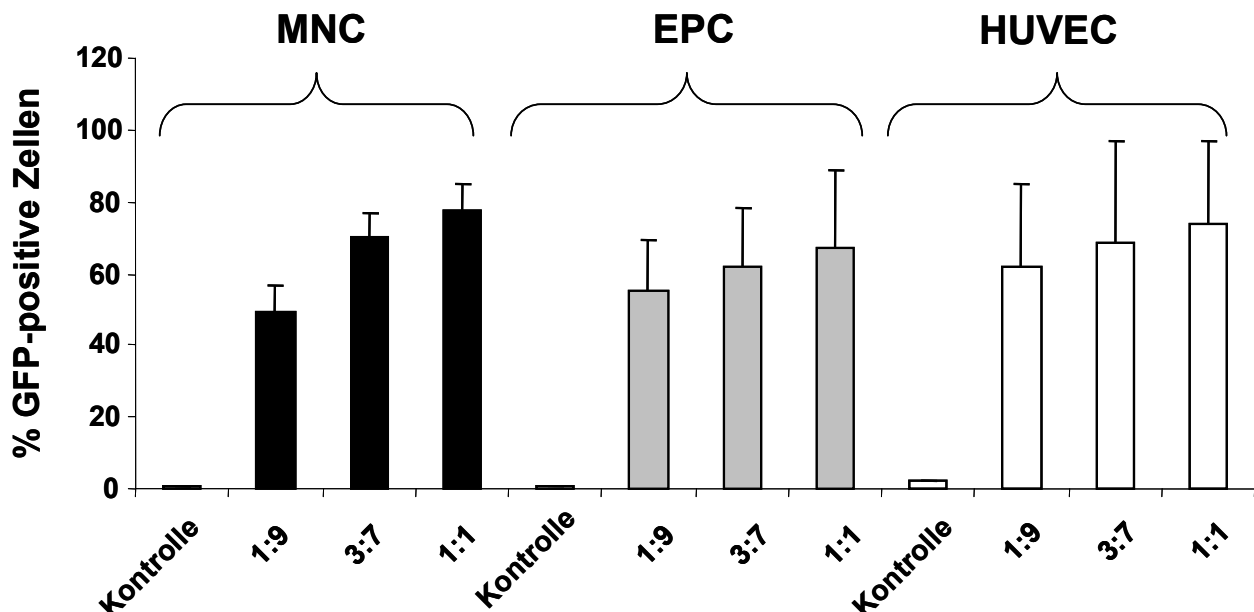
**Abbildung 3.1:** HUVEC transfiziert mit einem Leerplasmid (grau) oder dem TK-Plasmid (weiß). Anschließende Behandlung mit Gancyclovir 0 µM, 5µM oder 10µM für zwei Tage. Mittelwert ± SEM, n=7, \*p<0.05 versus Kontrolle

## Ergebnisse

Wir konnten zeigen, dass nach Transfektion mit dem Plasmid pDC316srTK und anschließender Gancyclovirgabe 80% der HUVEC abgestorben waren.

### *3.1.2. Transduktionseffizienz des Vektors SEW in verschiedenen Zellen*

Zur Testung der Transduktionseffizienz des lentiviralen Vektors SEW wurden HUVEC, MNC und EPC an zwei aufeinander folgenden Tagen mit dem lentiviralen Vektor SEW transduziert. Nach drei Tagen wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse der GFP-Expression ermittelt. Es zeigten sich hohe Transduktionseffizienzen von 70 – 90 % in allen drei Zellpopulationen (Abb. III.2).



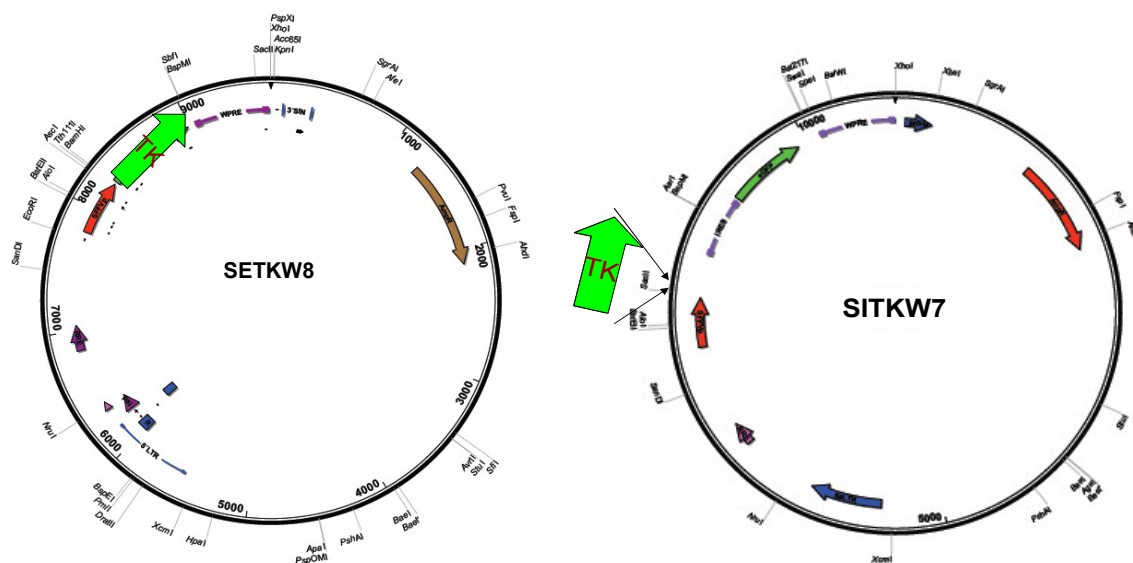
**Abbildung 3.2:** Auftragung der Transduktionseffizienz für verschiedene Verdünnung des Virusüberstandes mit frischem Medium im Verhältnis 1:9, 3:7 oder 1:1 im Vergleich zur Kontrolle, unterteilt in die Zellpopulationen MNC (schwarz), EPC (grau) und HUVEC (weiß). Mittelwert  $\pm$  SEM, n = 4



## Ergebnisse

### 3.1.3 Klonierung der Konstrukte SETKW8 und SITKW7

Da im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass sich Lentiviren für die Transduktion sowohl von HUVEC als auch EPC und MNC sehr gut eignen, klonierten wir in zwei lentivirale Vektorkonstrukte, SEW und SIEW, unser Zielgen TK. SEW und SIEW besitzen den gleichen „Backbone“. Der SIEW-Vektor vermag im Gegensatz zum SEW-Vektor zwei Zielgene zu exprimieren. Hierfür besitzt der SIEW-Vektor eine IRES-Sequenz. Als IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. internal ribosomal entry site) wird in der Zellbiologie eine Sekundärstruktur der messenger-RNA bezeichnet, die ohne weitere so genannte Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Sie ermöglicht zwei Zielgene von einem Promoter abzulesen zu lassen. Hierfür befindet sich nach dem SFFV-Promoter eine SACII-Schnittstelle zur Insertion des ersten Zielgens. Daran schließt sich die IRES-Sequenz an, gefolgt von dem zweiten Zielgen eGFP. Der SEW besitzt lediglich einen SFFV-Promoter mit anschließendem Zielgen eGFP. Mit Hilfe der Endonukleasen BamH I und SBF I wurde das GFP-Gen aus dem Vektor SEW geschnitten und die TK als Zielgen über die BamH I und SBF I Schnittstelle ligiert. Zur Klonierung des Vektors SITKW7 wurde der Ausgangsvektor SIEW mittels Endonuklease SACII linealisiert und dephosphoriert und im Anschluss die TK in die SAC II Schnittstelle inseriert. Abbildung III.3 verdeutlicht die Klonierungsstrategie.

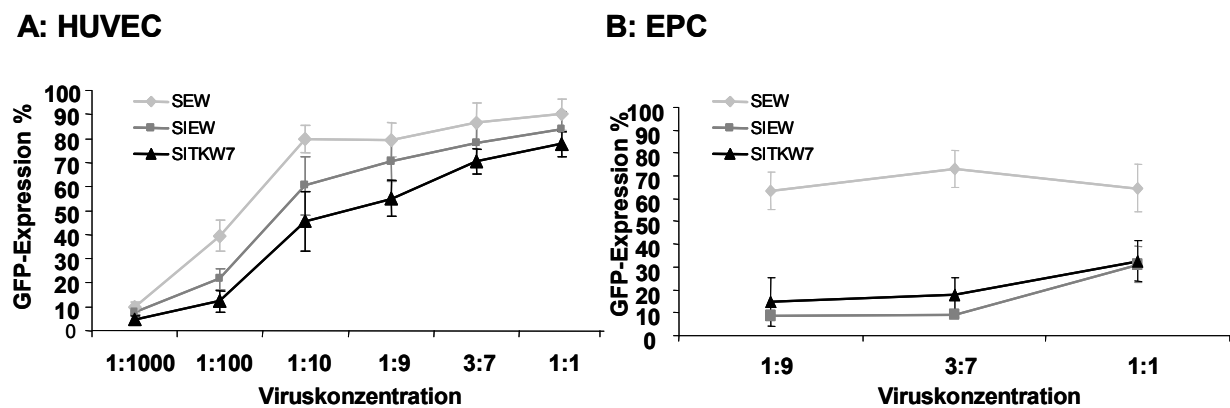


**Abbildung 3.3:** Klonierungsstrategie für die Vektoren SETKW8 und SITKW7

## Ergebnisse

### 3.1.4 Transduktionseffizienz unterschiedlicher lentiviraler Vektoren

Nach Klonierung der lentiviralen Vektoren SETKW8 und SITKW7 wurde die Transduktionseffizienz in HUVEC und EPC bestimmt. Hierfür wurden HUVEC und EPC mit den Vektoren SEW, SIEW und SITKW7 transduziert und die GFP-Expression mittels FACS ermittelt.



**Abbildung 3.4:** Transduktionseffizienz der Vektoren SEW, SIEW und SITKW7. Graph A zeigt die GFP-Expression in HUVEC nach Transduktion mit einer steigenden Konzentration des Virusüberstandes (verdünnt mit frischem Medium). Graph B zeigt die GFP-Expression in EPC; n = 5.

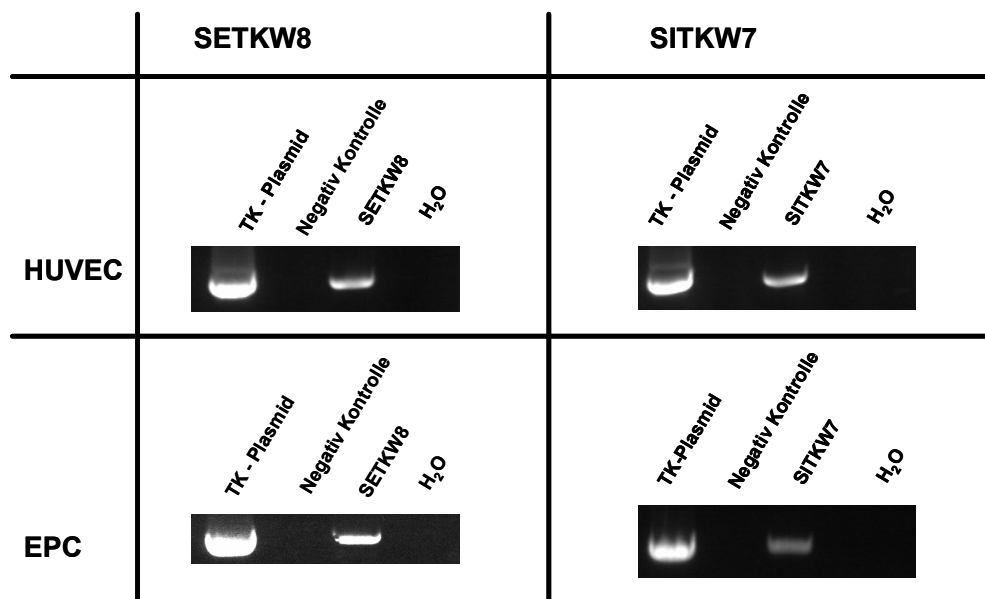
Hierbei zeigte sich, dass die Transduktionsrate von allen drei Konstrukten in HUVEC mit 60 – 90% hoch bis sehr hoch waren. In EPC hingegen zeigte sich lediglich beim SEW eine GFP-Expression von 70 – 80%. SIEW und SITKW7 erreichten lediglich eine Expressionsrate von 10 – 20%. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte neben einer geringen Transduktionsrate der lentiviralen Vektoren SIEW und SITKW7 in der Position des GFP-Gens innerhalb des Plasmids liegen. Im SEW befindet sich das Zielgen (eGFP) direkt hinter dem Promoter. Beim SIEW und SITKW7 ist das Gen des eGFP lediglich das zweite Zielgen und befindet sich hinter der IRES-Sequenz ohne direkte Beziehung zum Promoter. Dies könnte trotz guter Transduktion zu einer verminderten Expression des eGFP führen.

### 3.2 Biologisches Verhalten von EPC nach Transduktion mit den lentiviralen Vektoren

Im vorigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass sich lentivirale Vektoren im Allgemeinen gut dazu eignen EPC, MNC und HUVEC zu transduzieren. Es musste jedoch im Folgenden der Nachweis erbracht werden, dass unser Vektor SETKW8 und SITKW7 in der Lage sind, das Zielgen TK in das Genom von Zellen einzuschleusen und stabil in das Genom zu integrieren. Dies konnte aus Ermangelung eines spezifischen Antikörpers nicht mittels FACS-Analyse durchgeführt werden. Wir entschieden uns für den Nachweis mittels PCR aus genomischer DNA transduzierter Zellen.

#### 3.2.1 Nachweis der Integration der TK in das Genom von HUVEC und EPC

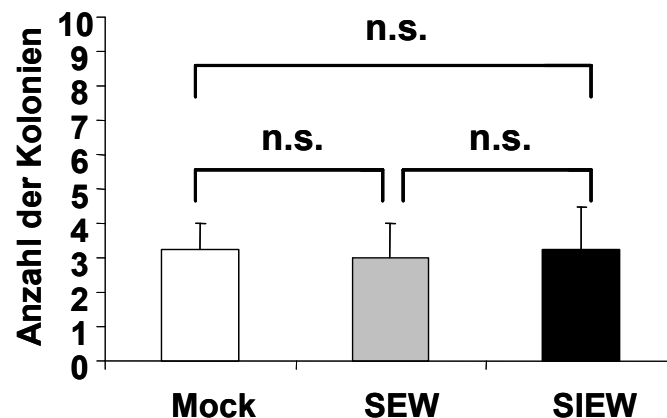
Der Nachweis der Integration der Zielgens Thymidinkinase (TK) durch Transduktion mit den Vektoren SETKW8 und SITKW7 wurde mittels PCR erbracht. Hierbei wurden EPC und HUVEC an zwei aufeinanderfolgenden Tagen transduziert und nach 72 Stunden die gDNA der Zellen isoliert. Durch Amplifikation mit Hilfe einer PCR konnten in EPC und HUVEC nach Transduktion mit dem SITKW7 und SETKW8 die virale Thymidinkinase nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.5:** Nachweis der Integration des Zielgens TK in das Genom von EPC und HUVEC nach Transduktion mit den Vektoren SITKW7 und SETKW8; n = 3.

### 3.2.2 Koloniebildungsfähigkeit und Migrationsverhalten von transduzierten versus untransduzierten EPC

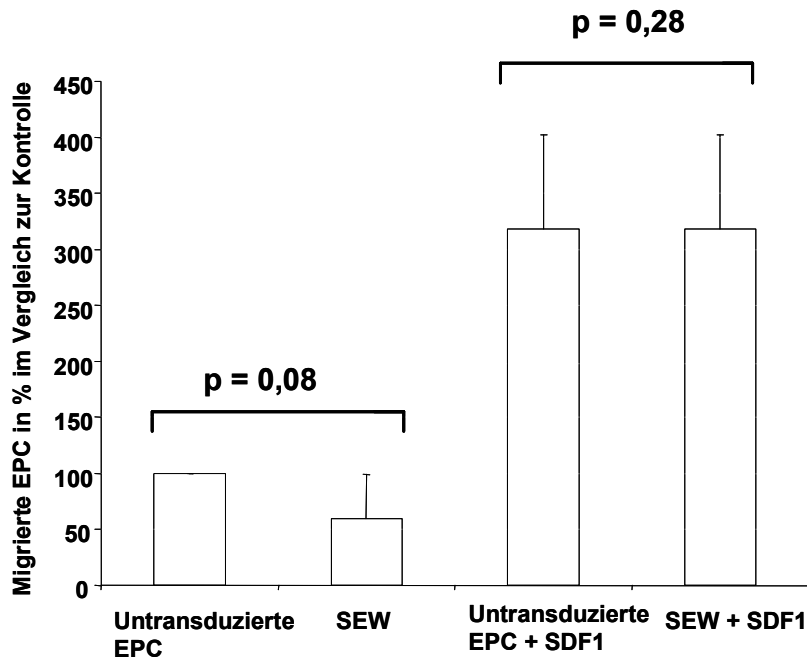
Im vorigen Abschnitt konnten wir nachweisen, dass es durch die Transduktion zur stabilen Integration des Zielgens TK in das Genom der Zelle gekommen ist. Jedoch geschieht die virale Integration in das Genom zufällig und könnte daher das Expressionmuster der transduzierten Zelle ändern. Um eine Beeinflussung der Biologie der transduzierten Zellen ausschließen zu können, verglichen wir die Koloniebildungsfähigkeit „Colony forming“ und das Migrationsverhalten von transduzierten versus nicht transduzierten Zellen. Nach Transduktion der EPC an zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde die Koloniebildungsfähigkeit der transduzierten EPC mit untransduzierten EPC verglichen. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der gebildeten Kolonien. Siehe Abbildung III.6.



**Abbildung 3.6:** Anzahl der gebildeten Kolonien ausgehend von untransduzierten EPC (weiß) und EPC transduziert mit dem Vektor SEW (grau) und SIEW (schwarz). Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Koloniebildungsfähigkeit. n = 3.

Das Migrationsverhalten von transduzierten EPC versus untransduzierten EPC wurde mit Hilfe einer Boydenkammer untersucht. Als Stimulans diente SDF 1. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Migrationsverhalten transduzierter EPC versus unbehandelte EPC.

## Ergebnisse



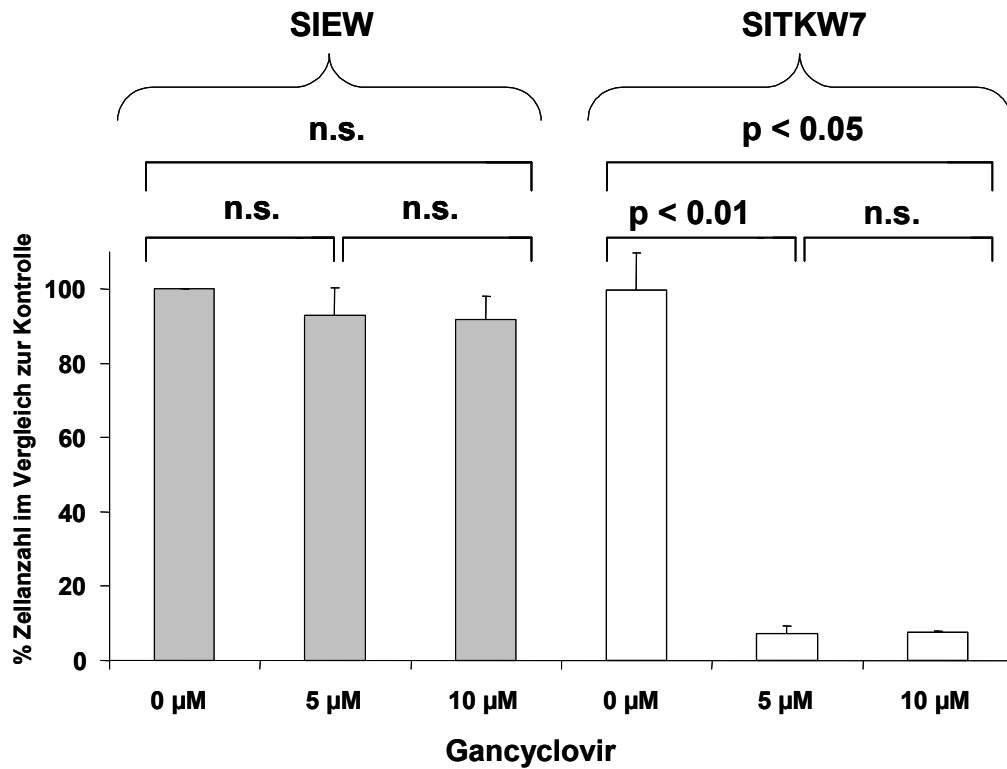
**Abbildung 3.7:** Migrationsverhalten transduzierter EPC versus untransduzierter EPC mit oder ohne Stimulation mit SDF1; n = 3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transduktion unter den von uns gewählten Bedingungen das biologische Verhalten der EPC nicht signifikant verändert.

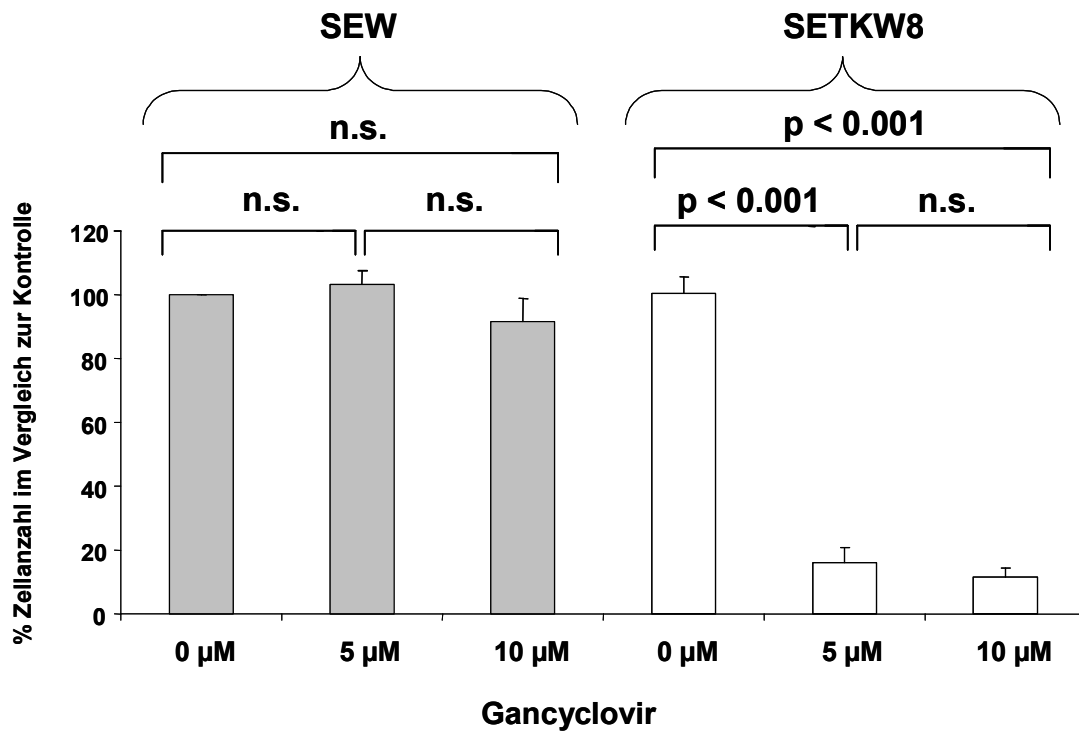
### ***3.2.3 Abtötung von TK-transduzierter HUVEC durch Gancyclovir-behandlung***

Zellen vermögen eingeschleuste DNA durch Methylierung und Acetylierung zu inaktivieren und die Transkription und Translation des Zielgens zu verhindern. Unser Versuchsansatz der Elimination von TK-transduzierten Zellen durch die Gabe von Gancyclovir wurde an HUVEC bestätigt. Hierfür wurden HUVEC an zwei Tagen mit dem TK übertragenden Vektoren SETKW8 oder SITKW7 transduziert. Als Kontrolle dienten HUVEC, die mit dem GFP-kodierenden SEW oder SIEW transduziert wurden. Die transduzierten Zellen wurden für 48 Stunden mit 0, 10 oder 50  $\mu\text{M}$  Gancyclovir behandelt. Zur Quantifizierung der lebenden Zellen diente der MTT-Test. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellzahl um bis zu 80 – 90% sowohl für SETKW8 als auch SITKW7 transduzierter Zellen. In den Vergleichsgruppen zeigte sich kein toxischer Effekt des Gancyclovir auf die Zellen (siehe Abbildung 3.8 & 3.9).

## Ergebnisse



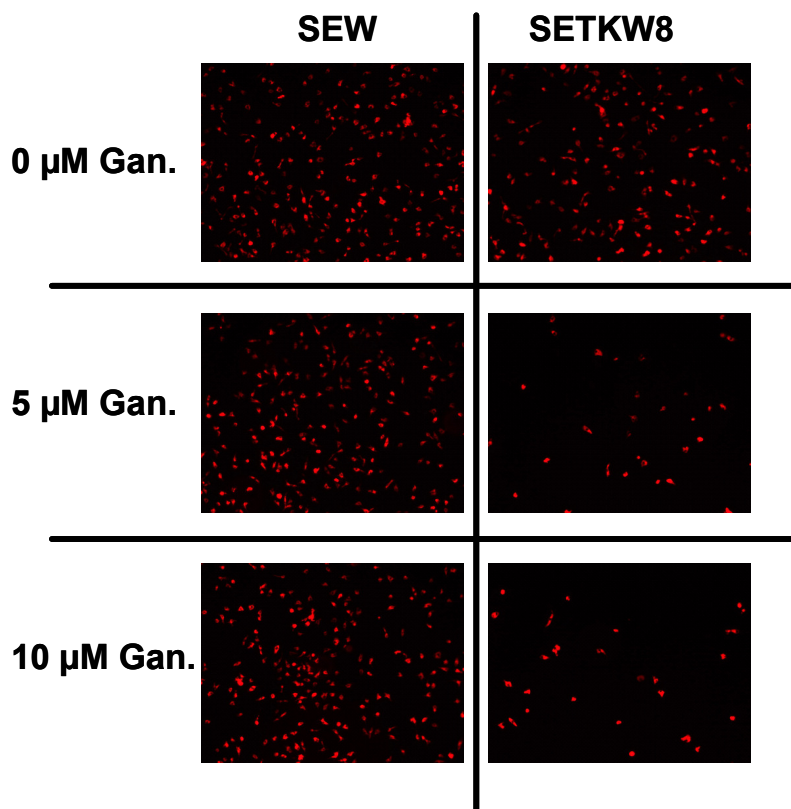
**Abbildung 3.8:** MTT-Assay von transduzierten HUVEC mit der viralen Thymidinkinase (SITKW7) oder GFP (SIEW) als Kontrollgruppe nach Behandlung mit 0, 10 oder 50 µM Gancyclovir für 48 Stunden; n = 3.



**Abbildung 3.9:** MTT-Assay von transduzierten HUVEC mit der viralen Thymidinkinase (SETKW8) oder GFP (SEW) als Kontrollgruppe nach Behandlung mit 0, 10 oder 50 µM Gancyclovir für 48 Stunden; n = 7.

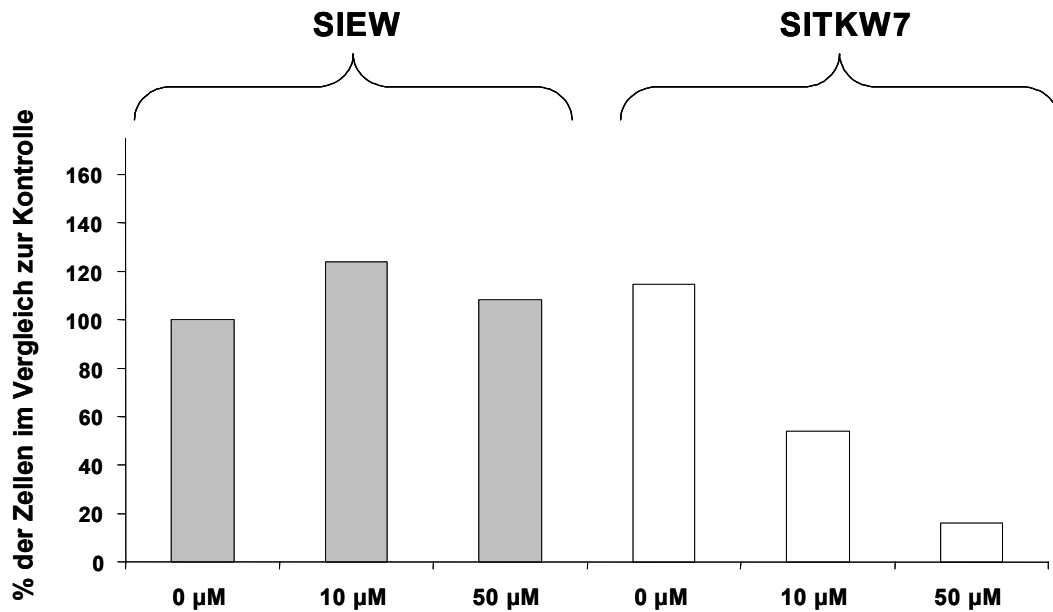
### 3.2.4 Abtötung von TK-transduzierter EPC durch Gancyclovirbehandlung

Nachdem wir zeigen konnten, dass die gezielte Elimination von HUVEC nach Transduktion mit einem TK-Vektor und Gancyclovirgabe möglich war, wiederholten wir den Versuchsansatz mit EPC. Drei Tag nach Isolation der Zellen führten wir eine Transduktion an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit dem TK-Vektor SETKW8 und SITKW7 durch. Als negative Kontrolle dienten EPC, transduziert mit dem GFP-Vektor SEW oder SIEW. Nach weiteren zwei Tagen erhielten die Dil-LDL markierten Zellen Gancyclovir für 36 Stunden in drei unterschiedlichen Konzentrationen. Hierbei zeigte sich, dass die Zahl der SETKW8 transduzierten EPC, signifikant nach Zugabe von Gancyclovir abgenommen hatte. In der Gruppe der SITKW7 transduzierten Zellen zeigte sich eine Abnahme, die jedoch nicht signifikant war. Für die Elimination SITKW7-transduzierter EPC waren auch höhere Gancyclovirdosen notwendig.

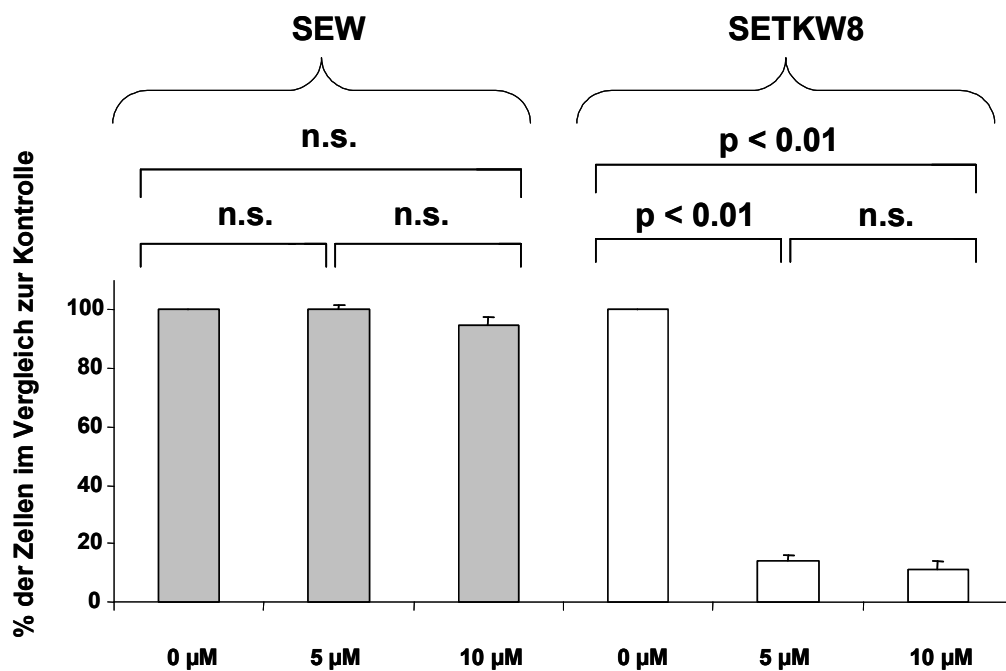


**Abbildung 3.10** : Abtötung von TK-transduzierter EPC nach Gabe von Gancyclovir. Zellen mit Dil-LDL markiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.11:** Abtötung der TK-transduzierten EPC (SITKW7) nach der Gabe von Gancyclovir. Aufgetragen wurden die prozentuale Anzahl der Zellen verglichen zur Kontrolle der unbehandelten Zellen. n = 2.



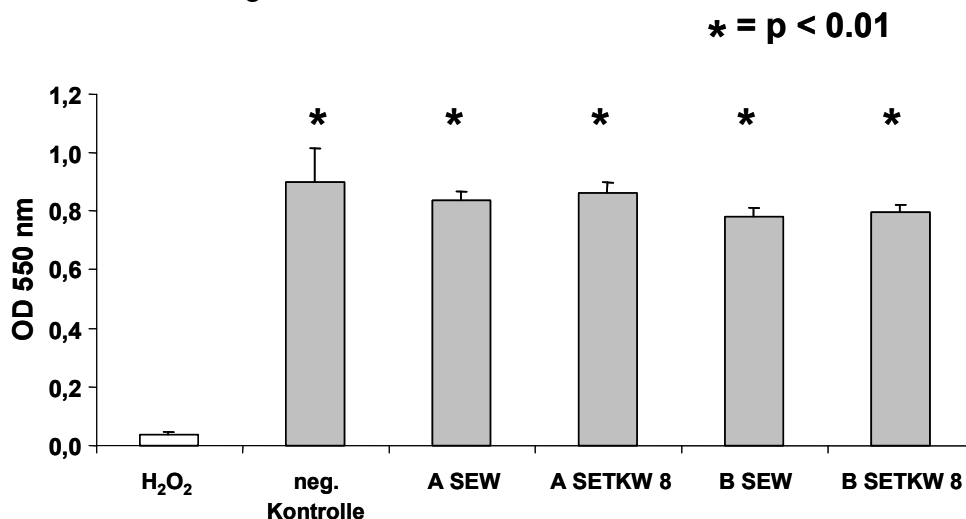
**Abbildung 3.12:** Abtötung der TK-transduzierten EPC (SETKW8) nach der Gabe von Gancyclovir. Aufgetragen wurden die prozentuale Anzahl der Zellen verglichen zur Kontrolle der unbehandelten Zellen. n = 3.



## Ergebnisse

### 3.2.5 Unspezifische Toxizität von TK-transduzierten Zellen bei Gancyclovirbehandlung

Um eine unspezifische Toxizität von TK-transduzierten Zellen nach Gancyclovirbehandlung auszuschließen wurden EPC TK-transduziert und für 3 Tage mit Gancyclovir behandelt. Der Mediumüberstand der EPC wurde kollektiert und für 24 Stunden auf HUVEC und RattenKardiomyozyten gegeben. Als positive Kontrolle dienten HUVEC und Kardiomyozyten, die mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden. Im Anschluss wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit einem MTT-Assay quantifiziert. Hierbei zeigte sich sowohl bei den HUVEC als auch bei den Kardiomyozyten keine Reduktion der Zellzahl. Eine unspezifische apoptotische Wirkung unseres Versuchsansatzes auf Zellen in der Umgebung von TK-transduzierten Zellen bei Gancyclovirbehandlung konnte somit ausgeschlossen werden.



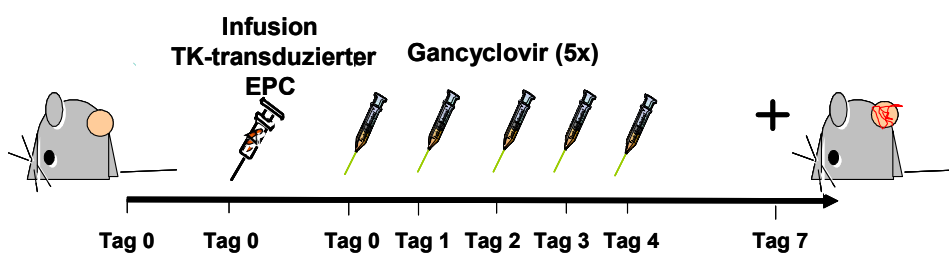
**Abbildung 3.13:** Ausschluss der unspezifischen Toxizität von TK-transduzierten EPC bei Gancyclovirgabe. Kontrollgruppe behandelt mit 1  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. n = 3.

In Zusammenschau aller in vitro Ergebnisse konnten wir zeigen, dass sich Lentiviren zur Transduktion von einer Vielzahl von Zellen mit sogar sehr geringer Teilungsrate wie EPC eignen. Das klonierte Konstrukt SETKW8 ermöglichte die gezielte Elimination von HUVEC und EPC durch die Zugabe von Gancyclovir. Der SITKW7-Vektor ermöglicht ebenfalls die Insertion des Zielgens TK in das Genom von EPC und HUVEC. Die funktionelle Abtötung ist jedoch in EPC nur gering ausgeprägt, so dass wir uns entschieden, lediglich mit dem gut funktionierenden SETKW8 in den folgenden Tierexperimenten zu arbeiten.

### 3.3 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Matrigelmodell der Nacktmaus

Zur Untersuchung des Neovaskularisationspotentials von EPC wurde zunächst ein subkutanes Matrigelmodell in der Nacktmaus benutzt. Nach Injektion von Matrigel kommt es zur Einsprossung von Kapillaren in das Gel. Ermittelt wurde in den einzelnen Versuchsgruppen die Anzahl der eingewanderten gefäßassoziierten Zellen im Randbereich des Matrigels. Nach Isolation und Kultivierung wurden die EPC am Tag drei und vier nach Isolierung mit dem Vektor SEW oder SETKW8 transduziert. Nach subkutaner Injektion des Matrigel-Plugs in die Rückenpartie der Nacktmaus wurden zwei Stunden später  $2 \cdot 10^6$  transduzierte Zellen intravenös in die Maus injiziert. Ein Teil der Tiere wurde direkt im Anschluss an fünf Tagen durch Intraperitonealinjektionen (i.p.) mit Gancyclovir behandelt. In einer Langzeitgruppe erfolgte die erste Gabe von Gancyclovir eine Woche nach Injektion der Zellen an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Tiere aus der Kurzzeitgruppe wurden eine Woche nach Zellinjektion getötet, Tiere aus der Langzeitgruppe nach zwei Wochen. Der Matrigel-Plug wurde sorgfältig entfernt und der Histologie zugeführt. Abbildung 3.14 verdeutlicht das Versuchsdesign.

#### Kurzzeitversuch:



#### Langzeitversuch:

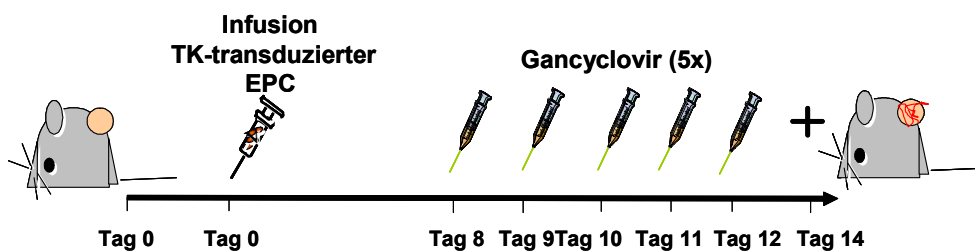
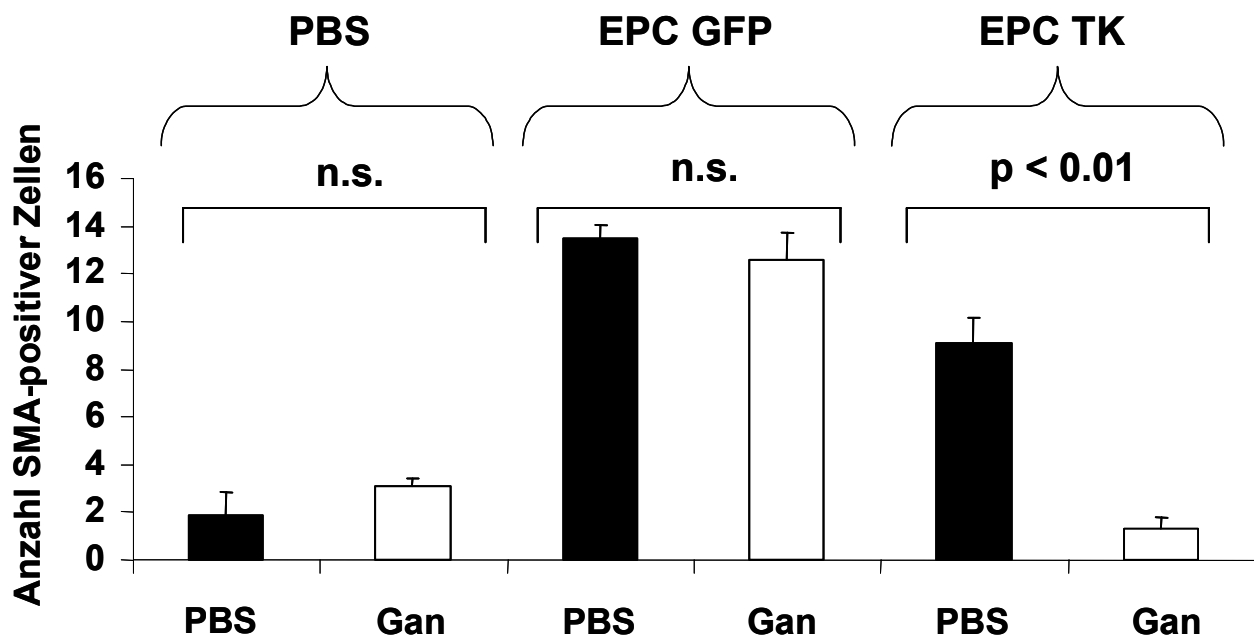


Abbildung 3.14: Versuchsdesign der in vivo Matrigelexperimente in der Nacktmaus.

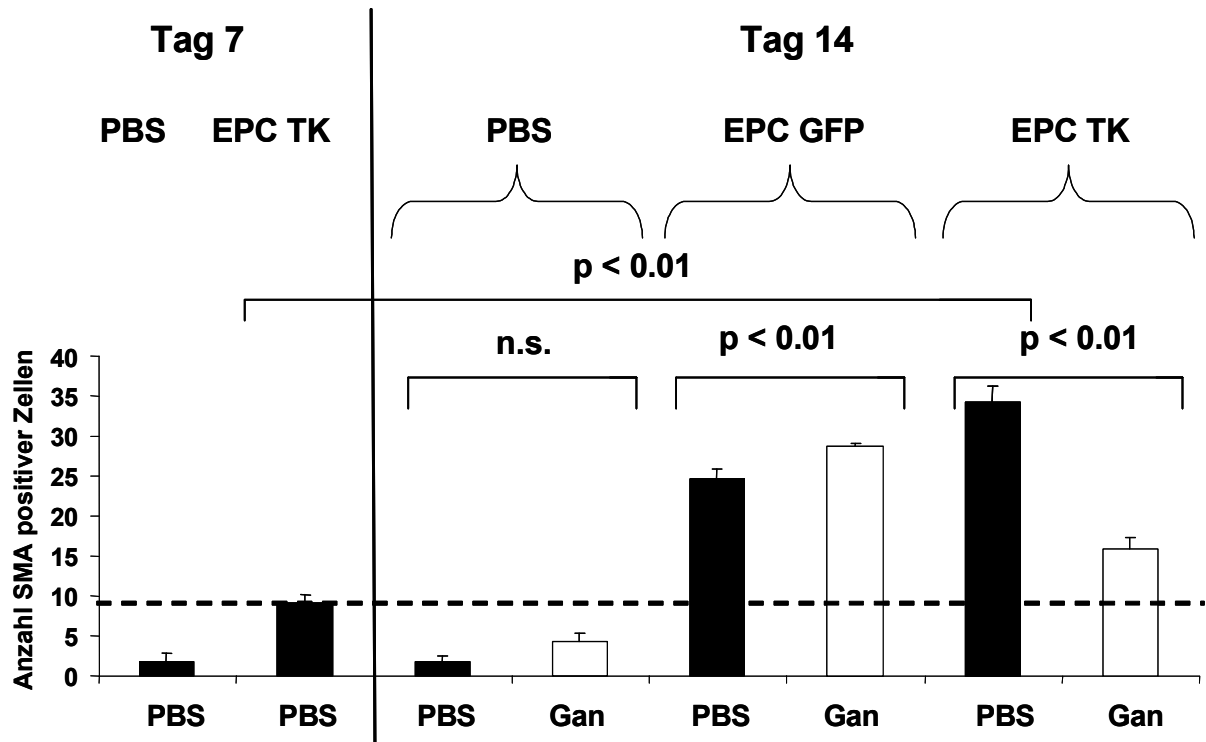
## Ergebnisse

Die Injektion von TK-transduzierten EPC führte zu einer signifikant höheren Anzahl an Kapillaren pro Bildausschnitt im Vergleich zu Tieren ohne EPC-Injektion (TK-EPC:  $9.12 \pm 1.04$  versus Kontrollgruppe:  $1.87 \pm 1.1$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 5-6$ ). Zur selektiven Abtötung TK-transduzierter EPC wurde eine weitere Gruppe ab Tag 0 der Zellgabe mit GC behandelt. Die Gabe von Gancyclovir führte zu einer signifikanten Reduktion der Kapillarbildung bei Tieren, die eine Zelltherapie mit TK-transduzierten EPC bekommen hatten auf ein ähnliches Maß wie die Gruppe ohne Zellgabe ( $1.28 \pm 0.55$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ ). Um einen allgemeinen Effekt von Gancyclovir auf die Neovaskularisation auszuschließen, wurden Tiere mit GFP-transduzierten EPC ebenfalls mit Gancyclovir behandelt. Hier zeigte sich keine Reduktion der Kapillarbildung (GFP-EPC mit GC:  $12.56 \pm 1.18$ ). Um eine physische Beteiligung der infundierten Progenitorzellen im Verlauf der Gefäßbildung zu eruieren, wurde in einer Gruppe der Tiere Gancyclovir erst nach einer Woche appliziert. Die Gabe von Gancyclovir inhibierte signifikant die Kapillareinsprossung im Vergleich zu Tieren ohne Elimination der EPC.

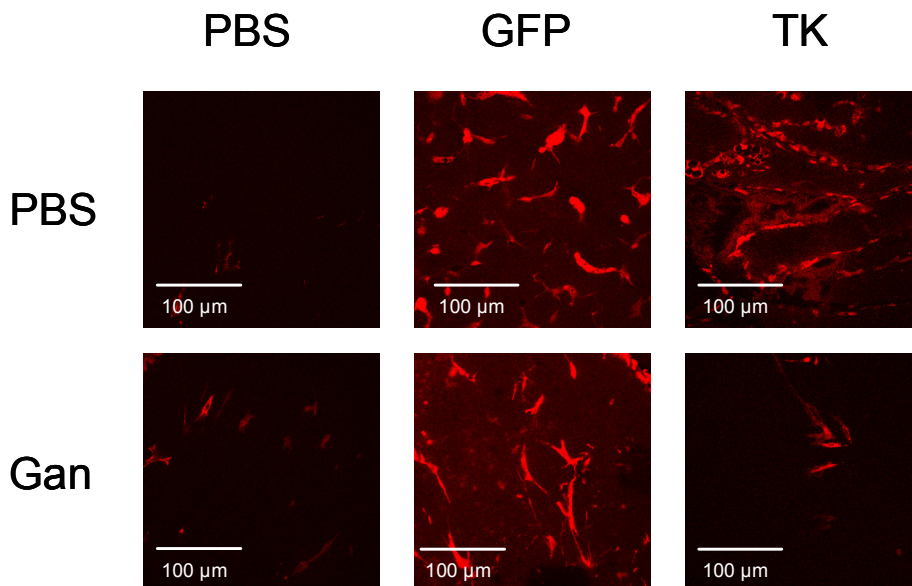


**Abbildung 3.15:** Kurzzeitexperiment. Einfluss von gezielter Eliminierung der EPC auf die Anzahl von SMA<sup>+</sup>-Zellen in Matrigel-Plugs durch 5-tägige Gancyclovirgabe direkt im Anschluss an die Zellinfusion.  $n = 4$ .

## Ergebnisse



**Abbildung 3.16:** Langzeitexperiment. Einfluss von gezielter Eliminierung der EPC auf die Anzahl von SMA<sup>+</sup>-Zellen in Matrigel-Plugs durch 5-tägige Gancyclovirgabe eine Woche nach Zellinfusion. n = 4.



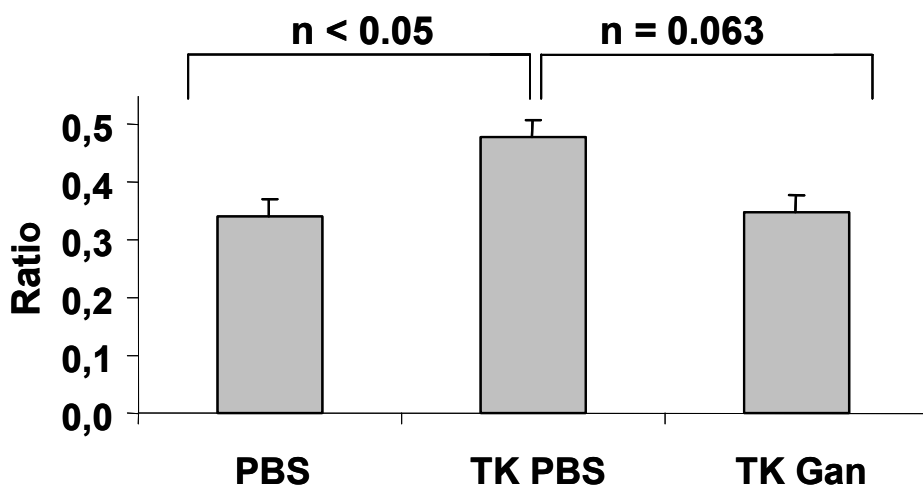
**Abbildung 3.17:** Exemplarische konfokale mikroskopische Aufnahmen des Matrigel-langzeitexperiments. „Smooth-muscle-actin“-Färbung. Vertikal: Gan = Gancyclovir; PBS = Phosphatpuffer. Horizontal: PBS = Tiere ohne Zelltherapie; GFP = Tiere mit EPC-GFP-Zelltherapie; TK = Tiere mit EPC-TK-Zelltherapie.

## Ergebnisse

Wir konnten im letzten Kapitel zeigen, dass die selektive Depletion der infundierten EPC zum Zeitpunkt der Zelltherapie vollständig die Neovaskularisierung verhindert. Eine signifikante Reduktion wurde auch beobachtet, wenn die Aktivierung des Suidgens erst nach sieben Tagen der Zelltherapie erfolgte. Diese Daten zeigen, dass infundierte EPC nicht ausschließlich über parakrine Effekte, sondern auch langfristig (>7 Tagen) zur Neovaskularisation beitragen.

### 3.4 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus

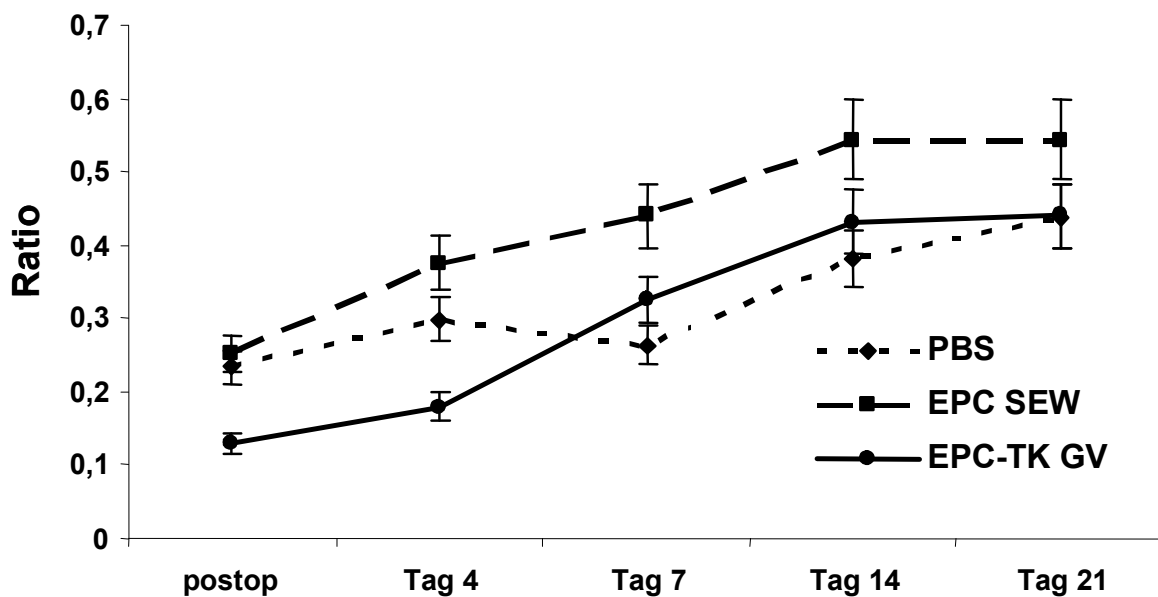
Zur Untersuchung der postischämischen Neovaskularisation wurde das Modell der Hinterlaufischämie in der Nacktmaus gewählt. Ein Tag nach operativer Ligation der Arteria femoralis profunda und Arteria femoralis superficialis injizierten wir intravenös  $2 \cdot 10^6$  TK-transduzierte EPC. Im Anschluss erhielt ein Teil der Tiere (TK Gan) ab dem Tag der Zellgabe an sieben aufeinanderfolgenden Tagen eine intraperitoneale Gancyclovirinjektion. Der andere Teil der Tiere mit Zelltherapie (TK PBS) erhielt anstelle des Gancyclovir lediglich Injektionen einer salinen Lösung (PBS). Als Kontrollgruppe dienten Tiere ohne Zellinjektion. 14 Tage nach Operation wurde die Durchblutung der Tiere mittels eines Laserscanners ermittelt. In Anschluss wurden die Tiere getötet.



**Abbildung 3.18:** Einfluss von EPC auf die Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus; n = 5.

## Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Tiere mit Zelltherapie und anschließender PBS-Behandlung im Vergleich zur Gruppe ohne Zellgabe eine signifikant bessere Durchblutung aufwiesen. In den Tieren mit Zelltherapie und Gancyclovirgabe zeigte sich eine Reduktion der Durchblutung im Vergleich zur Zelltherapiegruppe ohne Gancyclovir. Diese Ergebnisse, die die Signifikanzkriterien knapp verfehlen ( $p = 0,063$ ), konnten in einer weiteren Versuchsserie von Chang-Hwan Yoon signifikant bestätigt werden (Abbildung 3.19).



**Abbildung 3.19:** Einfluss von EPC auf die Neovaskularisation im Hinterlaufischämiemodell der Nacktmaus. Direkt nach der OP, an Tag 4, 7, 14 und 21 wurde die Durchblutung mittels Laserscanner gemessen; Tiergruppen: PBS: Tiere ohne Stammzelltherapie, EPC SEW: Tiere mit Stammzelltherapie mit SEW transduzierten EPC, EPC-TK GV: Tiere mit Stammzelltherapie mit TK transduzierten EPC und direkter Gancyclovirgabe;  $n = 4$ .

### 3.5 Untersuchung des Einflusses von EPC auf die Neovaskularisation im Herzinfarktmodell der Nacktmaus

Als Modell der akuten kardialen Ischämie diente das Herzinfarktmodell in der Nacktmaus. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem Einfluss der Zelltherapie beim Myokardinfarkt auch zwei unterschiedliche Applikationswege der Zelltherapie untersucht: Die intracavitäre Zellgabe in den linken Ventrikel sowie die systemische intravenöse Zellinjektion. Die potentiell zugrunde liegenden Mechanismen eines parakrinen Kurzzeiteffekts der EPC und/oder langfristiger Effekt über eine Inkorporation der Progenitorzellen in neu gebildeten Gefäßen konnte dadurch weiter abgegrenzt werden, indem die TK-transduzierten EPC zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Gancyclovirgabe abgetötet wurden. Tabelle 3.1 verdeutlicht das Versuchsdesign der einzelnen Versuche.

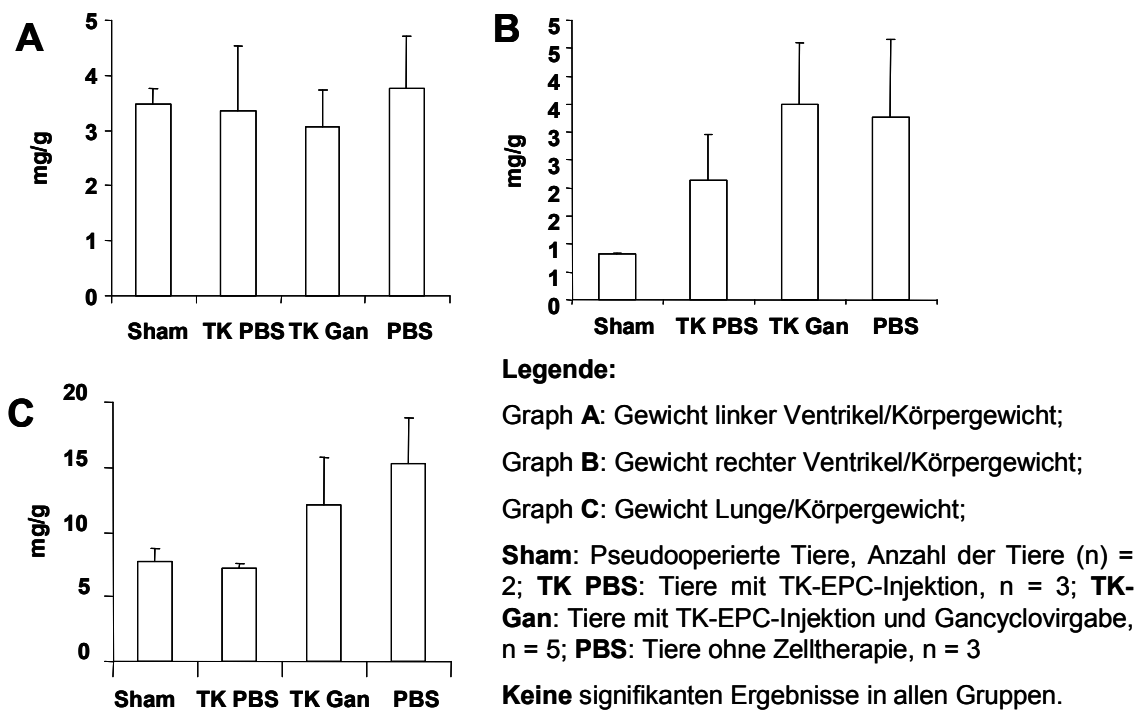
Name	Art der Zellgabe	Zellanzahl	Anzahl der Tiere	Anzahl der Versuchsserien	Gancyclovirgabe	Endpunkt	Analyse
<b>AMI-1</b>	intracavitär während der OP	1*10 <sup>6</sup>	36	3	Tag 0-7 nach Zellinjektion (i.p.)	14 Tage nach Operation (OP)	Infarktgröße Organgewicht
<b>AMI-2</b>	intracavitär während der OP	2*10 <sup>6</sup>	3	1	Tag 12-14 nach Zellinjektion (i.p.)	15 Tage nach Operation	Echo am Tag 12 und 15 nach OP
<b>AMI-3</b>	intravenös am Tag nach der OP	2*10 <sup>6</sup>	42	4	<b>Kurzzeit:</b> Tag 14-16 nach OP (i.p.) <b>Langzeit:</b> Tag 21-23 Nach OP (i.p.)	28 Tage nach Operation	Echo am Tag 14, 18 und 25 nach OP MRT Tag 28

**Tabelle 3.1:** Versuchsdesign der Herzinfarktversuche (AMI)

## Ergebnisse

### 3.5.1 Auswirkung der intracavitären Zelltherapie nach Mykardinfarkt auf Infarktgröße und Organgewicht (AMI-1)

Nach Ligierung der linken Koronararterie, die zu einem anteriorem Mykardinfarkt führte (AMI), wurden  $1 \cdot 10^6$  transduzierte EPC intraoperativ in die Cavität des linken Ventrikel gespritzt. Durch Aspiration vor und nach der Injektion wurde sichergestellt, dass wir die Zellen streng intraventrikulär und nicht intramural injiziert hatten. Ein Teil der Tiere mit Zelltherapie erhielt direkt nach Infarktoperation intraperitoneale Gancyclovirinjektionen an acht aufeinander folgenden Tagen. Zwei Wochen nach Operation wurden die Tiere eingeschläfert und Herz und Lunge entnommen. Das Herz wurde unter dem Operationsmikroskop in einen rechten und einem linken Ventrikel separiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung des Gesamtkörpergewicht und des Gewichts der Ventrikel und der Lunge. Um Schwankungen des Körpergewichts auszugleichen, wurde jeweils der Quotient aus absolutem Organgewicht und Körpergewicht gebildet. Das Gewicht des linken Ventrikels zeigte keinen Unterschied in den einzelnen Gruppen. Lunge und rechter Ventrikel der Versuchstiere mit Zelltherapie und gefolgter Gancyclovirgabe und Tiere ohne Zelltherapie zeigten ein nicht signifikantes erhöhtes Gewicht.

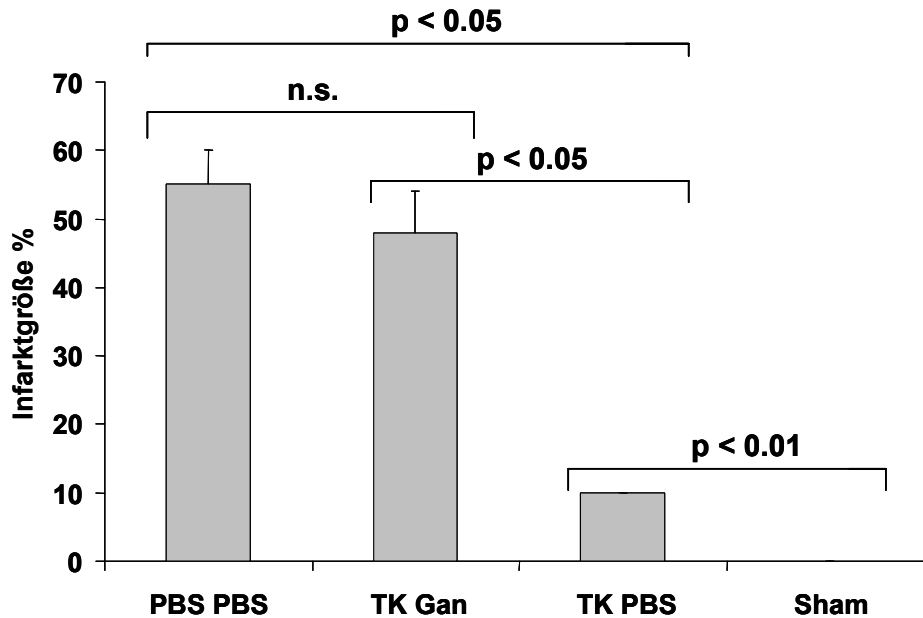


**Abbildung 3.20:** Einfluss der intracavitären Zellthapie nach AMI auf die Organgewichte von Herz und Lunge in der Nacktmaus.



## Ergebnisse

Die Infarktgröße wurde nach Entnahme des Herzens verblindet visuell bestimmt. Es zeigte sich eine signifikante Infarktgrößenreduktion in der Zelltherapiegruppe ohne Gancyclovirbehandlung im Vergleich zu den Tieren ohne Zelltherapie und der Gruppe mit Zelltherapie und Gancyclovirbehandlung.



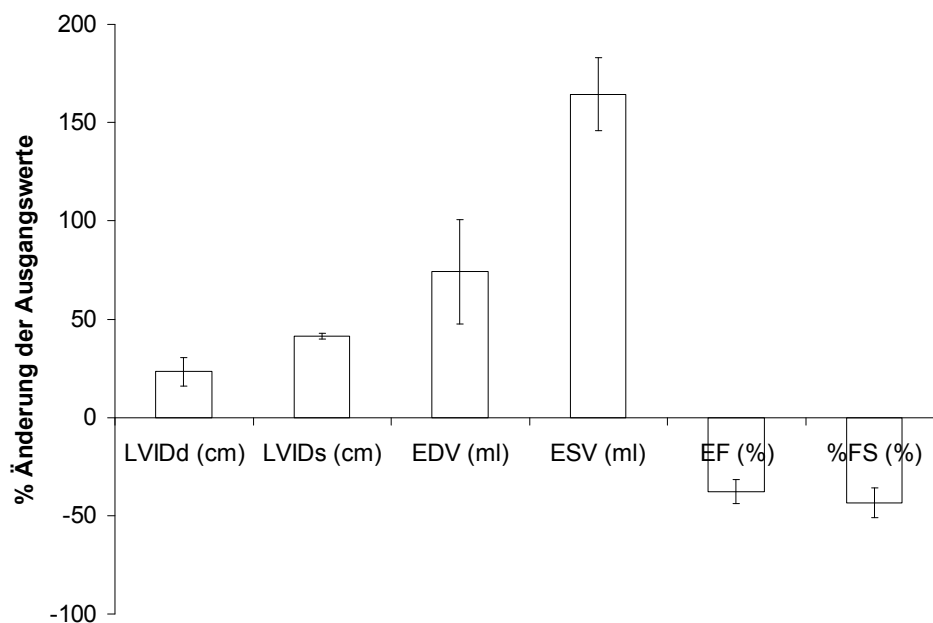
**Abbildung 3.21:** Visuell bestimmte Infarktgrößen in den einzelnen Gruppen nach intraventrikulärer Gabe von TK-transduzierten EPC (SETKW 8) mit nachfolgender Gabe von Gancyclovir (Gan) oder PBS (PBS). Weiterhin Vergleichsgruppe ohne Zelltherapie (PBS PBS) und Placebo operierte Tiere (Sham). **Legende:** Sham: Pseudooperierte Tiere, Anzahl der Tiere (n) = 2; **TK PBS:** Tiere mit TK-EPC-Injektion, n = 3; **TK-Gan:** Tiere mit TK-EPC-Injektion und Gancyclovirgabe, n = 5; **PBS:** Tiere ohne Zelltherapie, n = 3.

### ***3.5.2 Auswirkung der intracavitären Zelltherapie nach Mykardinfarkt auf die Herzfunktion (AMI-2)***

Im letzten Abschnitt konnte gezeigt werden, dass eine intracavitäre Injektion von EPC zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße führt. Eine Elimination in der ersten Woche der TK-transduzierten Stammzellen durch Gancyclovir verhindert den positiven Effekt auf die Infarktgröße. In einer weiteren Versuchsserie wurde bei drei Tieren nach Herzinfarkt-OP und intracavitäre Zellgabe die Herzfunktion der Tiere vor und nach einer dreitägigen Gancyclovirgabe mittels Echokardiographie bestimmt. Das Versuchsdesign wurde analog zum Versuch AMI-1 gewählt. Jedoch betrug die

## Ergebnisse

Zellzahl pro Injektion  $2 \cdot 10^6$  transduzierte EPC. Die Gancyclovirgabe erfolgte an den Tagen 12-14 post OP. Davor und danach wurde die Herzleistung mittels Echokardiographie bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die Herzleistung beschrieben durch die Ejektionsfraktion (EF) und das „fractional shortening“ signifikant abnimmt und die Tiere eine Linksherzinsuffizienz ausbilden, erkennbar an der Zunahme des linksventrikulären Durchmessers (LVIDd) des Herzens. Abbildung 3.22 gibt die Ergebnisse graphisch wieder.



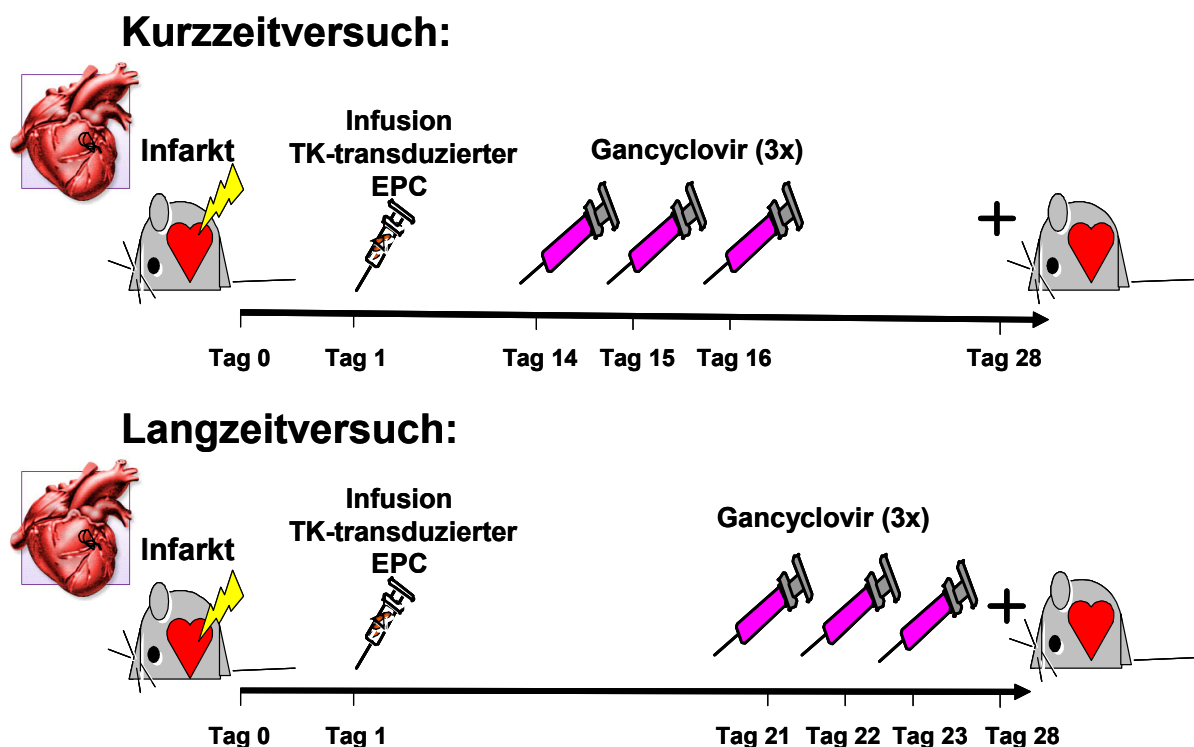
**Abbildung 3.22:** Prozentuale Änderung der Herzleistung nach dreitägiger GV-Gabe. Folgende Parameter wurden bestimmt: Ventrikulärer interner Durchmesser in der Diastole (LVIDd), ventrikulärer interner Durchmesser in der Systole (LVIDs), enddiastolisches Volumen (EDV), endsystolisches Volumen (ESV), Ejektionsfraktion (EF), fractional shortening (FS); n = 3 Tiere.

### ***3.5.3 Auswirkungen der systemisch intravenösen Zelltherapie nach Myokardinfarkt (AMI-3)***

Nachdem wir nachweisen konnten, dass sich eine intracavitäre Zelltherapie nach Herzinfarkt positiv sowohl auf die histologische Größe des Infarktareals als auch auf die funktionelle Herzleistung auswirkt, untersuchten wir den therapeutischen Effekt einer systemische intravenöse EPC-Zelltherapie. Nach Obliteration der linken Ko-

## Ergebnisse

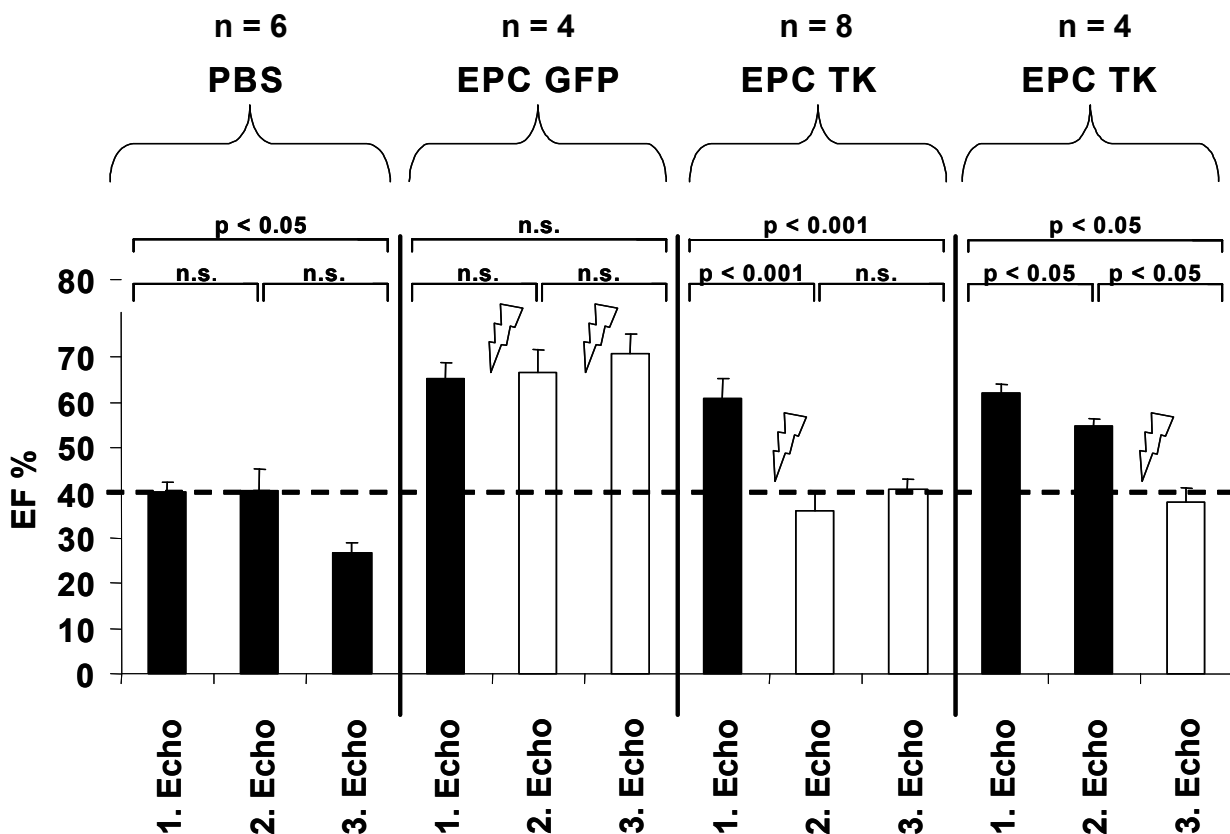
ronararterie wurden  $2 \cdot 10^6$  transduzierte EPC 24 Stunden post operativ systemisch intravenös abgeliefert. Die Tiere mit Zelltherapie waren in vier Gruppen unterteilt: Eine Gruppe erhielt GFP-transduzierte EPC und in der dritten und vierten Woche post operativ jeweils an drei aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneale Gancyclovirinjektionen. Zwei weitere Gruppen von Tieren erhielten TK-transduzierte EPC im Rahmen der Zelltherapie und in der dritten Woche oder vierten Woche Gancyclovir an jeweils drei aufeinanderfolgenden Tagen. Die vierte Gruppe erhielt TK-transduzierte EPC, jedoch keine Gancyclovirapplikation. Jeweils nach zwei, drei und vier Wochen wurde die Herzleistung mittels Echokardiographie ermittelt. Nach dem letzten Echo wurden die Tiere in tiefster Narkose ausbluten gelassen, Gesamtkörpergewicht, Gewicht von Herz und Lunge bestimmt und im Anschluss die Organe der Histologie zugeführt. Das Versuchsdesign AMI-3 wird in Tabelle 3.1 und in Abbildung 3.23 veranschaulicht.



**Abbildung 3.23:** Versuchsdesign des Herzinfarktversuches AMI-3

## Ergebnisse

In den Tieren, die keine Zelltherapie erhalten hatten, zeigte sich eine eingeschränkte Herzfunktion im gesamten Zeitraum der Untersuchung. Im Gegensatz dazu führte eine Therapie mit GFP-transduzierten EPC zu einer bleibenden Erhöhung der Herzfunktion. In den Tieren, die mit TK-transduzierten EPC behandelt wurden führten Gancyclovirinjektionen an Tag 14-16 post operativ zu einer signifikanten Verschlechterung der Herzfunktion. Eine Verschlechterung der Herzfunktion konnte auch in den Tieren mit TK-transduzierten EPC beobachtet werden nach Gancyclovirgabe an den Tagen 21 bis 23 post operativ. Die funktionellen Herzdaten sind nochmals in der Abbildung 3.24 graphisch dargestellt.



**Abbildung 3.24:** Ejektionsfraktion (EF) in den einzelnen Tiergruppen nach intravenöser Zelltherapie. Eine dreitägige Gabe von Gancyclovir ist mittels Flash-Blitz gekennzeichnet. **Legende:** **PBS:** Tiere ohne Zelltherapie, n = 6; **TK GFP:** Tiere mit GFP-EPC-Injektion, n = 4; **EPC TK:** Tiere mit TK-EPC-Injektion und Gancyclovir nach dem 1. Echo, n = 8; Tiere mit TK-EPC-Injektion und Gancyclovir nach dem 2. Echo, n = 4.

## Ergebnisse

Zur Validierung der Echo-Ergebnisse wurde die Herzfunktion von einem Teil der Tiere aus Versuch AMI-3 mittels Magnetresonanztomographie (MRT) ermittelt. Auch hier zeigte sich visuell wie funktionell eine Verbesserung der Herzfunktion nach Zelltherapie mit TK-transduzierten EPC. In Übereinstimmung mit den vorherigen Ergebnissen konnten in der Gruppe nach Zellgabe von TK-transduzierten EPC und Gancyclovirgabe an Tag 14-16 ausgeprägte Infarkte sowie eine signifikant eingeschränkte Herzfunktion nachgewiesen werden. Abbildung 3.25 und 3.26 veranschaulichen die Infarktgröße an Hand von MRT-Bildern und das endsystolische Volumen (ESV) ermittelt aus den MRT-Daten als Parameter für die Herzfunktion in den einzelnen Gruppen.

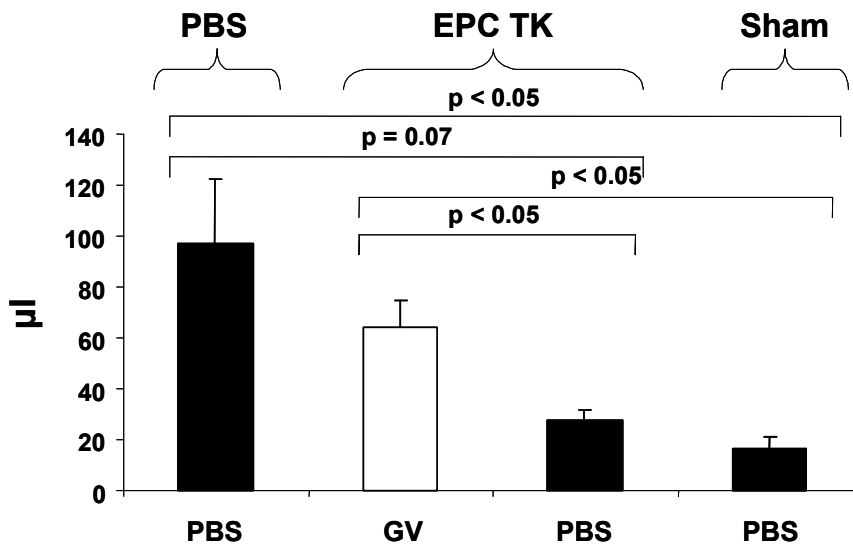


Abbildung 3.25: Ermitteltes endsystolisches Volumen (ESV) aus den MRT-Daten

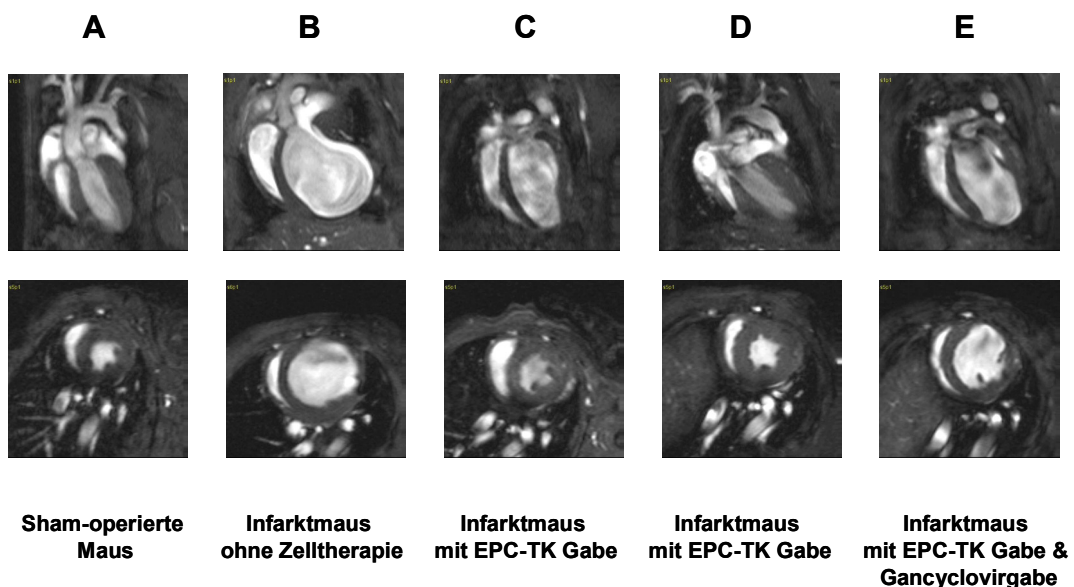
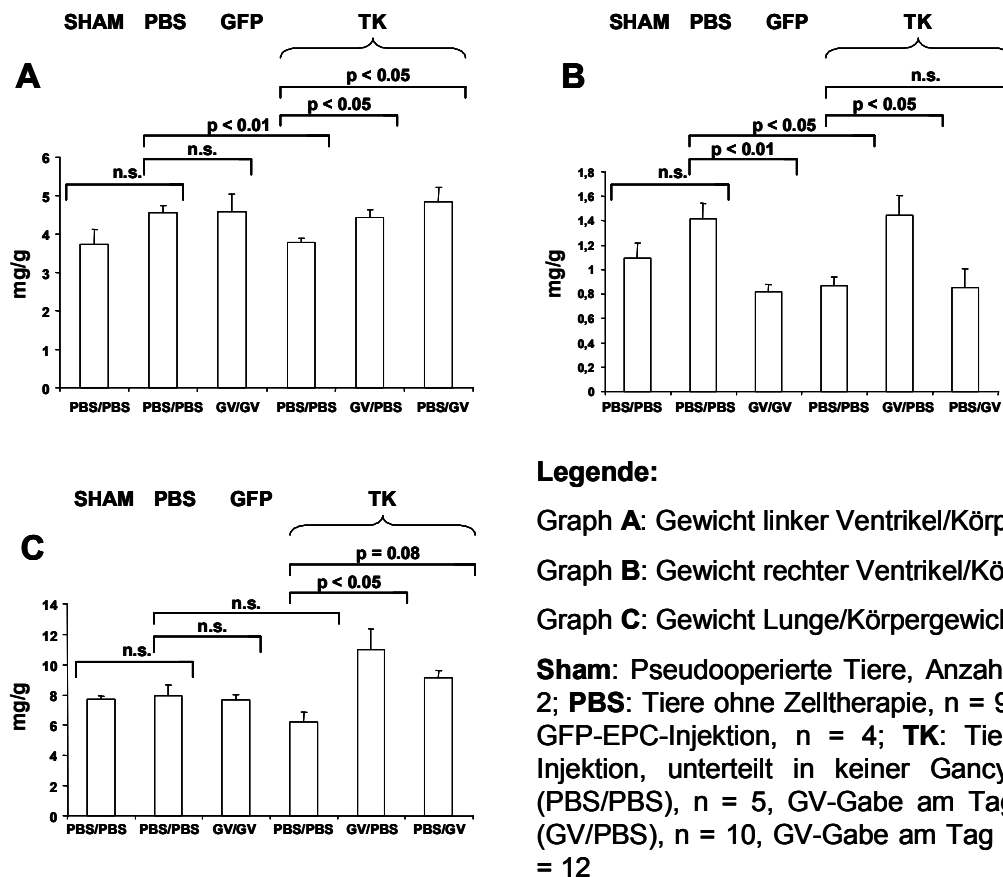


Abbildung 3.26: Repräsentative MRT-Bilder von Versuchstieren aus AMI-3

## Ergebnisse

Am Ende der Versuchsserie wurden die Tiere getötet und Herz und Lunge entnommen. Zur Bestimmung des Gewichtes des linken und rechten Ventrikels wurde das Herz unter dem Operationsmikroskop separiert. Weiterhin wurde das Lungengewicht bestimmt. Um Schwankungen des Körpergewichts auszugleichen, wurde jeweils der Quotient aus absolutem Organgewicht und Körpergewicht gebildet. Auffällig ist eine Erhöhung des Quotienten aus linkem Herzgewicht und Körpergewicht in der Versuchsgruppe mit TK-EPC-Zelltherapie nach Gancyclovirgabe im Vergleich zu den Tieren ohne Gancyclovirgabe als möglicher Ausdruck der Hypertrophie der linken Herzkammer nach Abtötung der EPC. Das Verhältnis aus rechtem Herz und Gesamtkörpergewicht war in der Gruppe ohne Zelltherapie erhöht im Vergleich zu den Tieren mit Zelltherapie. Das Gewicht des rechten Herzens war ebenfalls in den Tieren erhöht, die an Tag 14-16 post op Gancyclovir erhalten hatten. Dieser Effekt konnte in der Versuchstiergruppe mit Gancyclovirinjektionen an Tag 21-23 nicht beobachtet werden.

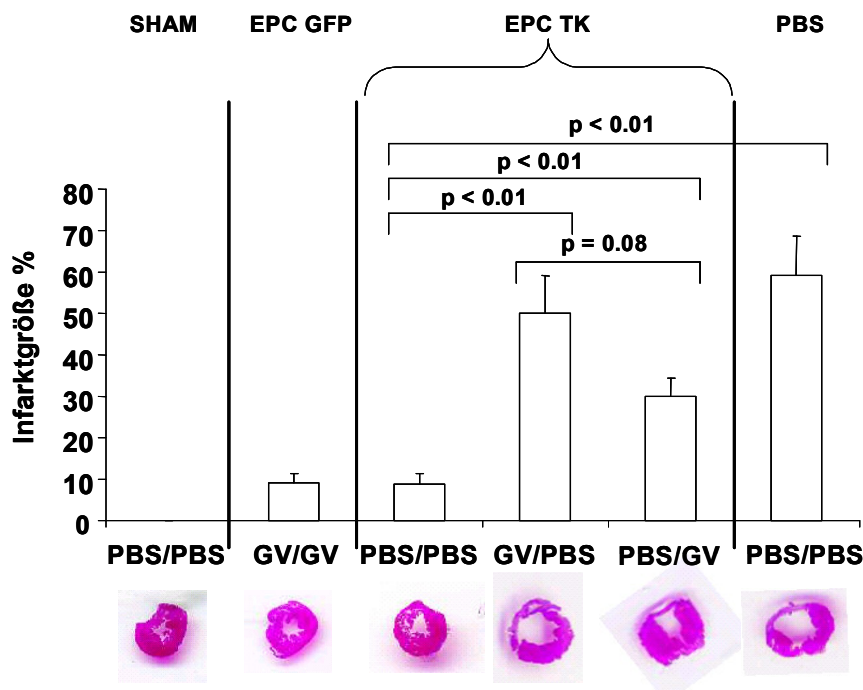


**Abbildung 3.27:** Einfluss der intravenösen Zelltherapie nach AMI auf die Organgewichte von Herz und Lunge in der Nacktmaus.

## Ergebnisse

Das Verhältnis aus Lungengewicht und Gesamtkörpergewicht zeigte ein ähnliches Ergebnis in den einzelnen Gruppen. Das Lungengewicht in der Gruppe mit TK-EPC-Injektion und Gancyclovirgabe an Tag 14-16 ist im Vergleich zu der Gruppe der Tiere mit TK-transduzierter EPC-Zelltherapie ohne Gancyclovir erhöht. In der Gruppe mit TK-EPC-Injektion und Gancyclovirgabe an Tag 21 – 23 zeichnet sich ebenfalls ein Trend zur Erhöhung des Lungengewichtes im Vergleich zu den Tieren mit TK-transduzierter EPC-Zelltherapie ohne Gancyclovir ab. Illustration der Ergebnisse in Abbildung 3.26.

Neben einer verblindeten visuellen Infarktbestimmung nach Entnahme des Herzens in toto wurde im Versuch AMI-3 die Infarktgröße auch histologisch an Hand von Schnitten bestimmt. Hierbei zeigte sich sowohl in der visuellen als auch histologischen Infarktgrößenbestimmung eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nach EPC-Therapie im Vergleich zu Tieren ohne Zelltherapie. Nach Gancyclovirgabe an Tag 12-14 oder 21-23 bei Tieren mit TK-EPC-Therapie zeigte sich eine signifikante Größenzunahme des Infarktes im Vergleich zu Tieren ohne Gancyclovirgabe.



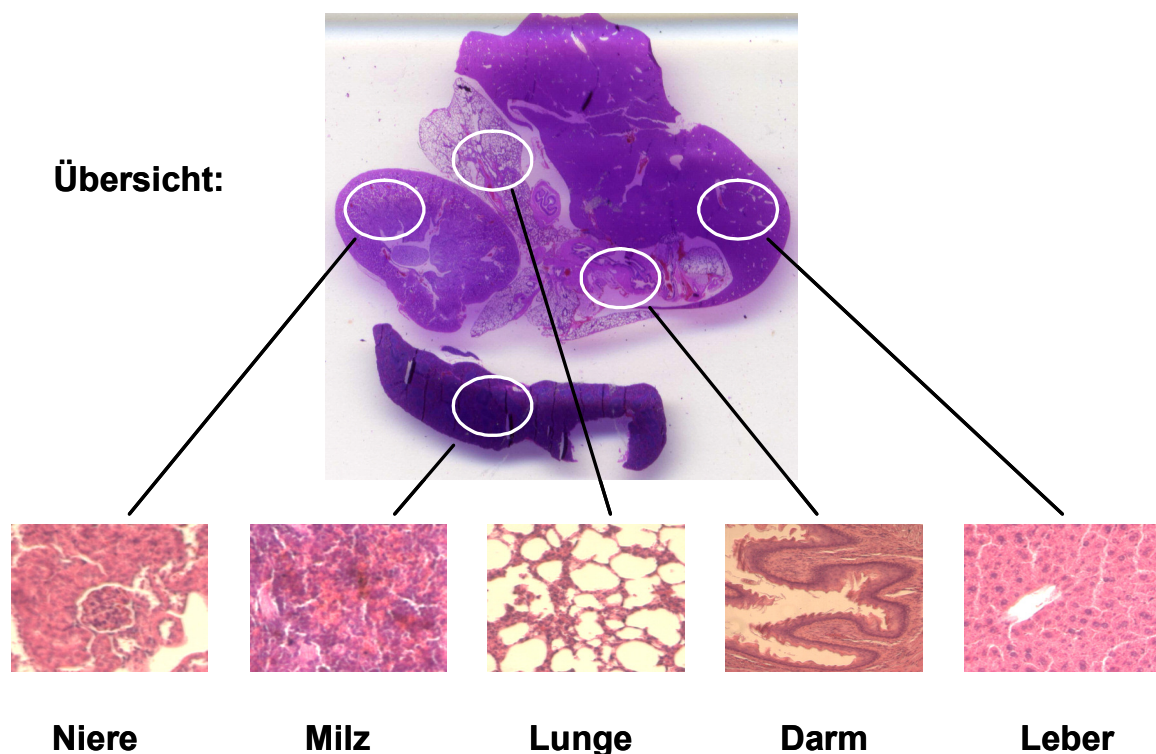
**Abbildung 3.28:** Histologisch bestimmte Infarktgröße in den einzelnen Gruppen nach intravenöser Gabe transduzierter EPC mit teilweiser nachfolgender Gabe von Gancyclovir (GV) sowie representative histologische Bilder aus den einzelnen Gruppen. Anzahl der Tiere: **Sham:** n = 2; **EPC GFP:** n = 3; **EPC TK PBS/PBS:** n = 4; **EPC TK GV/PBS:** n = 8; **EPC PBS/GV:** n = 7; **PBS:** n = 7.

## Ergebnisse

Wir konnten somit im letzten Abschnitt zeigen, dass sich die systemische intravenöse Zelltherapie von EPC nach Myokardinfarkt positiv auf die Herzfunktion auswirkt. Ferner wird auch die Infarktgröße durch die Therapie mit EPC positiv beeinflusst. Durch die Gabe von Gancyclovir und die spezifische Abtötung der TK-transduzierten EPC kam es zu einer Verschlechterung der Herzfunktion und zu einer Größenzunahme des Infarktareals.

### ***3.5.4 Untersuchung auf mögliche Gancyclovir-bedingte Organschäden an den Tieren von Versuch AMI-3***

Um eine unspezifische Wirkung des Gancyclovir auf die Organe der Nacktmaus auszuschließen, wurden die Organe der Tiere aus Versuch AMI-3 daraufhin von einem unabhängigen Pathologen untersucht. Es konnten histologisch keine Schäden an Niere, Milz, Lunge, Darm oder Leber nachgewiesen werden. Abbildung 3.28 zeigt exemplarische Schnitte.

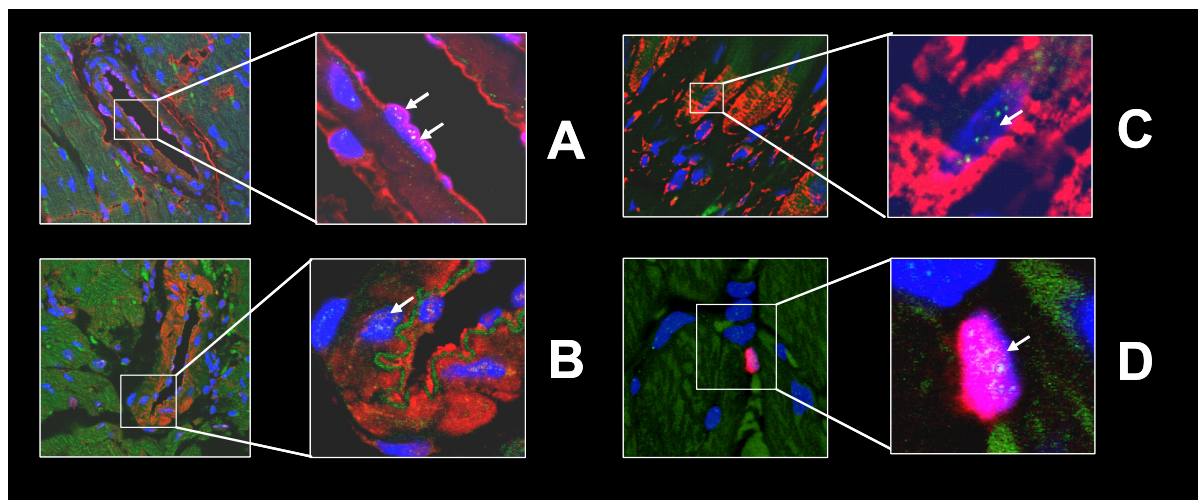


**Abbildung 3.29:** Histologische Aufnahmen muriner Organe nach Gancyclovirbehandlung



## 3.5.5 Nachweis von humanen Zellen im ischämischen Myokard

Zum histologischen Nachweis von humanen Zellen im Myokard nach Infarkt wurden die Herzen immunhistochemisch untersucht. Hierbei konnten humane Zellen mittels ALU-Färbung nachgewiesen werden. Auch ergaben sich Hinweise auf Differenzierung von EPC zu perivaskulären Zellen, endothelartigen Zellen und Kardiomyozyten. In Tieren, die mit TK-transduzierten EPC behandelt wurden, gelang weiterhin der Nachweis von apoptotischen humanen Zellen nach Gancyclovirgabe.



**Abbildung 3.30:** Konfokalmikroskopische Aufnahmen: **A** Nachweis der Differenzierung von EPC in endotheliale Zellen; **B** Nachweis der Differenzierung in perivaskuläre Zellen; **C** Nachweis der Differenzierung in Kardiomyozyten; **D** Nachweis von apoptotischen humanen Zellen nach Gancyclovirgabe. Weißer Pfeil markiert humane Zellen; Blau = Zellkerne; Grüne Punkte im Zellkern = ALU-Färbung gegen humane DNA.

### 3.6 „Aventis-eNOS-enhancer“ (AVE): Ein therapeutischer Ansatz zur Verbesserung der eingeschränkten zelltherapeutischen Funktion von EPC und BMC

In den vorhergehenden Abschnitten konnte die Bedeutung der Zelltherapie verdeutlicht werden. Es wurde jedoch von unserer Arbeitsgruppe und anderen gezeigt, dass die funktionelle Aktivität von EPC und BMC von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie und Diabetes eingeschränkt ist. Ein Grund für die Funktionseinschränkung könnte in einer gestörten Expression der eNOS liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von zwei eNOS-Aktivatoren AVE9488 und AVE70119 versucht, die Funktion der eNOS in Patienten-EPC und -BMC wieder herzustellen. Hierfür wurde die Transkription in vitro mittels RT-PCR bestimmt. In weiterführenden in vivo Experimenten wurde die Bedeutung mit Hilfe des Matrigelmodells und des Herzinfarktmodells untermauert.

#### 3.6.1 Gesteigerte eNOS-Expression nach Inkubation der EPC und BMC mit AVE70119

EPC von gesunden Probanden wurden für 24 Stunden mit AVE in unterschiedlicher Konzentration behandelt. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der eNOS-Expression um bis zu 70%. Zur Kontrolle wurden EPC mit dem AVE-Lösungsmittel DMSO inkubiert.

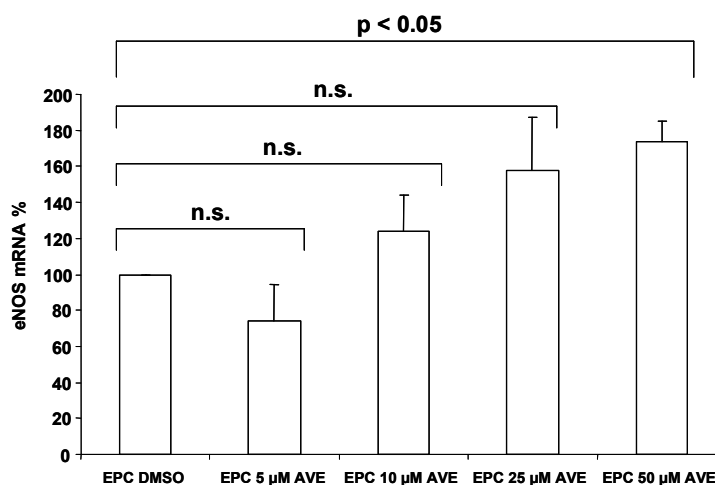
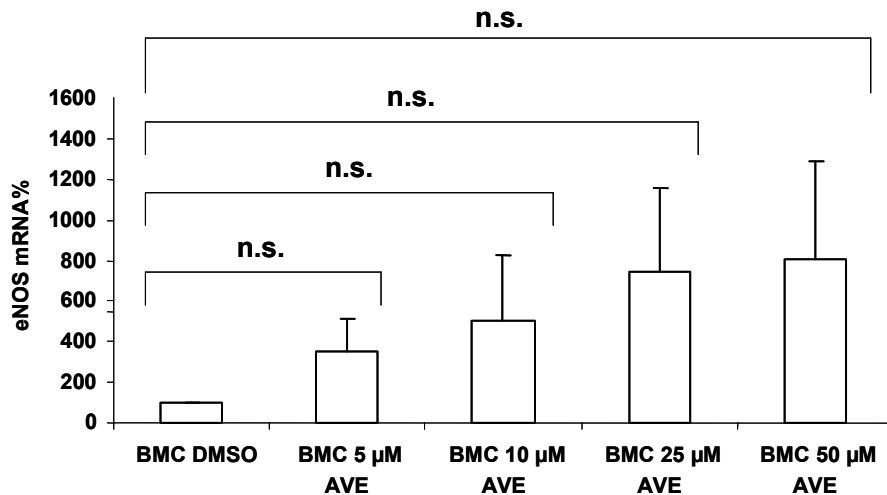


Abbildung 3.31: eNOS-Expression in EPC nach 24-stündiger AVE-Inkubation; n = 3

## Ergebnisse

Ebenfalls wurden BMC von drei Patienten mit KHK mit AVE vorstimuliert. Es zeigte sich auch hier eine eNOS-Expressionserhöhung im Vergleich zu DMSO inkubierten BMC. Diese war jedoch nicht signifikant.

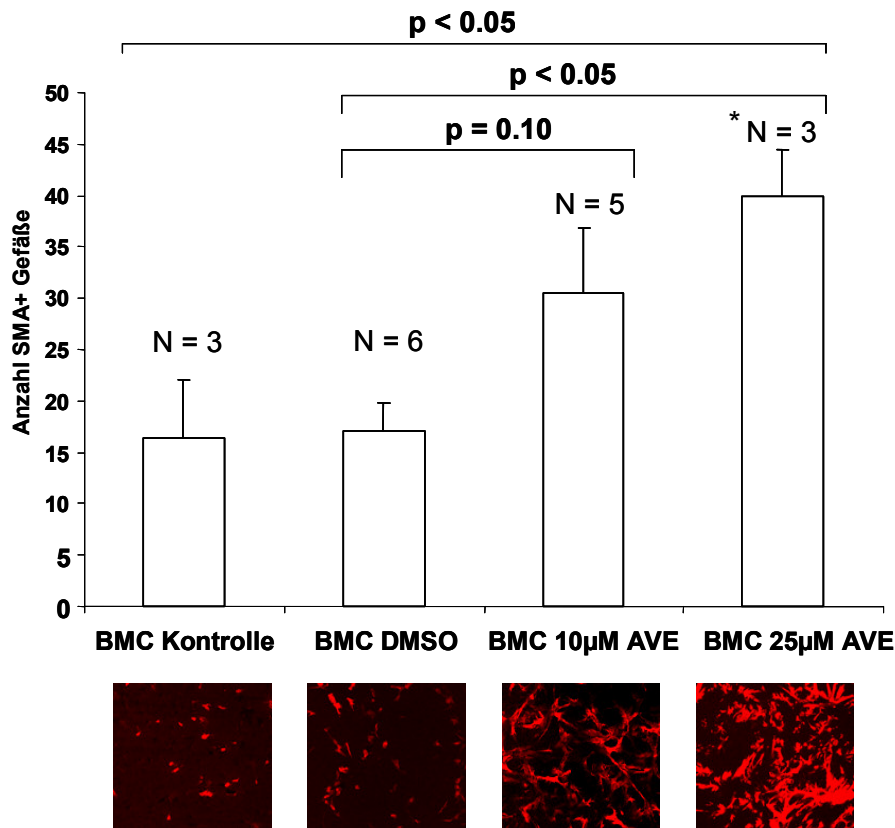


**Abbildung 3.32:** eNOS-Expression in BMC nach 24 stündiger Inkubation mit unterschiedlichen AVE-Konzentrationen; n = 3

### ***3.6.2 Einfluss von AVE70119 auf das Neovaskularisationspotential von Patienten-BMC***

Nachdem in den in vitro Experimenten eine positive Beeinflussung der eNOS-Expression nachgewiesen werden konnte, wurde die Neovaskularisation von unbehandelten BMC und präinkubierten BMC mit dem Lösungsmittel DMSO und AVE70119 in dem bereits beschriebenen Matrigelmodell der Nacktmaus untersucht. Hierbei wurde den Tieren nach subkutaner Injektion des Matrigels  $1 \cdot 10^6$  vorbehandelter BMC intravenös über die V. ophthalmica verabreicht. Die Tiere wurden nach 14 Tagen eingeschläfert und das Matrigel entfernt. Die daraus angefertigten Parafinschnitte wurden immunhistochemisch mittels smooth muscle actin (SMA) Färbung aufgearbeitet. Zur Auswertung wurden fünf Bilder aus einer konfokalmikroskopischen Aufnahme im Randbereich des Matrigels ausgewertet. Als Maß für die Neovaskularisation wurden die SMA-positive Gefäße gezählt und statistisch ausgewertet. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der SMA-positiven Gefäße nach Inkubation mit 25 µM AVE70119 für 24 Stunden verglichen mit DMSO behandelten BMC.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.33:** Signifikante Erhöhung der Kapillardichte durch Präinkubation für 24 Stunden mit 25 µM AVE im Vergleich zu DMSO behandelten BMC. Unter der Graphik befinden sich repräsentative konfokale Aufnahmen aus den jeweiligen Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Vorbehandlung mit AVE 70119 die Neovaskularisation von Patienten BMC signifikant steigern kann.

### ***3.6.3 Einfluss von AVE9488 und AVE70119 im Rahmen der BMC-Zelltherapie im Herzinfarktmodell der Nacktmaus***

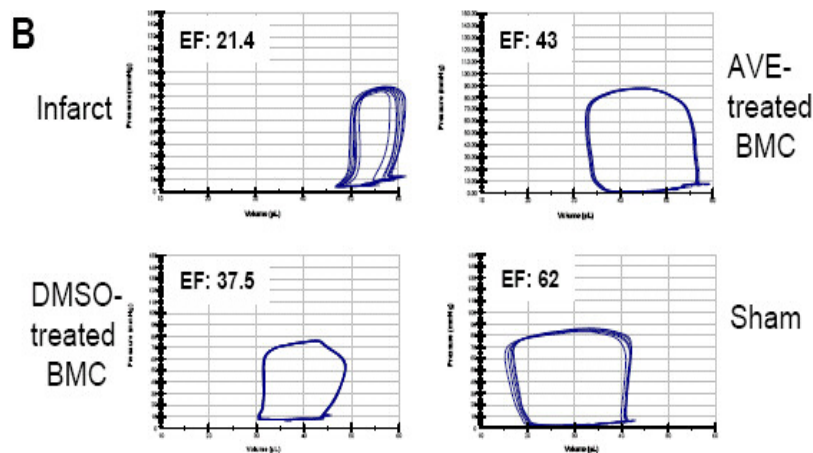
In einem nächsten Schritt sollte ergründet werden, in wieweit eine Vorbehandlung mit den beiden AVE-Substanzen die gestörte Funktion der BMC im Rahmen der Stammzelltherapie bei Herzinfarkt positiv beeinflussen kann. In der ersten Studie wurde die Wirkung der BMC-Vorbehandlung mit AVE 9488 bei intraventrikulärer intraoperativer Injektion getestet. Zur Bestimmung der Herzfunktion wurde in Kooperation mit Sanofi Aventis die Herzfunktion mittels Linksherzkatheters bestimmt. Im Anschluss wurde das Tier getötet, die Infarktgröße visuell bestimmt und das Gewicht des linken und rechten Ventrikels sowie der Lunge erhoben. Das Herz wurde weiterhin feinge-

## Ergebnisse

weblich untersucht. In der zweiten Studie wurden die BMC mit AVE70119 vorbehandelt. Die Zellgabe erfolgte intravenös über die V. ophtalmica. Die funktionellen Herzdaten wurden mittels Echokardiographie gewonnen. Im Anschluss daran erfolgten die Infarktgrößenbestimmung sowie die feingewebliche Untersuchung des Herzens.

### ***3.6.4 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE9488 auf die Herzfunktion nach Stammzelltherapie***

Drei Wochen nach Operation und Ligation der linken Koronararterie und gefolgt intraventrikulärer Stammzelltherapie mit  $1 \cdot 10^6$  BMC wurde die Herzfunktion mittels invasiven Linksherzkatheters untersucht. Es wurden verschiedene Parameter erhoben, von denen die Ejektionsfraktion (EF), das Schlagvolumen, das endsystolische Volumen sowie die Schlagarbeit die wichtigsten Parameter darstellen. Abbildung III.26 zeigt exemplarische Druck-Volumen-Kurven der vier Versuchsgruppen: Tiere mit Infarkt ohne Zelltherapie, Tiere mit Infarkt und Zelltherapie mit AVE inkubierten BMC, Tiere mit Infarkt und Zelltherapie mit Lösungsmittel DMSO inkubierten BMC und Placebo (Sham) operierten Tieren.

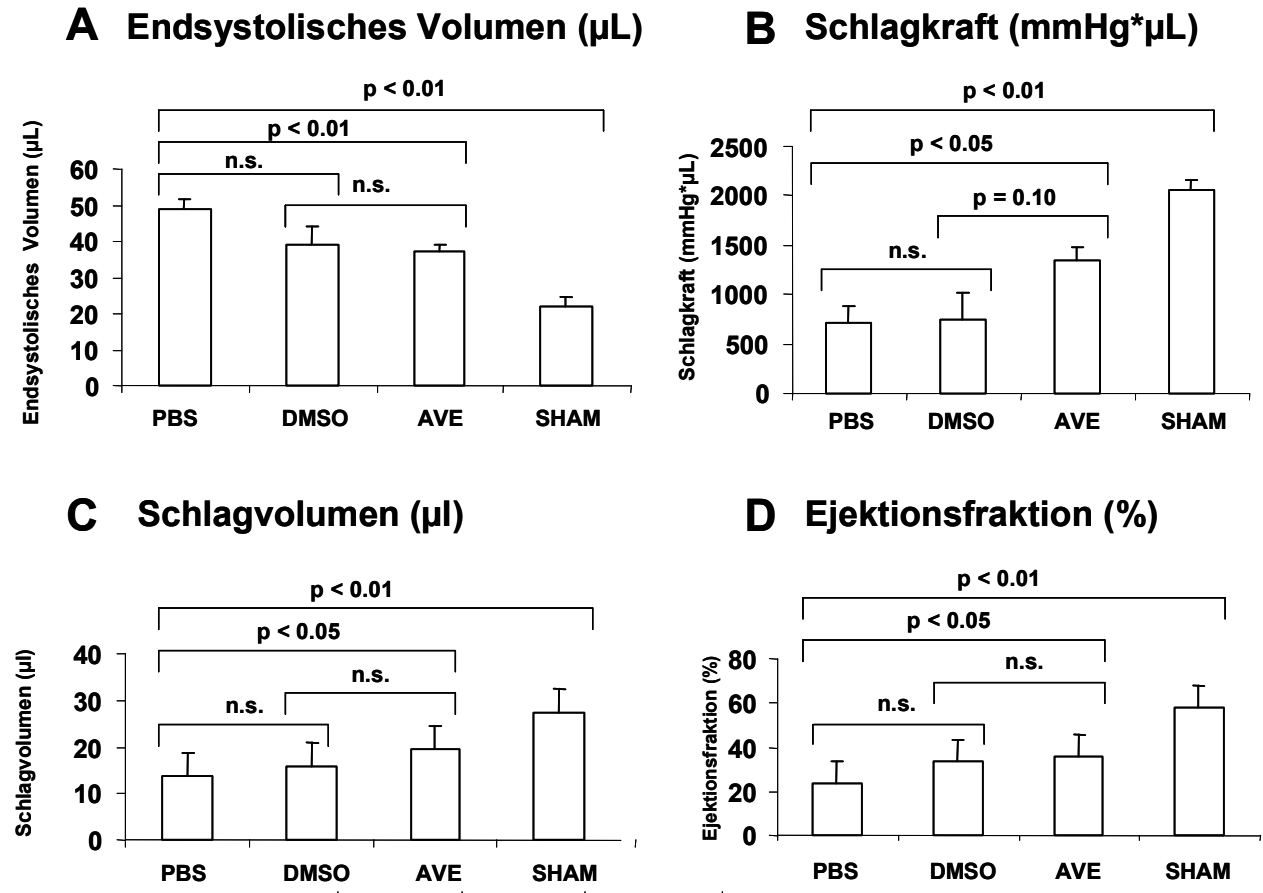


**Abbildung 3.34:** Exemplarische Druckvolumenkurven der einzelnen Versuchsgruppen ermittelt mit Hilfe eines Linksherzkatheters.

Es zeigte sich, dass Tiere mit Stammzelltherapie und Präinkubation der Patienten-BMC mit AVE9488 eine signifikante verbesserte Herzfunktion aufwiesen im Vergleich zu Tieren ohne Stammzelltherapie. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der

## Ergebnisse

Herzfunktion in Tieren ohne Stammzelltherapie im Vergleich zu Tieren mit BMC-Stammzelltherapie, die lediglich in dem Lösungsmittel DMSO inkubiert worden waren.

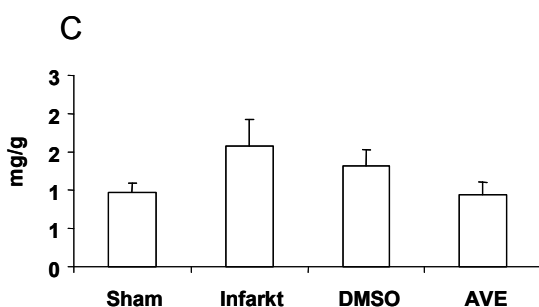
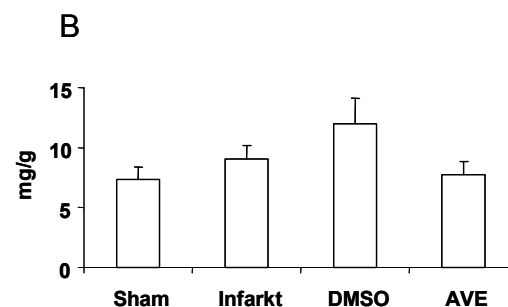
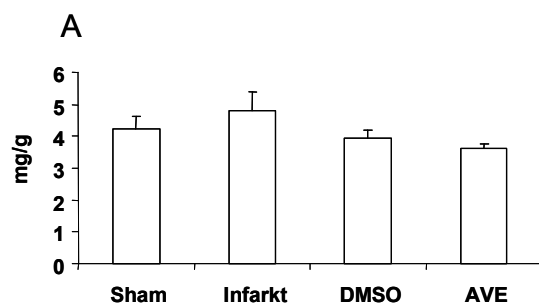


**Abbildung 3.35:** Verbesserte Herzleistung nach Stammzelltherapie und Vorinkubation mit AVE. Ermittelte Parameter: Enddiastolisches Volumen, Schlagkraft, Schlagvolumen und Ejektionsfraktion. Es zeigt sich in allen Parametern eine Verbesserung der Herzleistung in zelltherapierten Tieren nach Vorbehandlung mit AVE im Vergleich zu Tieren ohne Stammzelltherapie. **PBS** = Tiere mit Infarkt und ohne Zelltherapie (n=4); **DMSO** = Tiere mit Infarkt und BMC-Zelltherapie, Vorbehandlung mit Lösungsmittel DMSO (n = 4); **AVE** = Tiere mit Infarkt und BMC-Zelltherapie, Vorbehandlung mit AVE (n= 5); **SHAM** = Tiere ohne Infarkt, pseudooperierte Tiere (n = 4).

## Ergebnisse

### 3.6.5 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE9488 auf das Gewicht der Ventrikel und der Lunge sowie der Infarktgröße

Im Anschluss an die Linksherzkatheteruntersuchung wurden die Tiere getötet, das Gewicht der Ventrikel mit einer Feinwaage bestimmt sowie die Infarktgröße an Hand von horizontalen Schnitten bestimmt. Ein gesteigertes Gewicht des rechten Ventrikels ist ein Zeichen der Rechtsherzhypertrophie, die sich in Folge eines venösen Rückstaus bei eingeschränkter Pumpleistung des linken Ventrikels ausbilden kann. Tiere ohne Zelltherapie wiesen einen schwereren linken und rechten Ventrikel auf als Tiere mit Stammzelltherapie und Vorbehandlung mit AVE9488. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen der Zellgabe von AVE vorbehandelten BMC gegenüber DMSO vorbehandelten BMC gefunden werden.



#### Legende:

Graph A: Gewicht linker Ventrikel/Körpergewicht;

Graph B: Gewicht rechter Ventrikel/Körpergewicht;

Graph C: Gewicht Lunge/Körpergewicht;

**Sham:** Pseudooperierte Tiere, Anzahl der Tiere (n) = 4;

**Infarkt:** Tiere mit Infarkt ohne Zelltherapie, n = 4;

**DMSO:** Tiere mit Infarkt und BMC Zelltherapie, vorbehandelt mit DMSO, n = 4;

**AVE:** Tiere mit Infarkt und BMC Zelltherapie, vorbehandelt mit AVE, n = 6;

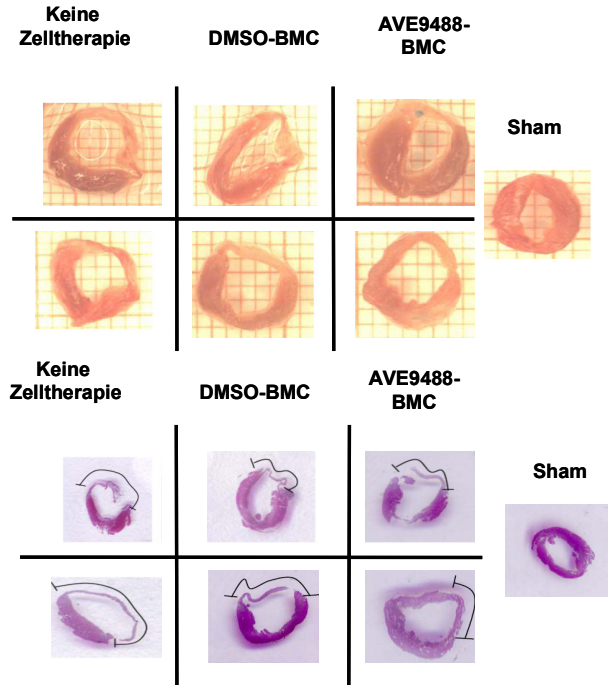
**Keine** signifikanten Ergebnisse in allen Gruppen.

**Abbildung 3.36:** Ermitteltes Körpergewicht, Gewicht von linkem und rechtem Ventrikel sowie der Lunge.

## Ergebnisse

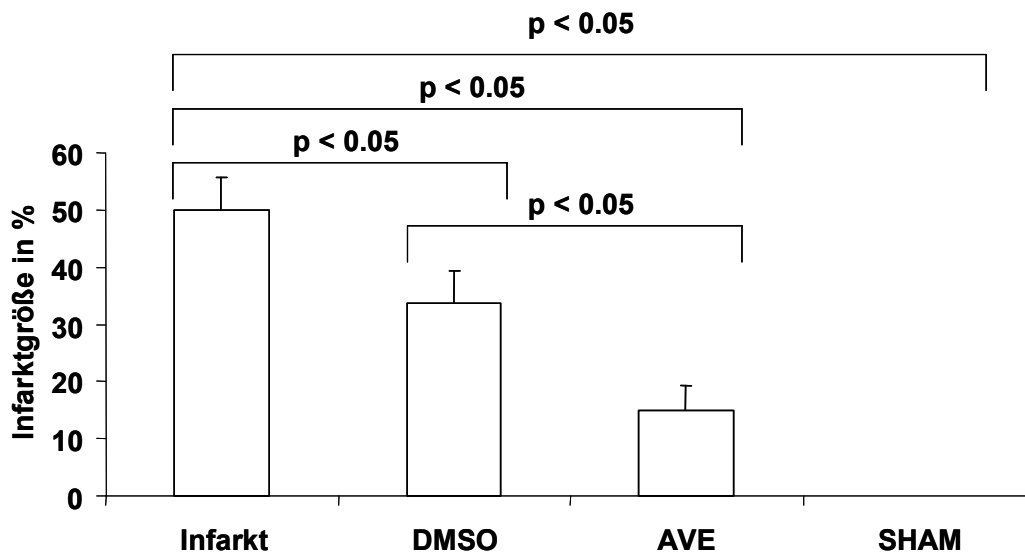
Die Infarktgröße wurde an Hand von 2-3 mm dicker Schnitte bestimmt, die mit Hilfe eine Kryotommessers angefertigt wurden. Angefertigte H.E. Schnitte verifizierten die bestimmte Infarktgröße.

Fotografische Aufnahmen der horizontal geschnittenen Herzen



Eingescannte Aufnahmen der H.E.-Schnitte der Herzen

**Abbildung 3.37:** Ermittlung der Infarktgröße. Es zeigt sich eine kleinere Infarktnarbe nach AVE vorbehandelter BMC-Stammzelltherapie im Vergleich zu unbehandelten Tieren.



**Abbildung 3.38:** Infarktgröße in den einzelnen Gruppen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infarktgröße nach Stammzelltherapie; Infarkt n = 3, DMSO n = 4, AVE = 7, Sham = 4.



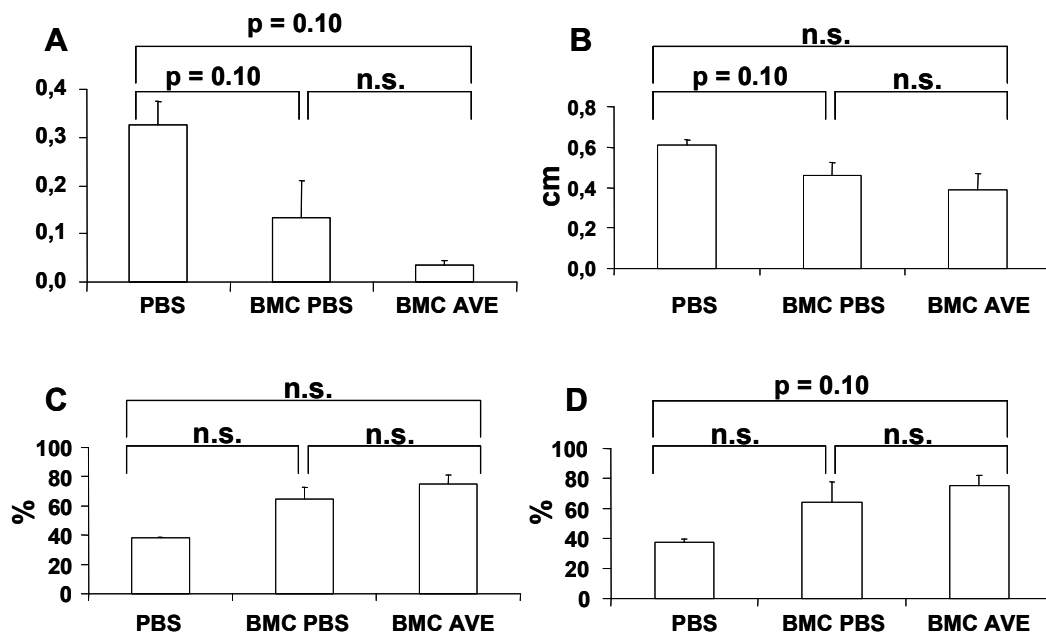
## Ergebnisse

Es zeigte sich, dass die Infarktgröße sowohl in der Gruppe mit DMSO vorbehandelten BMC als auch in der Gruppe mit AVE vorbehandelten BMC signifikant reduziert war im Vergleich zu der Gruppe von Tieren ohne Stammzelltherapie. Die Vorbehandlung mit AVE führte im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO behandelten BMC zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße.

### 3.6.6 Einfluss von BMC-Vorbehandlung mit AVE70119 auf die Herzfunktion nach Stammzelltherapie

In einer Serie aus 10 Tieren wurde die Wirkung von AVE70119 auf die Herzfunktion getestet. Operation und Inkubation der Zellen erfolgte wie bei den Versuchen mit AVE9488. Die Applikation der Zellen erfolgte intravenös am Tag nach der Operation. Die Zellzahl pro Tier betrug  $2 \cdot 10^6$  BMC. Zwei Wochen nach Operation wurde die Herzleistung mittels Echokardiographie bestimmt.

Es zeigte sich auch hier ein Trend zur Verbesserung der Herzfunktion nach Stammzelltherapie. Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 3.39.

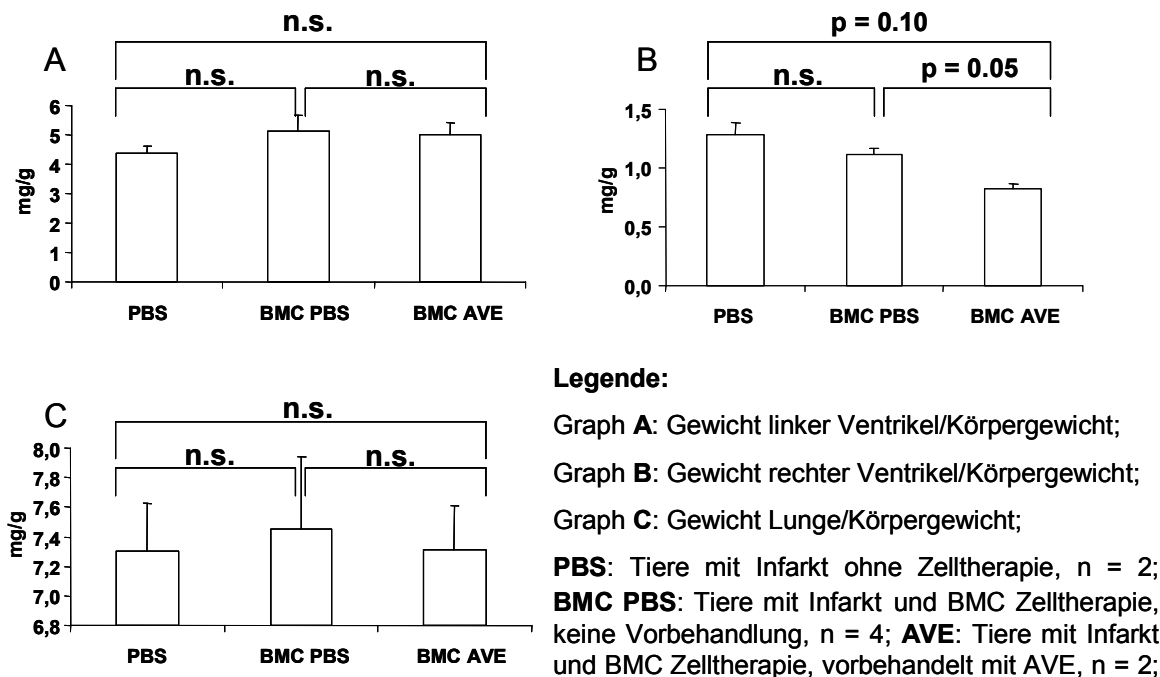


**Abbildung 3.39:** Funktionelle echokardiographische Daten: Graph A: Endsystolisches Volumen (ESV), Graph B: Linksventrikulärer innerer Durchmesser in der Diastole (LVIDd), Graph C: Verkürzungsfraction (FS), Graph D: Ejektionsfraction (EF). **PBS** = Tiere mit Infarkt und ohne Zelltherapie (n = 2); **BMC PBS** = Tiere mit Infarkt und BMC-Zelltherapie (n = 4); **BMC AVE** = Tiere mit Infarkt und BMC-Zelltherapie, Vorbehandlung mit AVE (n = 2).

## Ergebnisse

### 3.6.7 Einfluss von BMC-Präinkubation mit AVE70119 auf das Gewicht der Ventrikel und der Lunge sowie der Infarktgröße

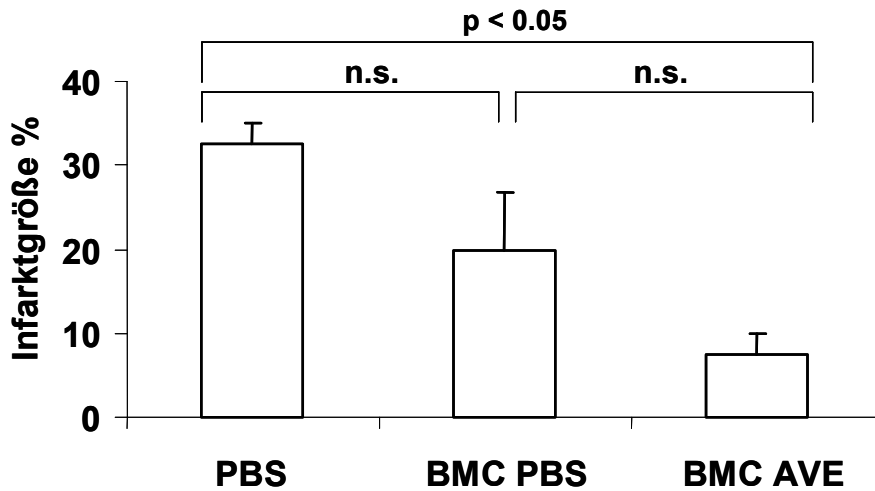
Analog zu den Ergebnissen mit AVE9488 zeigten sich auch hier eine Beeinflussung des Gewichts des rechten Ventrikels nach Vorbehandlung mit AVE9488. Aufgrund der geringen Anzahl der Fälle sind die Ergebnisse jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 3.40:** Ermitteltes Gewicht von linkem und rechtem Ventrikel sowie der Lunge und bestimmte Infarktgröße. PBS = Mäuse nach Infarkt-OP ohne Stammzelltherapie, BMC- = Mäuse nach Infarkt-OP ohne präinkubierte BMC-Stammzelltherapie, AVE = Mäuse nach Infarkt-OP mit AVE präinkubierte BMC

Die Infarktgröße wurde an Hand von 2-3 mm dicker Schnitte bestimmt, die mit Hilfe eine Kryotommessers angefertigt wurden. Abbildung 3.40 zeigt die Ergebnisse. Auf Grund der geringen Anzahl von Tieren zeigt sich lediglich bei den Tieren mit AVE vorbehandelter BMC Injektion eine signifikante Reduktion der Infarktgröße.

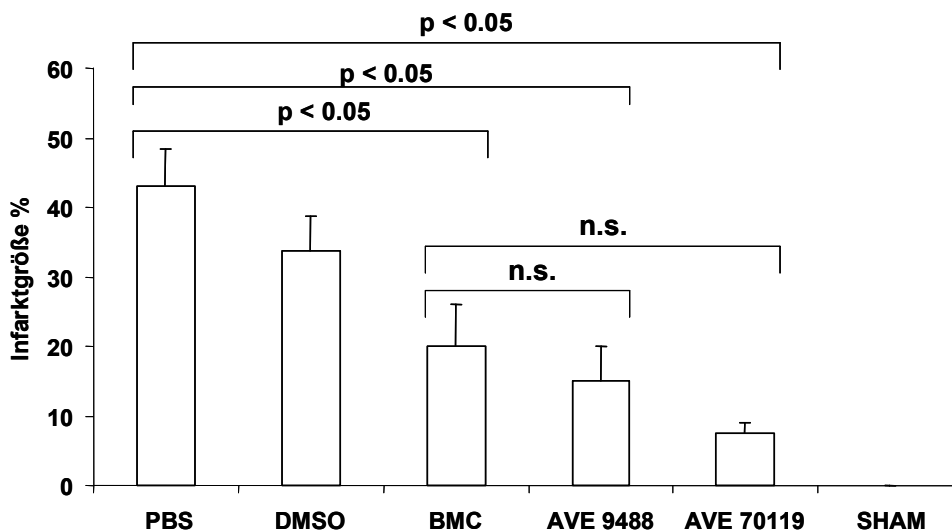
## Ergebnisse



**Abbildung 3.41:** Infarktgröße nach Zelltherapie mit BMC. BMC unvorbehandelt (BMC PBS) oder vorbehandelt mit AVE70119.

### *3.6.8 Vergleich von AVE9488 und AVE70119 an Hand der Infarktgröße*

Zum Vergleich der beiden AVE Substanzen wurden die Infarktdaten gepoolt und graphisch in Abbildung 3.41 dargestellt. Es zeigt sich lediglich der zelltherapeutische Effekt einer BMCTherapie nach Infarkt. Ein Unterschied in den beiden Substanzen konnte nicht gefunden werden.



**Abbildung 3.42:** Infarktgrößen nach systemischer intravenöser Behandlung mit und ohne vorbehandelten BMC

### **4. Diskussion**

Mit Hilfe von drei unterschiedlichen Tiermodellen, dem subkutanen Matrigelmodell, dem Hinterlaufischämiemodell und dem Herzinfarktmodell in der Nacktmaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass EPC im Rahmen der Zelltherapie ein großes kardiovaskuläres Potential besitzen. Besonders die Ergebnisse im Herzinfarktmodell verdeutlichen die positive Wirkung nach Myokardinfarkt auf Herzfunktion, Infarktgröße und Remodeling. Erstmals konnten wir nach Klonierung und Etablierung eines TK-transduzierenden Vektorsystems nachweisen, dass die Wirkung von EPC im zelltherapeutischen Bereich nicht nur auf eine Kurzzeitwirkung beruhen kann, sondern dass langfristige Effekte eine entscheidende Rolle spielen.

#### **4.1 Einsatz von lentiviralen Vektoren in der Erforschung von EPC**

Zur Erforschung der EPC-medierten Neovaskularisation wurde ein lentivirales Vektorsystem in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Es ermöglicht bei hoher Transduktionsrate um 80% die stabile Insertion von Zielgenen in das Genom von EPC. Eine Veränderung des biologischen Verhaltens der Zellen nach Transduktion konnte in „in vitro-“ und „in vivo-Studien“ im Rahmen dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Diese Daten sind kohärent mit den Ergebnissen von anderen Gruppen, die ebenfalls mit genetisch-modifizierten EPC gearbeitet haben (Herder et al., 2003; Ferrari et al., 2003).

Ein Einsatz des lentiviralen Vektorsystems ist die gezielte Markierung von EPC mittels GFP. Bereits nach drei Tagen konnte eine grünliche Fluoreszenz unter dem Mikroskop und im FACS nachgewiesen werden. Eine andere Möglichkeit des etablierten Vektorsystems ist die Einschleusung eines Suizidgens in die Progenitorzellen. Der Einsatz der viralen Thymidinkinase als Suizidgen wurde bereits auf anderen Forschungsfeldern wie der Therapie von Gliomen (Zhang et al., 2007) und der Erforschung von EPC in der Tumorbilogie beschrieben (De Palma et al., 2003). Nach Klonierung von zwei lentiviralen Vektoren (SITKW7 und SETKW8) konnten wir die selektive Abtötung in HUVEC und EPC nach Zugabe von Gancyclovir nachweisen.

Darüber hinaus könnten Lentiviren in der Zukunft eine wichtige Rolle in der gezielten Modifikation und Überexpression von speziellen Genen, die für die Differenzierung

## Diskussion der Ergebnisse

der EPC und die Expression von Wachstumsfaktoren wichtig sind, spielen. Jedoch darf nie aus dem Auge gelassen werden, dass eine lentivirale Modifikation des Genoms das Risiko einer Zellentartung in sich birgt.

### **4.2 Vergleich der drei unterschiedlichen Tiermodellen zur Erforschung der EPC-Zelltherapie**

Zur Erforschung der EPC medierten Wirkung im Rahmen der Zelltherapie haben wir uns drei unterschiedlicher Modelle bedient: Dem nicht-ischämischen Matrigelmodell, dem Hinterlaufischämiemodell sowie dem Infarktmodell bei der Nacktmaus. Hierbei bieten jeweils die einzelnen Modelle Vorteile und beleuchten die einzelnen Mechanismen der Zelltherapie aus unterschiedlichen Blickwinkeln.

Ein nicht-ischämisches Modell zur Erforschung der Vaskularisation und Angiogenese stellt das „in vivo“ Matrigelmodell in der athymischen Nacktmaus dar und wurde von Passanati et al. 1992 beschrieben (Passanati et al., 1992). Die subkutan injizierte, nach Erwärmen auf Körpertemperatur gallertige Masse besteht aus einem Extrakt des Engelbreth-Holm-Swarm Sarkoms der Maus. Es besteht aus den Hauptkomponenten Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat und weiteren Proteoglykanen sowie einer Reihe von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , „fibroblast growth factor“ (FGF) und „tissue plasminogen activator“ (tPA). Somit imitiert es die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran und ist ein häufig verwendetes „in vitro“ Modell um die angiogenetische Aktivität von unterschiedlichen Faktoren zu ermitteln (Nicosia et al., 1990).

Ein ischämisches Modell stellt das Hinterlaufischämiemodell der Maus dar. Dieses Modell imitiert die periphere arterielle Verschlusskrankheit (paVK). Die Krankheit ist gekennzeichnet durch eine hohe Morbidität und Mortalität. Gefäßrekonstruktion mit Bypassen, besonders im Bereich der unteren Extremitäten, führen auf Grund von fortschreitenden arteriosklerotischen Veränderungen oftmals nur zu einer temporären Verbesserung der Erkrankung. Die Gabe von EPC ist auch hier eine neue Therapieoption. Eine positive Wirkung der EPC-Stammzelltherapie konnte bereits von unserer Gruppe (Urbich et al., 2003) und anderen (Kalka et al., 2000; Iwaguro et al., 2002) nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 1.6).

Der Myokardinfarkt durch Gefäßligation in der Maus ist ein Modell zur Erforschung der EPC-vermittelten Zelltherapie im Rahmen des Myokardinfarktes beim Menschen.

## Diskussion der Ergebnisse

Die Gruppe um Johns und Olson beschrieben bereits 1954 den experimentellen Myokardinfarkt durch Ligatur der Koronargefäße bei Mäusen, Ratten, Hamstern und Meerschweinchen, nachdem sie feststellen mussten, dass der Hund für dieses Modell nicht geeignet war (Johns et al., 1954). 1997 modifizierten YE et al. die Operationsmethode um die Mortalität zu verringern und die Inzidenz der Infarkte zu erhöhen. Mehrere Punkte wurden abgewandelt: Unter anderem verzichteten sie auf die Vorlagerung des Herzens aus dem Thorax, entfernten die Luft aus dem Thorax vor dessen Verschluss und reicherten die Atemluft der Tiere während der Operation mit Sauerstoff an (Ye et al., 1997). In dieser Arbeit wurden die dort beschriebenen Modifikationen angewendet. Eine Herausforderung stellt jedoch die Größe der Nacktmaus dar, die die Operation und die anschließenden Echomessungen schwierig gestalten. Da für unsere Untersuchungen humane Progenitorzellen verwendet wurden, konnten in allen drei Modellen nur Tieren als Empfänger dienen, die eine angeborene Immunsuppression besitzen, um eine Abstoßung der transplantierten Zellen durch das Immunsystem zu vermeiden. Die athymische Nacktmaus erfüllt diese Voraussetzungen. Auch von Ratten gibt es eine immunsupprimierte Variante, jedoch scheint die Ausprägung des Immundefektes nicht so ausgeprägt wie bei den Nacktmäusen zu sein.

In allen drei Tiermodellen zeigte sich, dass EPC zu einer signifikant gesteigerten funktionellen Verbesserung beitragen. Besondere Bedeutung wurde der Frage geschenkt, in welchem Zeitrahmen der EPC-vermittelte zelltherapeutische Effekt abläuft. Zu diesem Zweck wurde die EPC zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe des bereits beschriebenen TK-Vektorsystems abgetötet. Eine Depletion der EPC konnte sowohl im Kurzzeitexperiment als auch im Langzeitexperiment den positiven Effekt auf die Neovaskularisation teilweise aufheben und führte im Herzinfarktmodell zu einer Verschlechterung der Herzfunktion. Der histologische Nachweis der EPC im Ischämieareal konnte im Modell der Hinterlaufischämie und des Herzinfarktes erbracht werden. Humane Zellen wurden sowohl perivaskulär nachgewiesen, als auch in einer geringen Anzahl integriert und differenziert im Endothel von Gefäßen und in der Herzmuskulatur als differenzierte Kardiomyozyten. Im Matrigelmodell gelang kein Nachweis von humanen Zellen. Dies bedingt jedoch nicht zwangsläufig das Fehlen der EPC im Matrigel. Ein generelles Problem bei immunhistochemischen Färbungen liegt in dem hohen Proteoglykananteil der Matrix, was zu einer hohen unspezifischen Hintergrundfärbung führt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die selektive

## Diskussion der Ergebnisse

Depletion der infundierten EPC zum Zeitpunkt der Zelltherapie eine Neovaskularisierung vollständig verhindert. Eine signifikante Reduktion wurde auch dann beobachtet, wenn die Aktivierung des Suizidgens erst zu einem späteren Zeitpunkt im Langzeitmodell erfolgte.

### **4.3 Zelltherapie im Myokardinfarktmodell in der athymischen Nacktmaus**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Wirkungsmechanismen von endothelialen Progenitorzellen (EPC) im Rahmen des Herzinfarktmodells gelegt. Neben der Messung der Herzfunktion mittels Echokardiographie, Katheter und MRT wurden die entnommenen Herzen histologisch untersucht und die Infarktgröße ermittelt. In diesem Kapitel soll daher gezielt auf das Myokardinfarktmodell der athymischen Nacktmaus eingegangen werden.

#### ***4.3.1 Diskussion der Versuchsdurchführung und Komplikationen beim Myokardinfarkt***

Zur Durchführung der Ischämie am Mäuseherz wurde die linke Koronararterie ligiert. Hierfür wurde unter dem Operationsmikroskop nach Freilegung des Herzens die linke Koronararterie unter dem linken Herzohr aufgesucht und das Gefäß durch Umstechung ligiert ohne den linken Ventrikel zu punktieren. Es wurde darauf geachtet, ein möglichst gleichgroßes ischämisches Areal in allen Tieren zu erzeugen.

Trotz aller Sorgfalt konnte es peri- und postoperativ zu Blutungen kommen. Leichte Verletzungen kleinerer Gefäße oder kleinerer Seitenäste der Koronararterie waren häufig die Ursache für geringe bis mittlere Blutungen. Diese waren durch Kompression gut zu stillen und stellten im weiteren Verlauf kein Problem dar. Hochgradige Blutverluste entstanden durch starke Schädigung der linken Koronararterie oder des linken Herzohrs. Diese Blutungen konnten nicht gestillt werden, weshalb die Tiere intraoperativ verstarben. Weiterhin war eine gehäufte Sterblichkeit infolge des Myokardinfarktes in den ersten 24 Stunden nach OP zu bemerken. Insgesamt ergab sich somit eine Sterblichkeit von 35 - 40 %. In vergleichbaren Untersuchungen zur experimentellen Induktion eines Myokardinfarkts ist in der Literatur eine Sterblichkeit der

## Diskussion der Ergebnisse

Tiere von 33 % angegeben (Johns et al., 1954), so dass die Sterblichkeit der Tiere im Rahmen dieses Projekts als vergleichbar eingestuft werden kann. Respiratorische Probleme konnten bei der Eröffnung des Thorax auftreten, da die Intubation nur mit einer Atmungskanüle ohne Blockierungsballon, wie sie in der Humanmedizin Standard ist und einen 100% Verschluss mit der Trachea sicherstellt, möglich war. Dadurch konnte es zu einem kurzzeitigen Kollabieren von einem Lungenflügel kommen, dem durch Lageveränderung der Kanüle und Erhöhung des Atmungsvolumens begegnet wurde. Zum anderen entstanden Respirationsprobleme nach der Okklusion der Koronararterie. Diese wurden durch eine Lungenstauung (passive Hyperämie) hervorgerufen, bedingt durch eine verminderte linksventrikuläre Funktion. Respiratorische Probleme entstanden dabei durch einen Rückstau des Blutes aus der linken Herzkammer in die Lungenstrombahn. Arrhythmien der linken Ventrikelwand, die in der postischämischen Phase auftraten, lassen sich auf Überleitungsstörungen des Reizleitungssystems des Herzens, die durch die induzierte Myokardischämie entstanden, zurückführen.

### ***4.3.2 Auswirkung der Zelltherapie und anschließende Depletion der EPC auf die Herzfunktion***

Die Herzfunktion wurde in der hier vorliegenden Arbeit anhand der Echokardiographie und der Magnetresonanztomographie bestimmt. Bei der Echokardiographie wurden zwölf Parameter gemessen, wobei das endsystolische Volumen (ESV) und die Auswurffraktion (Ejection Fraction = EF in %) des linken Ventrikels die wichtigsten Parameter darstellen. Das endsystolische Volumen (ESV) gilt als Maß für die Dilatation des Ventrikels, die durch das Remodeling nach dem Infarkt verursacht wird. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine zunehmende Dilatation des linken Ventrikels mit einer progressiven, globalen kardialen Dysfunktion einhergeht (Gaudron et al., 1993). Zugleich ist das endsystolische Volumen (ESV) der bestimmende Faktor für die Überlebensrate nach überstandenen Myokardinfarkt (White et al., 1987). Es wird zwar einerseits durch die Dilatation des Ventrikels beeinflusst, andererseits korreliert es jedoch auch mit der Größe des Herzens. Diese wiederum richtet sich bei den 8-12 Wochen alten Tieren, die sich noch im Wachstum befinden, nach der Körpergröße. Als Anhaltspunkt für die Körpergröße wurde das Gewicht der



## Diskussion der Ergebnisse

Mäuse ermittelt. Es wurde darauf geachtet, dass die Tiere zum Zeitpunkt der Operation ein vergleichbares Gewicht aufwiesen.

Die Auswurffraktion gibt Auskunft über den Anteil des Blutvolumens, der durch die Kontraktion ausgetrieben wird, am Gesamtblutvolumen der linken Kammer. Er berücksichtigt somit zwei Messgrößen, die sich nach einem Myokardinfarkt verändern: Das Kammervolumen nimmt durch die Dilatation zu und das Schlagvolumen nimmt durch die Beeinträchtigung der Wandfunktion ab (Pfeffer et al., 1990). Je niedriger die EF, desto schlechter ist die Ventrikelfunktion. Die „left ventricular ejection fraction“ (LVEF) ist der Parameter, der am häufigsten in den klinischen Studien, die Vorläuferzellen zur Therapie des Myokardinfarktes einsetzen, zur Einschätzung der Ventrikelfunktion herangezogen wurde (Assmus et al., 2002; Erbs et al., 2005; Janssens et al., 2006; Strauer et al., 2002; Wollert et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Herzfunktion nach intracavitärer und intravenöser EPC-Zelltherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe, die lediglich mit einer salinen Lösung behandelt wurde, signifikant verbesserte. Diese Untersuchungsergebnisse decken sich mit den Daten von Kawamoto (Kawamoto et al., 2001) und Kocher (Kocher et al., 2001), die ebenfalls eine Verbesserung der Herzleistung im Herzinfarktmodell nach Zelltherapie nachweisen konnten. Der zelltherapeutische Effekt war in unserer Untersuchung über den ganzen Versuchszeitraum konstant. Bei Tieren, die mit TK-transduzierten EPC behandelt worden waren, ließ sich die Verbesserung der Herzfunktion nach Zelltherapie durch die Administration von Gancyclovir komplett aufheben. Wichtig war hierbei die Beobachtung, dass sowohl die Gabe von Gancyclovir im Kurzzeitexperiment als auch im Langzeitexperiment zu einer Verschlechterung der Herzleistung führte.

### ***4.3.3 Einsatz der Magnetresonanztomographie bei der Beurteilung EPC-Gabe auf die kardiale Dysfunktion im Mausmodell***

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist der Goldstandard bei der nicht invasiven Beurteilung der kardialen Funktion bei Mensch und Maus. So ist es möglich, mit Hilfe des MRT kontrastreiche Aufnahmen der einzelnen Gewebearten zu machen und eine Reihe von physiologischen Parametern zu ermitteln (Weiss et al., 2001). Weiterhin kann man an Hand der geometrischen Daten des Herzens rechnergestützt die ventrikuläre Masse und Infarktgröße ermitteln (Slawson et al., 1998; Franco et al., 1998; Wiesmann et al., 2000). In einer Reihe von Untersuchungen konnte auch gezeigt werden, dass sich der Schweregrad einer globalen Dysfunktion im Mäusemodell gut mittels MRT beurteilen lässt (Bryant et al., 1998; Jelicks et al., 1999).

In unserer Untersuchung wurde daher bei einem Teil der Tiere (AMI-3-Versuch) die Herzfunktion nicht nur echokardiographisch sondern auch mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) untersucht. Hierbei konnten die echokardiographischen Befunde bestätigt werden. Die linksventrikuläre Funktion wurde durch die Zelltherapie mit EPC signifikant verbessert. Wurden Tiere, die zuvor eine TK-transduzierte Zelltherapie erhalten hatten, in der dritten Woche post OP mit Gancyclovir behandelt, so trat eine signifikante Verschlechterung der Herzleistung auf. Diese war sowohl anhand der funktionellen Herzdaten, als auch im Vierkammerblick des Herzens visuell sichtbar.

### ***4.3.4 Einfluss der Zelltherapie auf die Infarktgröße***

Ein weiterer wichtiger Untersuchungsparameter im Rahmen dieser Arbeit war die Infarktgröße. Hierbei zeigte sich, dass eine Zelltherapie mit EPC zu einer signifikanten Verringerung der Infarktgröße im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe führte. Diese Erkenntnisse decken sich mit Daten von Kawamoto, der ebenfalls eine Verringerung der Infarktgröße nach i.v. EPC-Gabe beschrieben hat (Kawamoto et al., 2001). In den Tieren, die mit TK-transduzierten EPC behandelt worden waren, konnte weiterhin eine signifikante Größenzunahme des Infarktareals festgestellt werden, wenn die Tiere in der dritten oder vierten Woche Gancyclovir erhalten hatten. Bei Tieren nach GFP-transduzierter EPC-Gabe führte die Gancyclovirgabe nicht zu

## Diskussion der Ergebnisse

einer Vergrößerung des Infarktareals, was die selektive Wirkung unseres TK-Vektorsystems unterstreicht.

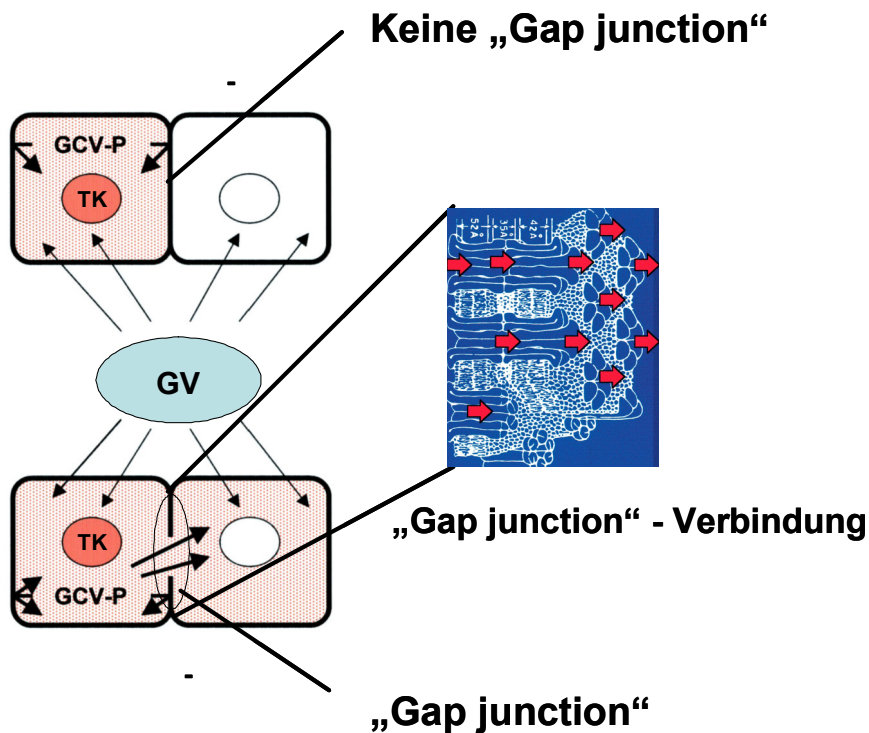
### **4.4 Limitation des TK-transduzierenden Vektorsystems**

Bei dem Einsatz von Medikamenten bei Mensch und Tier muss berücksichtigt werden, dass unspezifische Effekte die Therapie und wissenschaftliche Ergebnisse beeinflussen können. Von Gancyclovir ist bekannt, dass es in höheren Dosen nephrotoxisch wirken kann (Smee et al., 1996). Um eine unspezifische Toxizität der Gancyclovirgabe zu untersuchen, wurden „in vitro“-Kontrollexperimente durchgeführt.

Hierbei zeigte sich in der eingesetzten Dosierung keine unspezifische Beeinflussung in EPC, HUVEC und Kardiomyozyten. Weiterhin wurde in den Tierexperimenten ein Teil der Tiere mit GFP-transduzierten EPC als Kontrollgruppe und anschließender Gancyclovirgabe behandelt. Auch hier konnte ein unspezifischer Einfluss des Gancyclovir ausgeschlossen werden. Bei einem Teil der Tiere wurden nach Beendigung der Experimente die Organe Herz, Lunge, Milz, Leber, Dünndarm und Niere zur histologischen Begutachtung durch einen unabhängigen Pathologen entnommen. In Formalin fixierten, HE-gefärbten Paraffinschnitten wurden keine mikroskopischen Veränderungen an den Organen festgestellt. Somit konnte die Gabe von Gancyclovir als harmlos eingestuft werden. Dies wird auch von anderen Gruppen bestätigt (Nishihara et al., 1997; Kawashita et al., 1999).

Beim Einsatz der viralen Thymidinkinase und anschließender Gancyclovirgabe im Rahmen der Tumorgentherapie wurde weiterhin ein sogenannter „Bystander-Effekt“ auf untransduzierte Zellen beobachtet. Hierbei kam es bei Gancyclovirgabe auch zum Absterben von nichttransduzierter Zellen im Umfeld von transduzierter Tumorzellen nach Gancyclovirgabe. Der „Bystander-Effekt“ beruht auf der Fähigkeit von Gancyclovir-Triphosphat, durch die virale Thymidinkinase aus dem „Prodrug“ Gancyclovir phosphoryliert worden ist, über Gap-Junctions in benachbarte Zellen zu gelangen und somit auch dort einen zytotoxischen Effekt entfalten zu können. Beim Verlassen der Zelle in den interstitiellen Raum wird Gancyclovir-Triphosphat dagegen schnell von körpereigenen Phosphatasen in Gancyclovir zurückgeführt und damit inaktiviert.

**Kein Bystander Effekt**



**Bystander Effekt**

**Abbildung 4.1:** Bystander Effekt: Gancyclovir (GV) wird von allen Zellen aufgenommen, jedoch nur in den TK-transduzierten Zellen (roter Zellkern, TK) aktiviert. Aktiviertes Gancyclovir (GCV-P) wird durch die Ausbildung von Gap junction von den transduzierten Zellen in untransduzierte Zellen transportiert und wirkt auch dort toxisch über Hemmung der zelleigenen Polymerasen. Apoptotische Zelle: Rosa Cytoplasma.

Neben dem „Bystander-Effekt“ ist eine immunologische Antwort auf die absterbenden Zellen möglich. Es konnte im Rahmen von tumorbiologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Therapie mit der viralen Thymidinkinase und anderen Sui- zidgenen neben dem direkten zytotoxischen Effekt unter bestimmten Umständen auch eine systemische Immunreaktion gegen das behandelte Tumorgewebe auslö- sen kann (St. Clair et al., 1987; Balzarini et al., 1993; Moolten et al., 1986; Ezzeddine

## Diskussion der Ergebnisse

et al., 1991). Ein solcher immunmodulatorischer Effekt wäre im Rahmen der Tumortherapie mit Suizidgenen sehr wünschenswert, um die antitumorale Wirkung der Suizidgene zu verstärken. Für die Induktion einer Immunreaktion scheint es wichtig zu sein, dass die behandelten Zellen durch Nekrose absterben und nicht durch Apoptose zu Grunde gehen (Keller et al., 1981). Beim Einsatz von athymischen Nacktmäusen wurde eine nur eingeschränkte immunologische Antwort auf den „Bystander Effekt“ gefunden (Colombo et al., 1995). Diese eingeschränkte spezifische zelluläre Aktivität lässt sich durch das Fehlen von T-Zellen in den athymischen Nacktmäusen erklären.

Ein direkter Einfluss des Bystander Effekt auf die Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich nicht komplett ausschließen. Es wurden jedoch keine typischen Zeichen wie hämorrhagischen Infarzierungen in den drei Tiermodellen gefunden, die ein Hinweis für einen abgelaufenen „Bystander Effekt“ sein könnten (Ram et al., 1994). Das Versuchsdesign aller „in vivo-Versuche“ beinhaltete den Einsatz von athymischen Nacktmäusen, was ebenfalls eine immunologische Antwort sehr unwahrscheinlich macht. Weitere Versuche sind jedoch nötig, um zu einem abschließenden Ergebnis zu kommen. Der Nachweis eines vorhandenen „Bystander Effekt“ würde zumindest beweisen, dass die im Rahmen der Zelltherapie infundierten TK-transduzierten Zellen funktionelle „Gap-junktion“-Verbindungen mit den umliegenden Zellen eingegangen sind.

### **4.5 Biologische Wirkung von EPC im Rahmen der Zelltherapie**

In der hier vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von drei Tiermodellen die positive Wirkung einer EPC-Zelltherapie aufgezeigt werden. Bereits in anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass EPC zu einer gesteigerten Neovaskularisation beitragen. Hierbei spielt die Sekretion von proangiogenetischen Wachstumsfaktoren eine große Rolle, die mature Endothelzellen zur Teilung und Migration anregen (Rehman et al., 2003; Urbich et al., 2005). Weiterhin konnten EPC perivaskulär und in Kapillaren integriert nachgewiesen werden (Kawamoto et al., 2003). Die Inkorporationsrate in sich neu bildenden Kapillaren wird zwischen 2-29% angegeben und scheint von der Isolationsart der endothelialen Progenitorzellen, Applikationszeitpunkt und Applikationsform stark abzuhängen (Urbich et al., 2004).

## Diskussion der Ergebnisse

Ein weiterer Wirkmechanismus der EPC-Zelltherapie könnte auf einem zytoprotektiven Effekt beruhen. Durch die Sekretion von parakrinen Faktoren könnten EPC die gesteigerte Apoptoserate von Myozyten im Infarkttrandbereich senken und durch eine Akquirierung von gewebeständigen Stammzellen den endogenen Reparaturmechanismus aktivieren (Urbich et al., 2005; Gnecci et al., 2005; Uemura et al., 2006). In einer kürzlich erschienen Arbeit konnten weiterhin Myozyten nach allogener mesenchymaler Stammzelltherapie nachgewiesen werden, die eine Aktivierung ihres Zellzyklus erfahren hatten. Eine direkte Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen konnte ausgeschlossen werden, so dass eine Aktivierung von ortsständigen Stammzellen im Herzen durch die mesenchymalen Stammzellen als sehr wahrscheinlich erscheint (Mazhari et al., 2007). Eine Aktivierung der kardialen Stammzellen „in vitro“ durch lösliche Faktoren von EPC konnte bereits in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden (Urbich et al., 2005).

Die stammzelltherapeutische Wirkung könnte weiterhin auch auf einem antiinflammatorischen Effekt beruhen. Im Rahmen des Heilungsprozesses nach Myokardinfarkt durchläuft das Herz einen natürlichen Entzündungsprozess. Dieser kann zu Umbauprozessen im Herzen führen, dem so genannten Remodeling, welches die Herzfunktion einschränkt und in der Ausbildung einer Herzinsuffizienz münden kann. Nach Applikation von mesenchymalen Stammzellen konnte eine Runterregulation von Zytokinen wie TNF-alpha, IL-1beta und IL-6 nachgewiesen werden, die am Remodeling des Herzens beteiligt sind (Le Blanc et al., 2006). In verschiedenen Arbeiten wurde auch eine Reduktion der Fibrose durch Stammzelltherapie nachgewiesen (Kocher et al., 2001; Kawamoto et al., 2003). Der genaue Wirkungsmechanismus, der zu einer Verringerung der Fibrose führt, ist jedoch unklar. Alleine durch eine Reduktion der Apoptoserate der Myozyten könnte der Vorgang der Fibrosierung der Herzmuskulatur eingeschränkt werden. Es gibt jedoch zumindest bei mesenchymalen Stammzellen Anzeichen, dass sie auch primär die Fibrosierung durch die Sekretion von Zytokinen über eine Hemmung der Fibroblastenproliferation und einer Reduktion der Kollagensynthese beeinflussen können (Ohnishi et al., 2007).

Eine Differenzierung von EPC in Kardiomyozyten wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Orlic et al., 2001; Murry et al., 2004). Die Inkorporations- und Differenzierungsrate der Zellen im Rahmen der EPC-Stammzelltherapie scheint jedoch nur sehr gering zu sein (< 0,1%). Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen (ES) scheinen adulte Stammzellen spezifische Stimuli zu benötigen, um in Kardiomyozyten zu diffe-

## Diskussion der Ergebnisse

renzieren. Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung stützt die Theorie, dass eine Differenzierung von adulten Stammzellen in Kardiomyozyten nur im Rahmen einer endogenen Reparatur myokardialer Schädigung im Säugetierorganismus erfolgen kann (Hsieh et al., 2007).

Somit könnte die Wirkung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) im Rahmen der Stammzelltherapie auf verschiedenen Mechanismen beruhen:

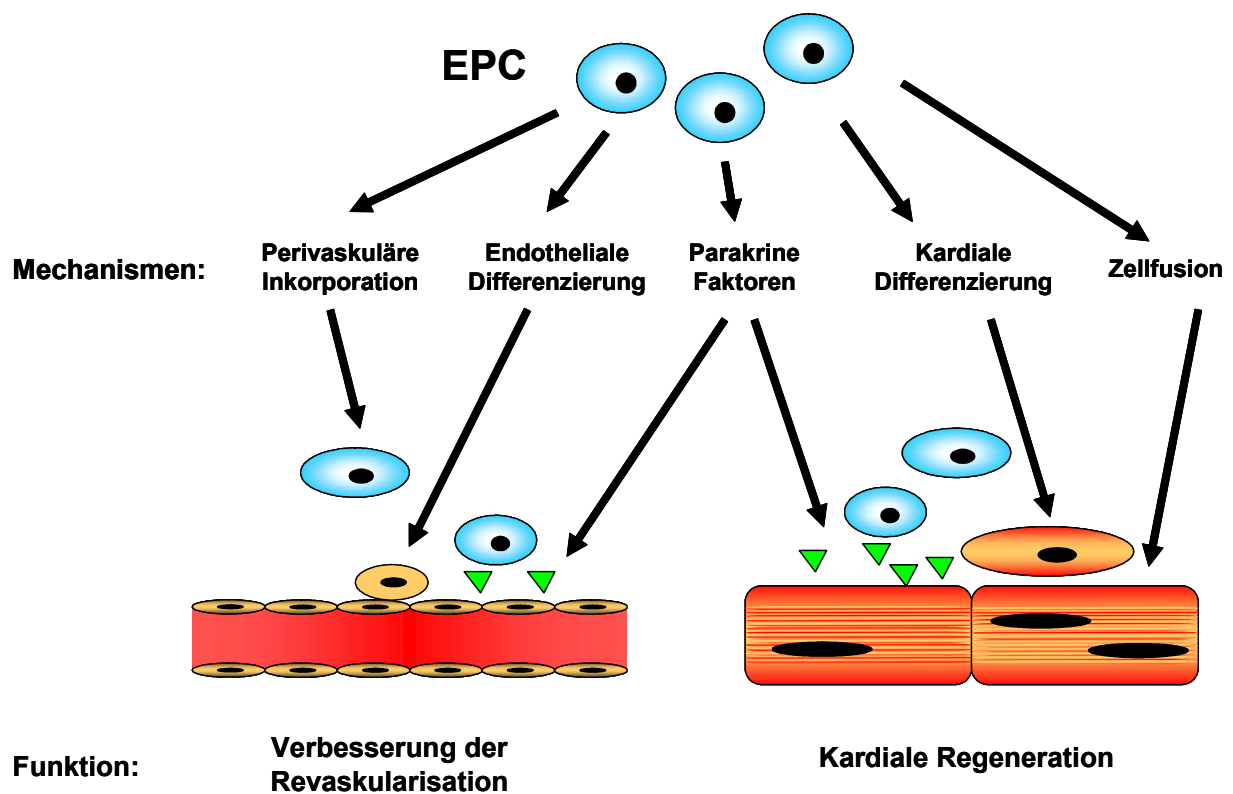
- Parakrine Effekte, die zu
  - einer gesteigerten Angiogenese
  - einer reduzierten Apoptoserate
  - einer Reduktion der Entzündung im Myokard
  - einer Aktivierung von gewebeständigen Stammzellen
  - positiven Beeinflussung des Remodeling führen.
- Differenzierung in Endothelzellen
- Differenzierung in Kardiomyozyten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass sich die Wirkung der EPC nicht nur mit einer Kurzzeitwirkung, zu denen die Aktivierung der Angiogenese und die Verhinderung der Apoptose von Myozyten gehören, erklären lassen. Nach Depletion der EPC im Langzeitversuch waren starke Effekte auf Neovaskularisation, Infarktgröße und Herzfunktion nachweisbar. Eine Möglichkeit für die Erklärung der Langzeiteffekte wäre die Differenzierung von EPC in Kardiomyozyten und Endothelzellen oder die Fusion von EPC mit Kardiomyozyten. Der Vorgang der Differenzierung konnte in dieser Arbeit tatsächlich beobachtet werden. Jedoch macht die geringe Anzahl der differenzierten Zellen im Myokard ( $< 0,1\%$ ) es für sehr unwahrscheinlich, dass dadurch alleine die Langzeiteffekte erklärt werden können. Vielmehr lässt sich vermuten, dass die Langzeiteffekte auf eine Beeinflussung des Remodeling des Herzens zurückzuführen sind. Auch wäre es denkbar, dass durch eine Zelltherapie mit EPC die Phase der endogenen Regeneration durch gewebeständige Stammzellen verlängert und aufrechterhalten wird.

Ein nicht auszuschließender artifizieller, aber in dieser Arbeit nicht offensichtlich beobachteter Faktor könnte im „Bystander-Effekt“ Tk-transduzierter Zellen liegen. Er würde dazu führen, die Wirkung der EPC im Langzeitverlauf durch Mitbeeinflussung des umliegenden Gewebes wie Myokard oder Endothel überzubewerten. Ein vor-

## Diskussion der Ergebnisse

handener „Bystander-Effekt“ würde jedoch die Integration der EPC in das umliegende Gewebe und die Ausbildung von „Gap junction“ nachweisen, was an sich auch einen Erkenntniszuwachs bedeutet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erstmalig sowohl ein Kurzzeiteffekt als auch ein Langzeiteffekt der EPC-basierten Zelltherapie nachgewiesen werden konnten. Um genauere Aussagen über den Langzeiteffekt machen zu können sind weitere Untersuchungen vonnöten. Abbildung 4.2 demonstriert noch einmal die möglichen Mechanismen im Rahmen der Stammzelltherapie mit endothelialen Progenitorzellen (EPC).



**Abbildung 4.2:** Mögliche Mechanismen der kardialen Regeneration im Rahmen der Stammzelltherapie mit endothelialen Progenitorzellen



### **4.6 Beeinflussung der Stammzellfunktion durch die eNOS-Aktivität**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, in Übereinklang mit anderen Gruppen, bestätigt werden, dass die Stammzelltherapie mit Progenitorzellen die Neovaskularisation, die Herzfunktion und das Remodeling nach Herzinfarkt entscheidend verbessern kann. Jedoch gerade die Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK), ischämischer Kardiomyopathie (ICMP) und Diabetes, die eine hohe Prävalenz für das Auftreten eines Herzinfarktes oder einer „Peripheren arteriellen Verschlusskrankheit“ (PAVK) haben, weisen mononukleäre Knochenmarksstammzellen (BMC) und endotheliale Progenitorzellen (EPC) mit einer eingeschränkten funktionellen Aktivität auf (Vasa et al., 2001; Tepper et al., 2002; Heeschen et al., 2004). Eine eingeschränkte NO-Bioverfügbarkeit ist wiederum ein Kennzeichen für Patienten mit Arteriosklerose (Zeiher et al., 1993). In verschiedenen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass NO ein Schlüsselglied für endotheliales Wachstum (Ziche et al., 1994), Migration (Murohara et al., 1999) und vaskuläres Remodeling (Rudic et al., 1998) und Angiogenese (Murohara et al., 1998) darstellt. Aus diesem Grunde lag es nahe, die Expression der eNOS durch Präinkubation mit einem eNOS-Enhancer zu steigern.

Wir konnten zeigen, dass der Einsatz eines eNOS-Enhancer die Expression von eNOS in EPC signifikant erhöht. Weiterhin zeigte sich im „in vivo Matrigel“-Modell eine signifikante Steigerung der Neovaskularisation nach der Vorbehandlung von Patienten-BMC mit AVE im Vergleich zu unbehandelten BMC des gleichen Patienten. Im Herzinfarktmodell führte die Vorbehandlung mit AVE zu einer signifikanten Verbesserung der Herzleistung und zu einer Reduktion der Infarktgröße nach Vorbehandlung der BMC im Vergleich zu nicht behandelten BMC. Somit könnte eine Vorbehandlung von BMC und EPC bei Patienten mit eingeschränkter eNOS-Aktivität den Benefit einer Zelltherapie erheblich steigern.

### 5. Zusammenfassung

Entscheidend für die Sauerstoffversorgung im ischämischen Gewebe ist die Bildung von Blutgefäßen. Dieser Vorgang findet im erwachsenen Organismus in Form von Arteriogenese, Angiogenese und Vaskulogenese statt. Die Entdeckung, dass endotheliale Progenitorzellen (EPC) aus dem Knochenmark mobilisiert werden können, um sich im Ischämiegebiet an der Bildung neuer Kapillaren zu beteiligen, eröffnet einen vollkommen neuen therapeutischen Ansatz. In der hier vorliegenden Arbeit konnte in drei unterschiedlichen Tiermodellen, dem Matrigelmodell, dem Hinterlaufischämiemodell und dem Infarktmodell der Nacktmaus gezeigt werden, dass eine Zelltherapie mit EPC die Neovaskularisation steigert und zu einer myokardialen Funktionsverbesserung beiträgt.

Der entscheidende Beitrag der Arbeit liegt jedoch in der Erforschung des Zeitraums der Wirkung der Stammzelltherapie. In allen drei Tiermodellen konnte durch ein spezifisches Abtöten der mit der viralen Thymidinkinase (TK) transduzierten EPC der positive Effekt auf die Neovaskularisation gestoppt werden. Im Herzinfarktmodell der Nacktmaus kam es sogar zu einer signifikanten Verschlechterung der Herzfunktion sowie zu einer Vergrößerung des Infarktareals. Dieser Effekt war durch Apoptose der Zellen in der dritten und vierten Woche nach Infarkt und Zellinfusion zu beobachten. Somit besitzen EPC nicht nur eine Rolle in der initialen Freisetzung von Zytokinen, sondern tragen auch langfristig zur Aufrechterhaltung des zelltherapeutischen Effektes bei. Ob hierfür allein der Mechanismus der Differenzierung verantwortlich ist, bleibt in weiteren Untersuchungen abzuklären. Denkbar wäre auch eine Beeinflussung des Remodeling über parakrine Langzeiteffekte.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde versucht, das eingeschränkte zelltherapeutische Potential von Progenitorzellen von Patienten mit „Koronarer Herzkrankheit“ (KHK) und ischämischer Kardiomyopathie mit Hilfe zweier eNOS-Transkriptionsverstärker, „eNOS-enhancer“, zu verbessern. Im Matrigelmodell der Maus konnten wir eine Verbesserung des Neovaskularisationspotentials von Knochenmarkszellen (BMC) von Patienten nach Präinkubation mit dem eNOS-enhancer nachweisen. Auch im Myokardinfarktmodell der Maus konnten eine Verbesserung der Herzfunktion und eine Reduktion der Infarktgröße beobachtet werden. Beim direkten Vergleich der beiden eNOS-enhancer konnte kein Unterschied gefunden werden.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend leistet die hier vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis für die Bedeutung von Progenitorzellen im Rahmen der Stammzelltherapie nach Myokardinfarkt. Ferner wurde die Möglichkeit aufgezeigt, durch gezielte Beeinflussung der Progenitorzellen ihr therapeutisches Potential signifikant zu steigern.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

### Nukleotide

dNTP	Desoxynukleotid – Triphosphat
ATP	Adenosin – Triphosphat
CTP	Cytidin – Triphosphat
GTP	Guanosin – Triphosphat
TTP	Thymidin – Triphosphat
A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanidin
T	Tymidin

### Sonstige Abkürzungen

°	Grad
%	Prozent
A	Ampere
AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ad	auf
AMI	Anteriorer Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
AVE	Aventis-eNOS-enhancer
Bp	Basenpaar(e)
BMC	bone marrow cell
BSA	Rinderserumalbumin
Bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid

## Abkürzungsverzeichnis

dest.	destilliert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s modiefied Eagle`s Medium
EBM	Basales Endothelzellmedium
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
ES	Embryonale Stammzellen
et al.	und andere
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsorter
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gan	Gancyclovir
GV	Gancyclovir
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
hEGF	humaner Endothelzellenwachstumsfaktoren
H <sub>2</sub> O	Wasser
HUVEC	Humane endotheliale venöse Zellen
kg	Kilogramm
kb	Kilobasen
KCl	Kalziumchlorid
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
$\lambda$	Wellenlänge
l	Liter
m	Meter oder Milli
M	Molar
$\mu$	Mikro
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
max.	maximal

## Abkürzungsverzeichnis

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mind.	mindestens
ml	Milliliter
n	Nano oder Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minuten
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sonst.	Sonstige
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TK	Thymidinkinase
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
usw.	und so weiter
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
W	Watt
z.B.	zum Beispiel

## 7 Literatur

Aicher, A., Zeiher AM, Dimmeler S. (2005). "Mobilizing endothelial progenitor cells." Hypertension. **45(3)**: 321-5.

Asahara, T., Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**: 964-7

Asahara, T., Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res. **85(3)**. 221-8.

Assmus, B., Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, Grünwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)." Circulation. **106(24)**. 3009-17.

Badorff, C., Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. (2003). "Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes." Circulation. **107(7)** (1024-32).

Baig, M., Mahon N, McKenna WJ, Caforio AL, Bonow RO, Francis GS, Gheorghide M. and (1998). "The pathophysiology of advanced heart failure." Am Heart J. **135**: 216-30.

Balzarini, J., Bohman C, De Clercq E. (1993). "Differential mechanism of cytostatic effect of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine, 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine, and other antiherpetic drugs on tumor cells transfected by the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1 or type 2." J Biol Chem. **268(9)**: 6332-7.

## Literatur

Beltrami, A., Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." Cell **114(6)** 763-76.

Black, F., Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, Schneider MD. (1991). "The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load." J Clin Invest. **88(5)**: 1581-8.

Bogen, D., Rabinowitz SA, Needleman A, McMahon TA, Abelmann WH. (1980). "An analysis of the mechanical disadvantage of myocardial infarction in the canine left ventricle." Circ Res. **47(5)**: 728-41.

Bonello, L., Fourcade L, Com O, Quilici J, Bonnet JL. (2006). "Myocardial infarction during post-abortion DIC." Arch Mal Coeur Vaiss. **99**: 178-82.

Breisch, E., White FC, Bloor CM. (1984). "Myocardial characteristics of pressure overload hypertrophy. A structural and functional study." Lab Invest. **51(3)**: 333-42.

Briest, W., Hölzl A, Ressler B, Deten A, Baba HA, Zimmer HG. (2003). "Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodeling of rat hearts." Cardiovasc Res. **57(2)**: 379-87.

Brilla, C., Maisch B, Weber KT. (1993). "Renin-angiotensin system and myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease: in vivo and in vitro studies on collagen matrix regulation." Clin Investig. **71**: 35-41.

Bryant, D., Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. (1998). "Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha." Circulation. **97(14)**: 1375-81.

Butcher, E. (1991). "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity." Cell **67(6)**: 1033-6.



## Literatur

Cannon, R. (1987). "Myocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy." Z Kardiol. **76**: 101-4.

Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med. **6(4)**: 389-95.

Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med. **9(6)**: 653-60.

Cohn, J. (1998). "Arteries, myocardium, blood pressure and cardiovascular risk: towards a revised definition of hypertension." J Hypertens. **16**: 2117-24.

Colombo, B., Benedetti S, Ottolenghi S, Mora M, Pollo B, Poli G, Finocchiaro G. (1995). "The "bystander effect": association of U-87 cell death with ganciclovir-mediated apoptosis of nearby cells and lack of effect in athymic mice." Hum Gene Ther. **6(6)**: 763-72.

Conway, E., Collen D, Carmeliet P., (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res. **49(3)**: 507-21.

De Palma, M., Venneri MA, Roca C, Naldini L. (2003). "Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells." Nat Med. **9(6)**: 789-95.

Dernbach, E., Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. (2004). "Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress." Blood. **104(12)**: 3591-7.

Dimmeler, S., Zeiher, A. M., (2004). "Stammzelltherapie in der Kardiologie - Stand und Perspektiven." Uni-Med Verlag Ag.

Dimmeler, S., Zeiher AM, Schneider MD. (2005). "Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair." J Clin Invest. **115(3)**: 572-83.

## Literatur

Erbs, S., Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, Emmrich F, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Schuler G, Hambrecht R. (2005). "Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study." Circ Res. **97(8)**: 756-62.

Erdmann, E. (2004). "Myocardial regeneration after myocardial infarction--the speculation continues." Dtsch Med Wochenschr **129(9)**: 423.

Erlebacher, J., Weiss JL, Eaton LW, Kallman C, Weisfeldt ML, Bulkley BH. and (1982). "Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study." Am J Cardiol. **49(5)**: 1120-6.

Ezzeddine, Z., Martuza RL, Platika D, Short MP, Malick A, Choi B, Breakefield XO. (1991). "Selective killing of glioma cells in culture and in vivo by retrovirus transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase gene." New Biol. **3(6)**. 608-14.

Fernandez-Aviles, F., San Roman JA, Garcia-Frade J, Fernandez ME, Penarrubia MJ, de la Fuente L, Gomez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernandez J, Gutierrez O, Sanchez PL, Hernandez C, Sanz R, Garcia-Sancho J, Sanchez A. (2004). "Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction." Circ Res. **95(7)**. 742-8.

Ferrari, N., Glod J, Lee J, Kobiler D, Fine HA. (2003). "Bone marrow-derived, endothelial progenitor-like cells as angiogenesis-selective gene-targeting vectors." Gene Ther. **10(8)**. 647-56.

Franco, F., Dubois SK, Peshock RM, Shohet RV. (1998). "Magnetic resonance imaging accurately estimates LV mass in a transgenic mouse model of cardiac hypertrophy." Am J Physiol. **274**: 679-83.

Freedman, S., Isner JM. (2002). "Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease." Ann Intern Med. **136(1)**: 54-71.

## Literatur

Fuchs, M., Drexler H. (2000). "Pathophysiology of chronic heart failure." Internist **41**: 93-104.

Furchgott, R., Zawadzki JV (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **27**: 373-6.

Gaudron, P., Eilles C, Kugler I, Ertl G (1993). "Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors." Circulation. **87(3)**: 755-63.

Gnecchi, M., He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. (2005). "Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells." Nat Med. **11(4)**: 367-8.

Gomez-Navarro, J., Contreras JL, Arafat W, Jiang XL, Krisky D, Oligino T, Marconi P, Hubbard B, Glorioso JC, Curiel DT, Thomas JM. (2000). "Genetically modified CD34+ cells as cellular vehicles for gene delivery into areas of angiogenesis in a rhesus model." Gene Ther. **7(1)**: 43-52.

Goodell, M., Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. (1996). "Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo." J Exp Med. **183(4)**: 1797-806. .

Grant, M., May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." Nat Med. **8(6)**. 607-12.

Griese, D., Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. (2003). "Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy." Circulation. **108(21)**: 2710-5.

## Literatur

Gulati, R., Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. (2003). "Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood." Circ Res. **93(11)**: 1023-5.

Hartwell, D., Wagner DD. (1999). "New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins." Thromb Haemost. **82(2)**: 850-7.

Heeschen, C., Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, Mildner-Rihm C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. (2003). "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." Blood. **102(4)**: 1340-6.

Heeschen, C., Lehmann R, Honold J, Assmus B, Aicher A, Walter DH, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. (2004). "Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease." Circulation. **109(13)**. 1615-22.

Henry, T. (1999). "Therapeutic angiogenesis." BMJ. **318(7197)**: 1536-9.

Herder, C., Tonn T, Oostendorp R, Becker S, Keller U, Peschel C, Grez M, Seifried E. (2003). "Sustained expansion and transgene expression of coagulation factor VIII-transduced cord blood-derived endothelial progenitor cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol. **23(12)**: 2266-72.

Ho, K., Anderson KM, Kannel WB, Grossman W, Levy D. (1993). "Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects." Circulation. **88(1)**: 107-15.

Hoppe, U., Böhm M, Dietz R, Hanrath P, Kroemer HK, Osterspey A, Schmaltz AA, Erdmann E; (2005). "Guidelines for therapy of chronic heart failure." Z Kardiol. **94(8)**: 488-509.

Hsieh, P., Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, Robbins J, Lee RT. (2007). "Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury." Nat Med. **13(8)**. 970-4.

## Literatur

Hu, W., Pathak VK. (2000). "Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy." Pharmacol Rev. **52(4)**: 493-511.

Hur, J., Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. (2004). "Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol. **24(2)**: 288-93.

Hutchins, G., Bulkley BH. (1978 ). "Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction." Am J Cardiol. **41(7)**: 1127-32.

Ivanova, N., Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR, (2002). "A stem cell molecular signature." Science. **298(5593)**: 601-4.

Iwaguro, H., Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. (2002). "Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration." Circulation. **105(6)**: 672-4

Jackson, K., Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest. **107(11)**: 1395-402.

Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med. **9**: 685-93.

Janssens, S., Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. (2006). "Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial." Lancet. **367(9505)**. 113-21.

## Literatur

Jelicks, L., Shirani J, Wittner M, Chandra M, Weiss LM, Factor SM, Bekirov I, Braunstein VL, Chan J, Huang H, Tanowitz HB. (1999). "Application of cardiac gated magnetic resonance imaging in murine Chagas' disease." Am J Trop Med Hyg. **61(2)**: 207-14

Johns, T., Olson BJ. (1954). "Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals." Ann Surg. **140(5)**. 675-82.

Jugdutt, B., Michorowski BL. (1987). "Role of infarct expansion in rupture of the ventricular septum after acute myocardial infarction: a two-dimensional echocardiographic study." Clin Cardiol. **10(11)**: 641-52.

Kalka, C., Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. (2000). "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A. **97(7)** 3422-7.

Katz, A. (1990). "Is heart failure an abnormality of myocardial cell growth?" Cardiology. **77(5)**: 346-56.

Kawamoto, A., Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." Circulation. **103(5)**. 634-7.

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(3)**: 461-8.

Kawashita, Y., Ohtsuru A, Kaneda Y, Nagayama Y, Kawazoe Y, Eguchi S, Kuroda H, Fujioka H, Ito M, Kanematsu T, Yamashita S. (1999). "Regression of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo by radiosensitizing suicide gene therapy under the inducible and spatial control of radiation." Hum Gene Ther. **10(9)**: 1509-19.

## Literatur

Keller, P., Fyfe JA, Beauchamp L, Lubbers CM, Furman PA, Schaeffer HJ, Elion GB. (1981). "Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities." Biochem Pharmacol. **30(22)**: 3071-7.

Kocher, A., Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. (2001). "Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function." Nat Med. **7(4)**. 430-6.

Kong, K., Ren J, Kraus M, Finklestein SP, Brown RH Jr. (2004). "Human umbilical cord blood cells differentiate into muscle in sjl muscular dystrophy mice." Stem Cells. **22(6)**: 981-93.

Laugwitz, KL., Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. (2005). "Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages." Nature. **433(7026)** :647-53.

Le Blanc, K., Ringden O. (2006). "Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation." Curr Opin Immunol. **18(5)**. 586-91.

Lin, Y., Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. (2000). "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood." J Clin Invest. **105(1)**: 71-7.

Linzbach, A. (1956). "Longitudinal growth of myocardial fibers and their nuclei in relation to heart dilatation." Virchows Arch. **328(2)**: 165-81.

Lip, G. Y. H., K. K. Ray, M. F. Shiu (1998). "Coronary spasm in acute myocardial infarction " Heart **80**: 197-199

Losordo, D., Dimmeler S. (2004). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease." Circulation. **109(21)**: 2487-91.

## Literatur

Lunde, K., Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. (2006). "Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction." N Engl J Med. **355(12)**. 1199-209.

Makino, S., Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest. **103(5)**: 697-705.

Masuda, H., Asahara T. (2003). "Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration." Cardiovasc Res. **58(2)**. 390-8.

Mazhari, R., Hare JM. (2007). "Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche." Nat Clin Pract Cardiovasc Med. **4 (1)**. 21-6.

Moolten, F. (1986). "Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy." Cancer Res. **46(10)**: 5276-81.

Morrison, S., Shah NM, Anderson DJ. (1997). "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell. **88(3)**: 287-98.

Mulvany, M. (1992). "Determinants of vascular structure." J Cardiovasc Pharmacol. **19**: 1-6.

Murohara, T., Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. (1998). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin." Circulation. **97(1)**. 99-107.

Murohara, T., Witzenbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. (1999). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol. **19(5)**. 1156-61. .



## Literatur

Murohara, T., Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. (2000). "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization." J Clin Invest. **105(11)**. 1527-36.

Murry, C., Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. (2004). "Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts." Nature. **428(6983)**. 607-8.

Nakagami, H., Jensen KS, Liao JK. (2003). "A novel pleiotropic effect of statins: prevention of cardiac hypertrophy by cholesterol-independent mechanisms." Ann Med. **35(6)**: 398-403.

Naldini, L. (1998). "Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells." Curr Opin Biotechnol. **9(5)**: 457-63.

Naviaux, R., Verma IM. (1992). "Retroviral vectors for persistent expression in vivo." Curr Opin Biotechnol. **3(5)**: 540-7.

Nicosia, R., Ottinetti A. (1990). "Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot." In Vitro Cell Dev Biol. **26(2)**: 119-28.

Nishihara, E., Nagayama Y, Mawatari F, Tanaka K, Namba H, Niwa M, Yamashita S. (1997). "Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo." Endocrinology. **138(11)**: 4577-83.

Nishikawa, M., Huang L. (2001). "Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer." Hum Gene Ther. **12(8)**: 861-70.

Oh, H., Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. (2003). "Cardiac pro-

## Literatur

genitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction." Proc Natl Acad Sci U S A. **100(21)**: 12313-8.

Ohnishi, S., Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. (2007). "Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions." FEBS Lett. **581(21)**. 3961-6.

Olivetti, G., Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Di Loreto C, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. (1997). "Apoptosis in the failing human heart." N Engl J Med. **336(16)**: 1131-41.

Orlic, D., Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium." Nature. **410(6829)**. 701-5.

Orlic, D., Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A. **98(18)**: 10344-9.

Pannell, D., Ellis J. (2001). "Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors." Rev Med Virol. **11(4)**: 205-17.

Park, S., Koh KK, Kim JH, Yoon KH, Chung WJ, Kang WC. (2007). "Myocardial infarction with huge mural thrombus due to spontaneous coronary artery dissection detected by 64-multidetector computed tomography." Int J Cardiol. **Epub ahead of print.**

Passaniti, A., Isaacs JT, Haney JA, Adler SW, Cujdik TJ, Long PV, Kleinman HK. (1992). "Stimulation of human prostatic carcinoma tumor growth in athymic mice and control of migration in culture by extracellular matrix." Int J Cancer. **51(2)**: 318-24.

Peichev, M., Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulat-

## Literatur

ing human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood. **95(3)**. 952-8.

Pfeffer, M., Braunwald E. (1990). "Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications." Circulation. **81(4)**: 1161-72.

Pittenger, M., Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**: 143-7.

Ram, Z., Walbridge S, Shawker T, Culver KW, Blaese RM, Oldfield EH. (1994). "The effect of thymidine kinase transduction and ganciclovir therapy on tumor vasculature and growth of 9L gliomas in rats." J Neurosurg. **81(2)**. 256-60.

Ramalho-Santos, M., Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. (2002). "'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells." Science. **298(5593)**: 597-600.

Rehman, J., Li J, Orschell CM, March KL. (2003). "Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors." Circulation. **107(8)**. 1164-9.

Reyes, M., Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. (2002). "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." J Clin Invest. **109(3)**: 337-46.

Riede, U. N., Werner, M., Schäfer H.-E. (2003). "Allgemeine und spezielle Pathologie." Thieme.

Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature. **386(6626)**: 671-4.

Ritter, T., Lehmann M, Volk HD. (2002). "Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors." BioDrugs. **16(1)**: 3-10.

## Literatur

Rudic, R., Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. (1998). "Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling." J Clin Invest. **101(4)**. 731-6.

Sadoshima, J., Izumo S. (1993). "Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype." Circ Res. **73(3)**: 413-23.

Salven, P., Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. (2003). "VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells." Blood. **101(1)**. 168-72.

Santoni, d. S. F., Cascio P, Zingale A, Gasparini M, Naldini L. (2006). "Proteasome activity restricts lentiviral gene transfer into hematopoietic stem cells and is down-regulated by cytokines that enhance transduction." Blood. **107(11)**: 4257-65.

Schächinger, V., Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM; REPAIR-AMI Investigator. (2006). "Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction." N Engl J Med. **355(12)**. 1210-21.

Schächinger, V., Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. (2004). "Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial." J Am Coll Cardiol. **44(8)**. 1690-9.

Schlaich, M., Kaye DM, Lambert E, Sommerville M, Socratous F, Esler MD. (2003). "Relation between cardiac sympathetic activity and hypertensive left ventricular hypertrophy." Circulation. **08(5)**: 560-5.

Schuster, E., Bulkley B (1979). "Expansion of transmural myocardial infarction: a pathophysiologic factor in cardiac rupture." Circulation. **60(7)**: 1532-8.

## Literatur

Schütz, W. (2001). "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie." Urban & Fischer-Verlag

Seeger, F., Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. (2007). "Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction." Eur Heart J. **28(6)**: 766-72.

Selwyn, A. P., E. Braunwald (2005). "Harrison's Principles of Internal Medicine." McGraw-Hill.

Shalaby, F., Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature. **376**: 62-6.

Siwik, D., Colucci WS. (2004). "Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium." Heart Fail Rev. **9(1)**: 43-51.

Slawson, S., Roman BB, Williams DS, Koretsky AP. (1998). "Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart." Magn Reson Med. **39(6)**: 980-7.

Smee, D., Sidwell RW, Barnett BB. (1996). "Combination of antiviral immunotoxin and ganciclovir or cidofovir for the treatment of murine cytomegalovirus infections." Antiviral Res. **32(3)**: 165-71.

St Clair, M., Lambe CU, Furman PA. (1987). "Inhibition by ganciclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information." Antimicrob Agents Chemother. **31(6)**: 844-9.

Strauer, B., Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. (2001). "Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction." Dtsch Med Wochenschr. **126(34-35)**. 932-8.

## Literatur

Strauer, B., Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Werner P. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans." Circulation. **106(15)**. 1913-8.

Swynghedauw, B. (1999). "Molecular mechanisms of myocardial remodeling." Physiol Rev. **79**: 215-62.

Takahashi, T., Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med. **5(4)**: 434-8.

Tan, L., Jalil JE, Pick R, Janicki JS, Weber KT. (1991). "Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II." Circ Res. **69(5)**: 1185-95.

Tepper, O., Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. (2002). "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." Circulation. **106(22)**. 2781-6.

Thews, G., Mutschler E, Vaupel P (2007). "Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Uemura, R., Xu M, Ahmad N, Ashraf M. (2006). "Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling." Circ Res. **98(11)**: 1414-21.

Urbich, C., Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S. (2003). "Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells." Circulation. **108(20)**: 2511-6.

Urbich, C., Dimmeler S., (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res. **95(4)**: 343-53.

## Literatur

Urbich, C., Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, Vajkoczy P, Hofmann WK, Peters C, Pennacchio LA, Abolmaali ND, Chavakis E, Reinheckel T, Zeiher AM, Dimmeler S. (2005). "Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization." Nat Med. **11(2)**: 206-13.

Urbich, C., Knau A, Fichtlscherer S, Walter DH, Brühl T, Potente M, Hofmann WK, de Vos S, Zeiher AM, Dimmeler S. (2005). "FOXO-dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells." FASEB J. **19(8)**: 974-6.

Urbich, C., Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. (2005). "Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells." J Mol Cell Cardiol. **39(5)**. 733-42.

Vasa, M., Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. (2001). "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." Circ Res. **89(1)**. 1-7.

Walter, D., Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. (2002). "Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Circulation **105(25)**: 2937-8.

Weiss, R. (2001). "Imaging the murine cardiovascular system with magnetic resonance." Circ Res. **88(6)**: 550-1.

Werner, N., Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. (2003). "Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury." Circ Res. **93(2)**. 17-24.

## Literatur

Werner, N., Nickenig G, (2004). "Vascular progenitor cells and atherogenesis. Regression and regeneration using bone marrow?" Dtsch Med Wochenschr. **129(22)**: 1269-75.

White, H., Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. (1987). "Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction." Circulation. **76(1)**: 44-51.

Wiesmann, F., Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S. (2000). "Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol. **278(2)**: 652-7.

Wollert, K., Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. (2004). "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial." Lancet. **364(9429)**: 141-8.

Wollert, K., Drexler H. (2005). "Clinical applications of stem cells for the heart." 96(2) **151-63.**

Yamamoto, K., Mano T, Yoshida J, Sakata Y, Nishikawa N, Nishio M, Ohtani T, Hori M, Miwa T, Masuyama T. (2005). "ACE inhibitor and angiotensin II type 1 receptor blocker differently regulate ventricular fibrosis in hypertensive diastolic heart failure." J Hypertens. **23(2)**: 393-400.

Yao, E., Yu Y, Fukuda N. (2006). "Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases." Curr Pharm Biotechnol. **7(2)**: 101-8.

Ye, J., Yang L, Sethi R, Copps J, Ramjiawan B, Summers R, Deslauriers R. (1997). "A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality." Mol Cell Biochem. **176(1-2)**. 227-33.



## Literatur

Zeiber, A., Drexler H, Saurbier B, Just H. (1993). "Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension." J Clin Invest. **92(2)**. 652-62.

Zhang, Y., Wang CW, Wang ZG, Ma DX, Pan S, Zhu SG, Li F, Wang B. (2007). "Construction of double suicide genes system controlled by MDR1 promoter with targeted expression in drug-resistant glioma cells." Neurooncol. **2007** **Epub ahead of print.**

Zhang, Z., Zhang L, Jiang Q, Chopp M. (2002). "Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse." Circ Res. **90(3)**. 284-8.

Ziche, M., Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, Ledda F. (1994). "Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P." J Clin Invest. **94(5)**. 2036-44.

# Lebenslauf

Name: Dr. med. Dipl. biol. Thomas Ziebart

Wohnort: Am Weinberg 3 55596 Waldböckelheim

Geburt: 16.05.1976, in Bad Kreuznach

Eltern: Adolf und Regina Ziebart, geb. Mysliwietz



Schulische Laufbahn: Abitur im Jahre 1996 an der Alfred-Delp-Schule in Hargesheim

Zivildienst: Rettungsdienst beim Malteser-Hilfsdienst, qualifizierte Ausbildung zum Rettungssanitäter.  
(01.08.1996 – 01.07.1997)

Berufsausbildung: Vom 01.04.1997 bis 01.04.1998 berufsbegleitende Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Deutschen Angestellten Akademie (DAA) in Bad Kreuznach. Im September 2000 Ausbildung zum Lehrretungsassistenten

Studium: Ab dem Wintersemester 1997/98 Studium der Mathematik und Physik auf Lehramt. Ab dem Sommersemester 98 Studium der Medizin, Biologie und Zahnmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Prüfungen:

Ärztliche Vorprüfung im September 2000

1. Staatsexamen im September 2001

2. Staatsexamen im September 2003

3. Staatsexamen im Oktober 2004
  1. amerikanisches Staatsexamen im Mai 2003
- Vordiplom Biologie im Oktober 2003  
Diplomprüfungen Biologie im Februar 2004

Medizinische Promotion: „Stoffwechsellmilieu und Genexpression in Tumoren der menschlichen Mundhöhle“ Prof. Müller Klieser, Institut für Physiologie, Uni Mainz

Arbeitstätigkeit: Seit September 1998 Rettungsassistent für die DRK Rheinhessen Nahe GmbH  
1999 – 2004 Dozent für die Rettungsassistentenausbildung der DAA, Bad Kreuznach  
Seit 2000 mehrfacher Hiwi im Institut für Anatomie und im Institut für Physiologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
April 2005 – Mai 2007 Assistenzarzt in der Kardiologie (Prof. Dr. Zeiher) und MD/PhD-Program unter Frau Prof. Dr. Dimmeler, Molekulare Kardiologie.

Sonstiges: Stipendiat des Deutschen Volkes 2001-2004  
e-fellow-Stipendiat seit Juni 2003-2004

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Erforschung der Mechanismen EPC-medierter Neovaskularisation“ ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das verwendete Schrifttum vollständig erwähnt habe und dass die vorliegende Dissertationsschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Mainz, den 17. Dezember 2007

Dr. Thomas Ziebart