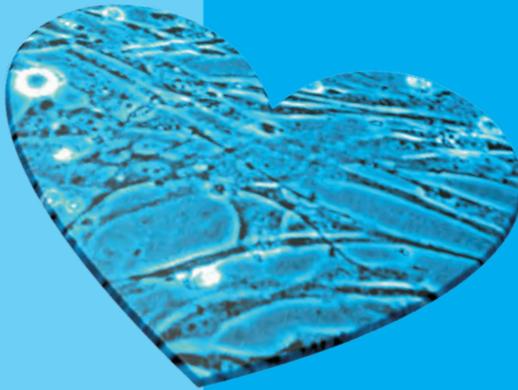


Auswirkungen einer systemischen Hypertonie
auf parakrine Effekte
kardialer Progenitorzellen

Nina-Kristin Krehbiel



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. J. Roth

und

dem Physiologischen Institut
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuerin: PD Dr. S. Wenzel

**Auswirkungen einer systemischen Hypertonie
auf parakrine Effekte
kardialer Progenitorzellen**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Nina-Kristin Krehbiehl

Tierärztin aus Essen

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter/-in: Prof. Dr. J. Roth
PD Dr. S. Wenzel

Tag der Disputation: 22.10.2010

Meiner Familie gewidmet...

*"What we know is a drop, what we don't know is an ocean."
(Sir Isaac Newton)*

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| % vol/vol | Volumenprozent |
| % wt/vol | Gewichtsprozent |
| AA/BAA | Acrylamid/Bisacrylamid |
| a.b. (aqua bidest) | zweifach destilliertes Wasser |
| Abb. | Abbildung |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| AP | Alkalische Phosphatase |
| APS | Ammonium Persulfat |
| Bax | Bcl-2-associated-X-Protein |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| BCIP | 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat |
| β-MHC | beta-myosin heavy chain |
| BFGF | Basic Fibroblast Growth Factor |
| BNP | Brain Natriuretic Peptide |
| bp | Basenpaar |
| BPB | Bromphenolblau |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| °C | Grad Celsius |
| Ca | Calcium |
| cDNA | copy Desoxyribonukleinsäure |
| c-Kit | Rezeptor-Tyrosinkinase |
| c-m | konditioniertes Medium |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPC | Kardiale Progenitorzellen |
| CT-1 | Cardiotrophin-1 |
| Ct-Wert | Cycle-Treshold (Schwellenwert Zyklus) |
| Cy2 | Carbocyanin |
| Cy3 | Indocarbocyanin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| div | Differenz |
| dI/I | relative Zellverkürzung/Zelllänge |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| DTT | Dithiotreitol |
| ECL | Enhanced Chemolumineszenz Reagenz |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| ESC | European Society of Cardiology |
| EtOH | Ethanol |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| fw-primer | forward primer |
| g | Gramm |
| GATA-4 | Zinkfinger-Transkriptionsfaktor |
| HF | Herzfrequenz |
| H ₂ O | Wasser |
| HOE 33258 | Hoechst Farbstoff |
| HPRT | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase |
| HRP | horseradish peroxidase |
| IL | Interleukin |
| IMDM | Iscove's Modified Dulbecco's Medium |
| Isl-1 | LIM-Homeodomänen Transkriptionsfaktor |
| kbp | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilo Dalton |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|-------------------------------------|
| I | Liter |
| LVDP | linksventrikulär entwickelter Druck |
| M | mol/l |
| mA | Milliampere |
| MCP | Monocyte chemotactic protein |
| mg | Milligramm |
| min | Minute(n) |
| MIP | Macrophage inflammatory protein |
| ml | Milliliter |
| MLC-2 α | myosin light chain-2 α |
| mmHg | Millimeter Quecksilbersäule |
| mM | Millimolar |
| mmol | Millimol |
| M-MLV | Monoley Murine Leukemia Virus |
| MMP | Matrix-Metalloproteinase |
| mRNA | messenger Ribonukleinsäure |
| ms | Millisekunden |
| MSC | mesenchymale Stammzellen |
| mw | Molekulargewicht (molecular weight) |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NBT | Nitro Blue Tetrazolium |
| NCX | Natrium-Calcium-Austauscher |
| ng | Nanogramm |
| nmol | Nanomol |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| O ₂ | Sauerstoff |
| Oligo-dT | Oligo-desoxy-Thymidin |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| p | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR [®] | Polymerase Kettenreaktion |
| Pen-Strep | Penicillin-Streptomycin |
| pg | Pikogramm |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration |
| p-m | unkonditioniertes Medium |
| P _{sys} | systolischer Druck |
| P _{dias} | diastolischer Druck |
| PVDF | Polyvinyliden-Difluorid |
| % | Prozent |
| RAAS | Renin-Angiotensin-Aldosteron-System |
| rev-primer | reverse primer |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPP | rate-pressure product |
| RT | Reverse Transkriptase |
| Sca-1 | Stammzell-Antigen-1 |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde(n) |
| SEM | Standardfehler des Mittelwertes |
| Serca 2a | Sarkoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase |
| SHR | Spontan Hypertensive Ratte |
| SNS | sympathisches Nervensystem |
| TAE | Tris-Acetat/EDTA-Puffer |
| Taq | Termus aquaticus |
| TBS | Tris Buffered Saline |
| TCA | Trichloressigsäure |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|--|
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| TE-Puffer | Tris-EDTA-Puffer |
| TG | Transgen |
| TIMP | Tissue Inhibitor of Metalloproteinases |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| Tris | Tris-hydroxymethylaminomethan |
| | |
| U | units |
| u.a. | unter anderem |
| UV | Ultra Violett |
| | |
| V | Volt |
| vs. | versus |
| | |
| WHO | World Health Organization |
| WIS | normotensive Wistar-Ratte |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Klinische Aspekte der kardio-vaskulären Pathophysiologie | 1 |
| 1.1.1 | Herzinsuffizienz | 1 |
| 1.1.2 | Hypertonie | 3 |
| 1.1.3 | Herzerkrankungen bei Tieren | 5 |
| 1.1.4 | Das Modell der SH-Ratte | 6 |
| 1.2 | Zelluläre Aspekte der kardio-vaskulären Pathophysiologie | 7 |
| 1.2.1 | Apoptose | 7 |
| 1.2.2 | Reperfusionsschaden | 8 |
| 1.2.3 | Calciumhandling der Herzmuskelzelle | 9 |
| 1.3 | Stammzellen und Progenitorzellen | 9 |
| 1.3.1 | Ursprung und Begriffsdefinition | 9 |
| 1.3.2 | Herkunft und Gewinnung | 11 |
| 1.3.3 | Therapeutischer Einsatz | 13 |
| 1.4 | Progenitorzellen in dieser Studie | 15 |
| 1.4.1 | Ziele | 15 |
| 1.4.2 | Zytokine | 16 |
| 1.4.3 | Parakrine Effekte durch Zytokine | 17 |
| 1.4.4 | Entwicklung der Methode zur Gewinnung von Progenitorzellen | 18 |
| 1.4.5 | Therapeutischer Einsatz von Stammzellen in der Tiermedizin | 19 |
| 1.5 | Fragestellung | 20 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|----|
| 2 | Material | 21 |
| 2.1 | Chemikalien | 21 |
| 2.2 | Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz | 24 |
| 2.3 | Primer | 25 |
| 2.4 | Geräte und Laborbedarf | 26 |
| 2.4.1 | Allgemein verwendete Geräte..... | 26 |
| 2.4.2 | Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände | 27 |
| 2.5 | Puffer und Lösungen | 31 |
| 3 | Methoden | 39 |
| 3.1 | Gewinnung von Herzgewebe für die Stammzellkultur | 39 |
| 3.1.1 | Versuchstiere..... | 39 |
| 3.1.2 | Gewinnung von Stammzellmaterial aus dem Rattenherz | 39 |
| 3.1.3 | Aufarbeitung des Materials | 40 |
| 3.1.4 | Gewinnung von Stammzellmaterial aus humanen Biopsien | 42 |
| 3.1.5 | Auswertung von Patientendaten | 42 |
| 3.2 | Isolierung von Herzmuskelzellen | 44 |
| 3.2.1 | Versuchstiere..... | 44 |
| 3.2.2 | Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen..... | 44 |
| 3.2.3 | Vorinkubation der Kulturschalen | 46 |
| 3.2.4 | Ausplattieren der Kardiomyozyten | 46 |
| 3.2.5 | Langzeitkultur der isolierten Kardiomyozyten | 46 |
| 3.3. | Perfusion isolierter Rattenherzen | 47 |
| 3.3.1 | Grundlagen..... | 47 |
| 3.3.2 | Aufbau der Langendorff-Anlage..... | 47 |
| 3.3.3 | Versuchstiere..... | 48 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.3.4 | Präparation der isolierten Herzen | 49 |
| 3.3.5 | Versuche unter flusskonstanten Bedingungen..... | 49 |
| 3.3.6 | Erfassung der physiologischen Parameter | 50 |
| 3.4 | Immunfluoreszenz-Mikroskopie | 51 |
| 3.4.1 | Technik | 51 |
| 3.4.2 | Immunzytochemische Färbung der Progenitorzellen..... | 52 |
| 3.5 | Nachweis von RNA | 54 |
| 3.5.1 | Gewinnung von RNA durch Isolierung aus Ganzherzen..... | 54 |
| 3.5.2 | Gewinnung von RNA durch Isolierung aus Progenitorzellen | 54 |
| 3.5.3 | Bestimmung der RNA-Konzentration..... | 55 |
| 3.5.4 | cDNA-Synthese (Reverse Transkription)..... | 55 |
| 3.5.5 | Real-time Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR am icycler®)..... | 56 |
| 3.5.6 | Auswertung der PCR | 57 |
| 3.5.7 | Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten..... | 59 |
| 3.6 | Proteinnachweis im Western Blot | 60 |
| 3.6.1 | Probenvorbereitung | 60 |
| 3.6.2 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 60 |
| 3.6.3 | Western Blot Verfahren | 61 |
| 3.6.4 | Immunologischer Proteinnachweis | 62 |
| 3.6.5 | Auswertung..... | 63 |
| 3.7 | Detektion von Calcium-Transienten | 64 |
| 3.7.1 | Inkubation der Progenitorzellen | 64 |
| 3.7.2 | Calciumdetektion | 64 |
| 3.7.3 | Messung der intrazellulären Calciumkonzentration | 65 |
| 3.7.4 | Entstehung des Signals | 66 |
| 3.7.5 | Auswertung..... | 67 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| 3.8 | Messung der Myokardzellkontraktion im elektrischen Feld | 68 |
| 3.8.1 | Elektrische Stimulation und Steuerung der Kontraktion..... | 68 |
| 3.8.2 | Messung der Kontraktionsparameter..... | 68 |
| 3.8.3 | Mathematische Verrechnung der Parameter | 70 |
| 3.9 | Zytokinnachweis mittels Protein-Array | 71 |
| 3.9.1 | Ratten-Array | 71 |
| 3.9.1.1 | Durchführung der Blockierung und Inkubation..... | 72 |
| 3.9.1.2 | Detektion der Proteine und Entwicklung der Membranen..... | 72 |
| 3.9.1.3 | Auswertung..... | 73 |
| 3.9.2 | Human-Array | 74 |
| 3.10 | Messung der Apoptose in Herzmuskelzellen | 76 |
| 3.10.1 | Methode..... | 76 |
| 3.10.2 | Mikroskopie und Auswertung..... | 76 |
| 3.11 | Statistik | 77 |
| 4 | Ergebnisse | 78 |
| 4.1 | Charakterisierung der kardialen Progenitorzellen | 78 |
| 4.1.1 | Dokumentation des Zellwachstums | 78 |
| 4.1.2 | Nachweis von kardialen Markern und Stammzellmarkern per RT-PCR .. | 81 |
| 4.1.3 | Nachweis kardialer- und Stammzellmarker per Western Blot..... | 82 |
| 4.1.4 | Nachweis von kardialen und Stammzellmarkern per Immunfluoreszenz. | 83 |
| 4.1.5 | Untersuchung der Progenitorzellkultur auf Fremdzellen | 84 |
| 4.1.6 | Untersuchung der Progenitorzell-Kultur auf Ca ²⁺ -Transienten..... | 85 |
| 4.1.6.1 | Aufzeichnung des Fluoreszenz-Signals | 85 |
| 4.1.6.2 | Dokumentation der Fluoreszenzmikroskopie | 86 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.2 | Untersuchung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten | 89 |
| 4.3 | Untersuchung von Calciumhandling-Proteinen | 92 |
| 4.4 | Korrelation zwischen Calciumhandling und kontraktiler Funktion ... | 93 |
| 4.5 | Untersuchung Apoptose-regulierender Proteine | 94 |
| 4.6 | Untersuchung der Apoptose in isolierten Kardiomyozyten | 95 |
| 4.7 | Untersuchung der Überstände im Langendorff-Modell | 97 |
| 4.7.1 | Einfluss auf die Recovery | 97 |
| 4.7.2 | Einfluss auf die Genexpression | 98 |
| 4.7.2.1 | Calciumhandling | 98 |
| 4.7.2.2 | Apoptose | 99 |
| 4.8 | Zytokine in konditionierten Überständen von Progenitorzellen | 100 |
| 4.8.1 | Ratten-Array | 100 |
| 4.8.2 | Human-Array | 101 |
| 4.9 | Einfluss der Hypertonie auf die kontraktile Funktion | 103 |
| 4.10 | Korrelation zwischen Hypertonus und kontraktiler Funktion | 105 |
| 5 | Diskussion | 106 |
| 5.1 | Maßgebliche Charakteristika von kardialen Progenitorzellen | 106 |
| 5.2 | Beurteilung des Einflusses auf die kontraktile Funktion | 107 |
| 5.3 | Veränderte Proteinexpression in behandelten Kardiomyozyten | 109 |
| | (late remodeling) | 109 |
| 5.3.1 | Calciumhandling in Kardiomyozyten..... | 109 |
| 5.3.2 | Apoptosemarker in Kardiomyozyten | 111 |
| 5.4 | Schutz vor Apoptose in behandelten Kardiomyozyten | 112 |
| 5.5 | Überprüfung der Genexpression und der Postinfarkt-Erholung | 113 |
| | (early remodeling) nach Langendorff-Perfusion | 113 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|------------|
| 5.5.1 | Recovery in isolierten Ganzherzen | 113 |
| 5.5.2 | Calciumhandling in isolierten Herzen..... | 114 |
| 5.5.3 | Apoptose in isolierten Herzen | 114 |
| 5.6 | Untersuchung der konditionierten Überstände auf Zytokine | 115 |
| 5.6.1 | Zytokine in Progenitorzellen von Ratten | 115 |
| 5.6.2 | Zytokine in humanen Progenitorzellen..... | 117 |
| 6 | Schlussfolgerung..... | 120 |
| 7 | Zusammenfassung..... | 121 |
| 8 | Summary..... | 123 |
| 9 | Literaturverzeichnis | 125 |
| 10 | Erklärung | 136 |
| 11 | Danksagung..... | 137 |

1 Einleitung

1.1. Klinische Aspekte der kardio-vaskulären Pathophysiologie

1.1.1 Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems gehören in den Industrieländern nach wie vor zu den wichtigsten Todesursachen. Im Jahr 2008 erlag in Deutschland nahezu jeder zweite männliche verstorbene Bundesbürger (46,6%) einer Herz-Kreislauf-Erkrankung (Statistisches-Bundesamt, 2008).

Unter Herzinsuffizienz versteht man eine unzureichende Funktion des Herzens, bei der das Herz nicht mehr in der Lage ist eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen (Pschyrembel, 2002). Der Grund hierfür liegt entweder in einer gestörten Füllung oder einer beeinträchtigten Kontraktion bzw. Entleerung der Ventrikel oder in einer Kombination aus beidem. Ursachen hierfür sind u.a. Myokardschäden (z.B. nach einem Infarkt oder durch eine Minderdurchblutung des Herzmuskels an sich, wie bei der koronaren Herzkrankheit), Klappendefekte (Stenosen oder Insuffizienzen) oder Reiz-Leitungs-Störungen.

Unabhängig von ihrer Ätiologie ist den erworbenen Herzerkrankungen ihr progressiver Charakter gemeinsam. Sie führen früher oder später zu klinischen Symptomen, die auf eine kardiale Insuffizienz zurückzuführen sind. Neben der Einteilung in systolische und diastolische Funktionsstörungen sind in der Literatur noch weitere Beschreibungen und Klassifizierungen hinsichtlich der Herzinsuffizienz verbreitet. Es wird unterschieden zwischen Rechts- und Linksherzinsuffizienz sowie zwischen Vorwärts- und Rückwärtsversagen. Die meisten dieser deskriptiven Begriffe lassen keinen Schluss auf die Ätiologie der Erkrankung zu und sind nur von geringem klinischem Nutzen. Ein häufig verwendeter Begriff ist der der kongestiven Herzinsuffizienz, welcher den Zustand beschreibt, in dem klinische Symptome auftreten, die auf einen Rückstau des Blutes in den kleinen oder großen Körperkreislauf zurückzuführen sind.

Einleitung

Im Allgemeinen wurde früher zwischen akuter und chronischer Herzinsuffizienz unterschieden. Der Begriff „akut“ kann jedoch missverständlich verwendet werden, um den zeitlichen Verlauf der Herzinsuffizienz zu beschreiben oder um ihren Schweregrad zu charakterisieren.

In den ESC Guidelines 2008 wird zwischen „New onset“ (neu aufgetretener Herzinsuffizienz), „Transient“ (vorübergehende Symptome einer Herzinsuffizienz) und „Chronic“ (chronische Herzinsuffizienz mit klinischer Symptomatik) unterschieden. Im Anfangsstadium der chronischen Herzinsuffizienz versucht der Körper durch Kompensationsmechanismen die verminderte Pumpleistung des Herzens und die Abnahme des Herzminutenvolumens auszugleichen. Über eine Aktivierung des Sympathikus kommt es kurzfristig zum Anstieg der Herzfrequenz, mittelfristig führt das Geschehen zu ventrikulärer Dilatation, welche langfristig in myokardialen Umbauprozessen gipfelt. Dieses kardiale Remodeling führt zu kardialer Fibrose, Myokardhypertrophie und Apoptose-Prozessen.

Zur weiteren Kompensation erfolgen eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), eine erhöhte Freisetzung von Endothelin sowie Zytokinen und eine Vasokonstriktion zur Aufrechterhaltung des arteriellen Blutdruckes, was kurzfristig eine Stabilisierung der Myokardfunktion gewährleistet. Auf lange Sicht jedoch tragen diese Systeme zur Progression der Herzinsuffizienz und der Entstehung eines circulus vitiosus bei (Weil et al., 2006).

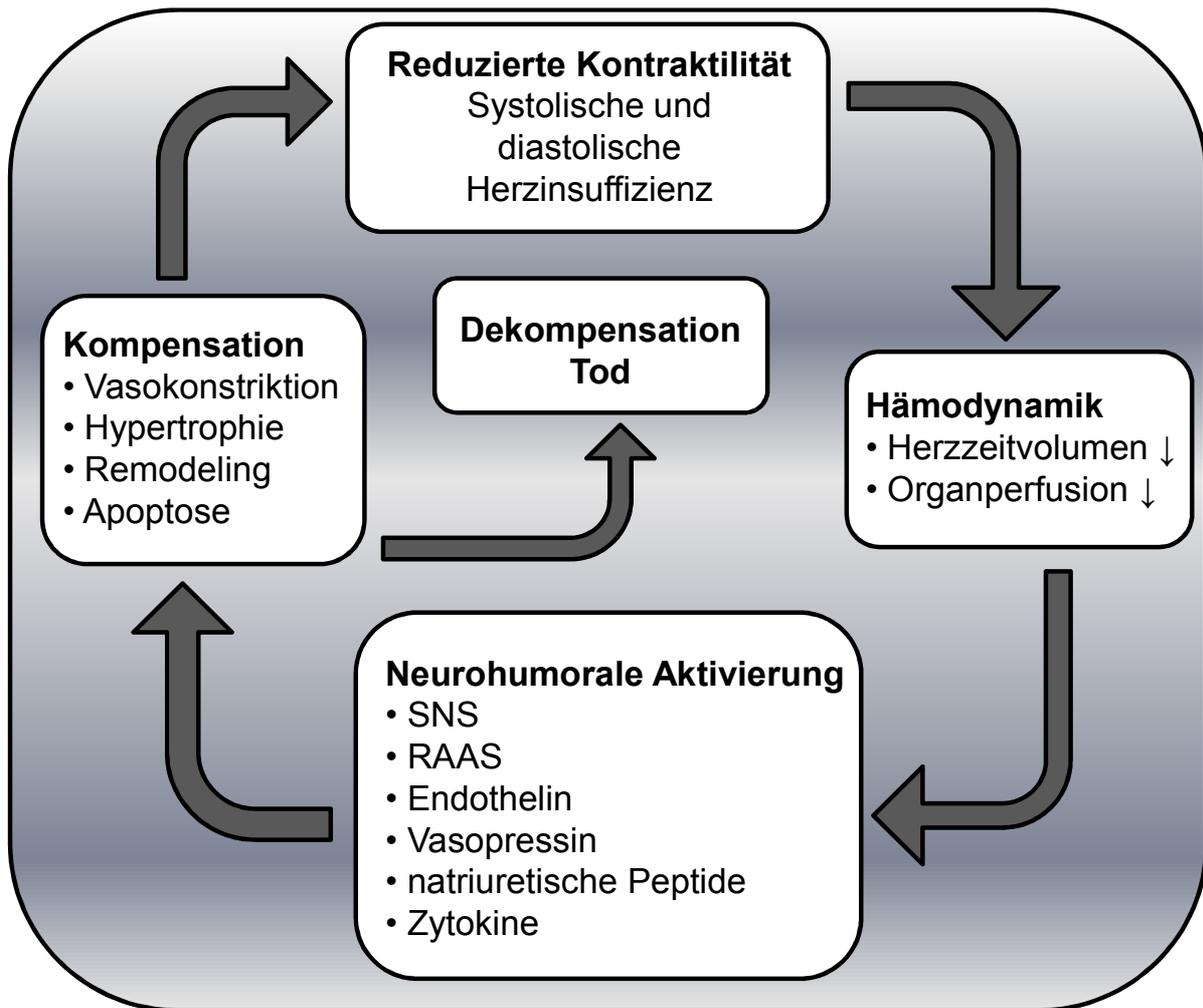


Abb. 1.1: Circulus vitiosus der chronischen Herzinsuffizienz

SNS = sympathisches Nervensystem

RAAS = Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

(modifiziert nach Weil et al., 2006)

1.1.2 Hypertonie

Als Hypertonie wird eine dauerhafte Erhöhung des arteriellen Blutdruckes bezeichnet, wobei systolische Werte von mehr als 140 mmHg und diastolische Werte von mehr als 90 mmHg als pathophysiologisch gewertet werden (Pschyrembel, 2002). Die Deutsche Liga zur Bekämpfung des Bluthochdrucks bezieht in ihrer Definition des Bluthochdrucks noch das Alter des Patienten mit ein. Bei Patienten über 65 Jahren liegt der systolische Grenzwert bei 160 mmHg. Bei der Prävalenz, Morbidität und Mortalität der Hypertonie spielen verschiedene Faktoren wie Alter, Geschlecht und bei Tieren die Rasse eine Rolle.

Einleitung

Laut der WHO ist der arterielle Hypertonus die wichtigste Ursache für vermeidbare Todesfälle in Westeuropa und den USA. In Deutschland leiden mehr als 16 Millionen Menschen an der Volkskrankheit „Bluthochdruck“ und das Hypertonierisiko steigt mit zunehmendem Alter steil an. Mit Krankheitskosten von ca. 8,6 Mrd. Euro in Deutschland entspricht dies allein für die Hypertonie 3,6% der Jahreskosten im Gesundheitswesen (Statistisches-Bundesamt, 2008).

Die Wahrscheinlichkeit für zukünftige kardiovaskuläre Komplikationen steigt kontinuierlich mit der Höhe des arteriellen Blutdrucks. In Deutschland sind langjährige Hypertonie (hoher Blutdruck) und koronare Herzkrankheit (Verkalkung der Herzkranzgefäße) für über 90% der Fälle von Herzinsuffizienz verantwortlich.

Bei dem zu Beginn der Erkrankung noch labilen Hochdruck ist der systolische Blutdruck aufgrund eines vermehrten Herzzeit- und Blutvolumens erhöht. Der periphere Gefäßwiderstand liegt noch im Normbereich. Bei längerem Bestehen der Erkrankung kommt zu dem Volumenhochdruck auch noch ein Widerstandshochdruck als weitere Problematik hinzu. Der periphere Gefäßwiderstand ist dadurch dauerhaft erhöht, so dass auch der diastolische Blutdruck pathologische Werte annimmt. Auch bei einer Rückkehr des Herzzeitvolumens in den Normbereich bleibt der hohe Blutdruck bestehen, weil zwischenzeitlich die hochdruckbedingten Endothel-Schäden zu einer vermehrten Einlagerung von Kollagenfasern und zu einer Verhärtung der Gefäße geführt haben, so dass der Patient nun an einem stabilen Hochdruck leidet (Riede et al., 1993).

Im Endstadium der Hypertonie besteht eine generalisierte Sklerose im Bereich der Arteriolen. Die Höhe des arteriellen Blutdrucks wird im Wesentlichen durch das Herzzeitvolumen und durch den Widerstand bestimmt, gegen den das Herzzeitvolumen gefördert wird. Der mittlere arterielle Blutdruck ist in der Peripherie etwa gleich dem diastolischen Blutdruck, vermehrt um ein Drittel der Blutdruckamplitude. Eine Zunahme des Herzzeitvolumens, die durch einen Anstieg der Frequenz und/oder des Schlagvolumens bedingt sein kann (z.B. bei Hyperthyreose), führt in erster Linie zu einem Anstieg des systolischen Blutdrucks. Eine Zunahme des peripheren Gesamtwiderstandes, der durch eine Engstellung der für die Widerstandsregulation verantwortlichen Arteriolen verursacht wird, hat analog dem Ohmschen Gesetz einen Anstieg des diastolischen Blutdrucks und des arteriellen Mitteldrucks zur Folge (von Engelhardt et al., 2000).

Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin haben sich Antihypertensiva zur Behandlung des Bluthochdrucks etabliert. Mittel der Wahl sind hierbei meist ACE-Hemmer und AT-1-Antagonisten in Kombination mit Diuretika und β -Blockern oder Calciumantagonisten, welche sowohl den Blutdruck senken als auch kardiovaskuläre Komplikationen vermindern (WHO, 2003; Deutsche-Hochdruckliga, 2008; Tobias et al., 2008).

1.1.3 Herzerkrankungen bei Tieren

In der Veterinärmedizin spielen Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems eine nicht minder große Rolle. Neueste Studien zeigen, dass jeder vierte Hund ab dem siebten Lebensjahr an einer Herzerkrankung leidet (Evans et al., 2007), wobei eine myxomatöse Mitralklappenerkrankung für ca. 75 % aller Fälle von kongestiver Herzinsuffizienz bei Hunden verantwortlich ist (Haggstrom et al., 2005).

In der Praxis nimmt bei den Kleintieren die Früherkennung angeborener kardialer Vitien in der Herzsprechstunde einen großen Raum ein (Tobias et al., 2008). Der Herzinfarkt als solcher ist in der Kleintierpraxis unbekannt. Das Auftreten von Herzrhythmusstörungen ist äußerst selten. Im Vordergrund stehen bei Hund und Katze die Folgeerkrankungen von Klappendefekten wie hypertrophe oder dilatative Kardiomyopathien. Anders als in der Humanmedizin wird in der Tiermedizin angenommen, dass es sich bei den meisten Fällen von Hypertonie vorwiegend um eine sekundäre Hypertonie handelt (Brown et al., 2007). Die häufigsten Ursachen für eine sekundäre Hypertonie beim Hund sind Hyperadrenokortizismus und Erkrankungen der Niere während bei Katzen meist eine Hyperthyreose oder ebenfalls Nierenerkrankungen vorliegen.

In der Pferdepraxis sind ebenfalls Herzklappenerkrankungen ein Vorstellungsgrund, wobei auch hier die Mitralklappeninsuffizienz am häufigsten ist. Die Herzinsuffizienz beim Pferd ist insgesamt ein eher selten zu beobachtendes Syndrom, welches wenn es klinisch auffällig wird meist auf einer sekundären Myokardschädigung beruht. Diese ist meist eine Folge von Erkrankungen der sonstigen Strukturen des Herzens wie Endo- oder Perikard oder der großen Gefäße (Dietz et al., 2005). Bei Milchkühen kommen oft Herzerkrankungen wie Endokarditiden, Perikarditiden traumatischer Genese und Kardiomyopathien vor. Die Therapie des Bluthochdrucks erfolgt in der Tiermedizin in Anlehnung an die Humanmedizin (Suter et al., 2006).

1.1.4 Das Modell der SH-Ratte

Das Tiermodell der spontan hypertensiven Ratte (SHR) wird schon seit Jahren erfolgreich für eine Vielzahl von Studien des Blutdrucks und für die Erforschung kardiovaskulärer Krankheiten eingesetzt (Dalton et al., 2000; Bell et al., 2002; Naito et al., 2002) und ist als Modell für den humanen essentiellen Bluthochdruck anerkannt (Trippodo et al., 1981).

Die SHR wurde 1963 von Okamoto (Kyoto School of Medicine) aus einer Kreuzung eines Wistar-Kyoto Männchens mit Bluthochdruck und eines Weibchens mit leicht erhöhtem Blutdruck entwickelt. Es erfolgte eine Selektion der Nachkommen von Bruder-Schwester-Kreuzungen auf Bluthochdruck (Okamoto, 1969).

SHR bilden im Alter von 7 bis 15 Wochen spontan eine arterielle Hypertonie, die sich mit einem systolischen Blutdruck bei adulten Weibchen von 175 mmHg und bei adulten Männchen von 196 mmHg äußert (Yen et al., 1974). Durch einen erhöhten neurogenen Tonus kommt es zur Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes und zur Beschleunigung der kardialen Proteinsynthese (Yamori, 1984). Im weiteren Krankheitsverlauf ab einem Alter von 12-15 Monaten führt der Bluthochdruck zum Auftreten von histopathologischen Veränderungen der Gefäße und des Herzens (Wexler et al., 1981). Die in dieser Studie verwendeten spontan hypertensiven Ratten sind Nachkommen dieser hypertensiven Linie. Die Arbeitsgruppe von Yen fand bei diesen Ratten drei Major-Blutdruck-Kontrollgene, welche die Höhe des Blutdrucks polygenetisch bestimmen (Yen et al., 1974). Beim Menschen wie auch bei anderen Spezies ist die Entwicklung der Hypertonie ein multifaktorielles Geschehen, wobei die Erblichkeit der Veranlagung zu Bluthochdruck nur einen unter vielen Faktoren darstellt. Die Okamoto-Aoki spontan hypertensiven Ratten sind in dieser Hinsicht einzigartig, da die Inzidenz für ihre Nachkommenschaft einen Blutdruck auszubilden bei 100 % liegt (Yen et al., 1974).

Als normotensive Vergleichsgruppe werden in dieser Studie Wistar-Hannover-Ratten eingesetzt. Sie stellen die in pharmakologischen Studien am häufigsten verwendete Art von Laborratten dar und werden den Wistar-Kyoto-Ratten vorgezogen, da sie in Bezug auf ihr Wachstum und ihre Blutdruckwerte einheitlicher sind (Kurtz et al., 1987).

1.2 Zelluläre Aspekte der kardio-vaskulären Pathophysiologie

1.2.1 Apoptose

Der Untergang einer Zelle kann durch die beiden Vorgänge der Apoptose und Nekrose eingeleitet werden. Morphologisch unterscheidet sich die Apoptose zum nekrotischen Zelluntergang durch geordnete Zellveränderungen (Cohen, 1993). Dadurch kann der Vorgang der Apoptose in drei charakteristische Schritte eingeteilt werden (Arends et al., 1990). Im ersten Schritt kommt es zu einer Zellschrumpfung mit einer Verdichtung der Zellorganellen und Kernpyknose. Die Chromatin-Kondensation, die zur Pyknose führt, ist das Charakteristikum der Apoptose (Kerr et al., 1972). Darauf folgend kommt es zu Karyorrhesis und es bilden sich viele kleine membrangebundene apoptotische Körper, die Zytoplasma und Organellen enthalten. Die Integrität der Zellmembran bleibt jedoch erhalten. Es folgt die Phagozytose der abgeschnürten Vesikel. Durch den schnellen Abbau der Zellbestandteile geht dieser Prozess im Vergleich zum nekrotischen Zelluntergang ohne Entzündung einher (Kurosaka et al., 2003).

Apoptose, der „programmierte Zelltod“, ist ein energieabhängiger Vorgang, der mit typischen morphologischen Veränderungen der Zelle einhergeht. Sie unterliegt einer streng kontrollierten und äußerst komplexen Signaltransduktion. Im Zentrum der Apoptose-Exekution steht die sog. Caspase-Kaskade. Bei den Caspasen handelt es sich um elf Cystein-haltige Proteasen, die in einer Kaskade aktiviert werden und schließlich über die Aktivierung der DNAsen zur Degradation der chromosomalen DNA und damit zur Apoptose führen. Ausgelöst wird die Caspase-Kaskade über eine Vielzahl von Faktoren, darunter auch der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Unter die „physiologische Apoptose“ fällt der Zelluntergang im Rahmen der Zellhomeostase.

Die ursprüngliche Annahme, dass es bei differenzierten Zellen wie Kardiomyozyten keine Apoptose gibt, konnte in den letzten Jahren nicht mehr aufrecht erhalten werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass der Apoptose auch bei einer Reihe von kardiovaskulären Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, der Herzinsuffizienz und der Atherosklerose eine entscheidende Rolle zukommt (van Empel et al., 2005).

Ein zentraler Mechanismus für die Aktivierung der Caspase-Kaskade wird durch das Zytochrom C vermittelt, dessen Freisetzung aus den Mitochondrien durch mehrere Proteine kontrolliert wird. Dazu zählt das anti-apoptotische Bcl-2, welches die Mitochondrien-Membran abdichtet und somit die Ausschleusung von Zytochrom C verhindert.

Der Schutzfaktor Bcl-2 wird durch atherogene Stimuli wie TNF- α degradiert. Aus der Protein-Familie des Bcl-2 sind 13 weitere Vertreter bekannt, unter anderem das pro-apoptotische Bax. Solange Bcl-2 und Bax im Gleichgewicht stehen können sie sich gegenseitig inhibieren. So konnte unter anderem eine Heterodimerisierung von Bcl-2 und Bax nachgewiesen werden (Oltvai et al., 1993).

1.2.2 Reperfusionsschaden

Arbeiten zum Thema „apoptotischer Zelltod“ zeigten, dass das Ausmaß der Apoptose im Rahmen einer Ischämie nicht nur von deren Dauer abhängig ist sondern insbesondere auch in direktem Zusammenhang zum Vorhandensein und zur Dauer einer Reperfusion steht.

Die Reperfusion ischämischen Myokards liefert noch nicht irreversibel geschädigtem Myokard lebensrettenden Sauerstoff. Sie ermöglicht diesen Zellen aufgebrauchte Energiespeicher wieder zu füllen, entstandenen Schaden zu reparieren und ihre normale Kontraktionsfunktion wieder aufzunehmen.

Somit ist die frühe Reperfusion führendes Therapieziel bei der Behandlung von Patienten mit Myokardinfarkt. Überraschenderweise stellte sich jedoch heraus, dass die Reperfusion den apoptotischen Zelltod ischämischer Kardiomyozyten beschleunigen kann (Fliss, 1998).

1.2.3 Calciumhandling der Herzmuskelzelle

Die Funktion des Sarkomers wird über Ionenströme reguliert, wobei eine elektrische Depolarisation eine Öffnung von Ionenkanälen und eine Freisetzung von Calcium-Ionen bewirkt. Diese elektromechanische Kopplung wird durch eine Reihe von Proteinen und funktionellen Systemen moduliert.

Bei der Herzinsuffizienz ist der Calciumausstrom aus der Zelle vermindert und prolongiert. Dieses Phänomen wird hauptsächlich durch eine verringerte Expression der sarkoplasmatischen (SR)-Calcium-ATPase (Serca 2a) verursacht. Bei diesem Vorgang ist gleichzeitig ein Anstieg des Natrium/Calcium-Austauschers (NCX) im Sarkolemm zu verzeichnen. Ein Missverhältnis von der Serca zum NCX (Verschiebung zugunsten des NCX) spielt eine wesentliche Rolle bei diastolischen Funktionsstörungen im Rahmen der Herzinsuffizienz (Weil et al., 2006).

1.3 Stammzellen und Progenitorzellen

1.3.1 Ursprung und Begriffsdefinition

Seit einigen Jahren werden Stammzellen als therapeutische Möglichkeit im Bereich der klinischen Behandlung von postischämischen Herzen, z.B. nach einem Herzinfarkt, angesehen. Das Interesse der Wissenschaft gilt hierbei zunächst der Stammzelle im Allgemeinen, wobei sich diverse Wege der Gewinnung im technischen und biologischen Sinne erschließen.

Am Beginn des Lebens stehen die Stammzellen, welche die Voraussetzung für die Entstehung von Gewebe und Organen in sich tragen. Obwohl sie mit zunehmender Ausbildung des Organismus ihre Totipotenz verlieren ist seit langem bekannt, dass auch der adulte Organismus Nischen von Stammzellen (Progenitorzellen) aufweist, die eine eingeschränkte Fähigkeit zur Regeneration besitzen, welche meist auf ein spezielles Organ limitiert ist (Schächinger et al., 2006). Die Begriffsdefinitionen von Stammzellen und Progenitorzellen sowie deren Einteilung in unterschiedliche Gruppen sind in der Literatur häufig unklar, wenn nicht gar irreführend.

Häufig wird der Begriff Stammzelle als übergreifende Bezeichnung für alle Formen und Stadien der sich in der Entwicklung des Organismus befindenden oder auch der in vitro kultivierten Zellen verwendet, welche in diesem Stadium weiterhin die Fähigkeit zur Weiterentwicklung in differenzierte Zellen verschiedener Organe und Gewebe in sich tragen. Umgekehrt werden oft Progenitorzellen, welche eigentlich bereits die Information von spezifischem Gewebe innehaben und sich auf dem Weg zur Differenzierung befinden, profan als Stammzellen bezeichnet. Folgende Tabelle soll die Zuordnung bestimmter Begriffe zu den verschiedenen Gruppen verdeutlichen.



Abb. 1.2: Begriffsdefinition für Stammzellen und Progenitorzellen

Quelle: modifiziert nach (Schächinger et al., 2006)

1.3.2 Herkunft und Gewinnung

Die Quellen für die Gewinnung von Stammzellen und Progenitorzellen sind so vielfältig wie der Organismus selbst. Residuale Stammzellen aus Geweben wie dem Herzen, embryonalen Stammzellen, dem Knochenmark, der Skelettmuskulatur oder dem Fettgewebe werden ebenso untersucht wie zirkulierende Progenitorzellen oder Endothelvorläuferzellen aus dem peripheren Blut (Abb. 1.3). Meist erfolgt für klinische Versuche oder Therapien die Gewinnung autologer Zellen, um die Gefahr der Gewebeabstoßung zu minimieren.

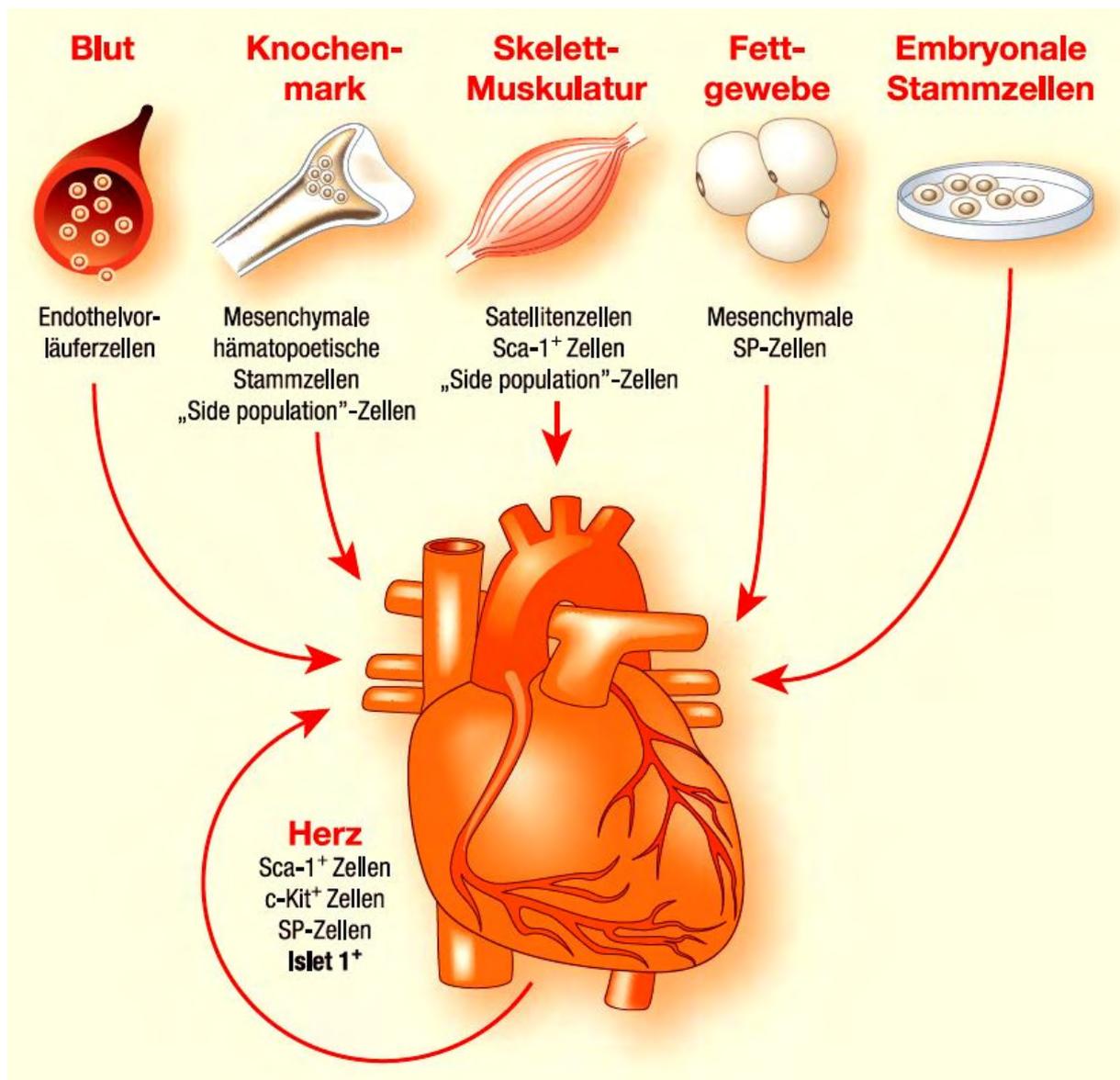


Abb. 1.3: Mögliche Optionen der Gewinnung und des Einsatzes von Stammzellen und Progenitorzellen. Quelle der Abbildung: (Dimmeler et al., 2005)

Hämatopoetische adulte Stammzellen aus dem Knochenmark bilden die Gruppe der bisher am häufigsten erforschten Stammzellen, wobei jene aus Leber, Gehirn, Zahnpulpa, Kornea, Retina und Blastozyste bislang nur in vereinzelt Studien untersucht wurden (Mummery et al., 2003)

Des Weiteren ist die Gewinnung von Stammzelllinien aus dem Fruchtwasser (De Coppi et al., 2007), dem Nabelschnurblut und Chorionzottenbiopsien möglich, wobei aus letzteren bereits erfolgreich Herzklappen gezüchtet und implantiert wurden (Schmidt et al., 2006). Embryonale Stammzellen bilden aufgrund ihrer hohen Plastizität eine weitere Quelle für die Erforschung, wobei aus ethischen Gründen eine klinische Anwendung derzeit noch nicht absehbar ist. Progenitorzellen aus dem peripheren Blut werden sowohl in der Klinik für direkte kardiale Reparaturen (Assmus et al., 2002), als auch zur Neovaskularisierung bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt (Losordo et al., 2004).

All diese Gruppen von Stamm- und Progenitorzellen werden in therapeutischen Experimenten hinsichtlich ihres Einflusses auf das kranke Herz untersucht.

1.3.3 Therapeutischer Einsatz

Diverse Studien zeigen die positive Wirkung von Stammzellen bei verschiedenen Formen der Herzschädigung. Insbesondere der Effekt nach Behandlung eines akuten Myokardinfarkts wurde in vielen Studien verfolgt und auch nachgewiesen. Bahnbrechend für das Konzept der Myokard-Regeneration nach einem Herzinfarkt waren Studien der Arbeitsgruppe von Anversa (Orlic et al., 2001), welche Mäusen nach einem experimentell induzierten Myokardinfarkt Knochenmarkprogenitorzellen infundierten und eine anschließend verbesserte Kontraktilität sowie eine verkleinerte Infarkt Narbe beobachten konnten. Die intrakoronare Infusion von Progenitorzellen ist eine in der Stammzellforschung häufig verwendete Technik zur Applikation direkt an den Ort des pathologischen Geschehens. Voraussetzung für den Erfolg ist hierbei ein effektives „homing“ der eingesetzten Zellen (Hofmann et al., 2005).

Erste klinische Studien an Menschen zeigten im Anschluss einer intrakoronaren Infusion von Knochenmarkstammzellen nach akutem Myokardinfarkt eine Verbesserung der lokalen linksventrikulären Funktion (Strauer et al., 2002). In der TOPCARE-AMI-Studie wurden außerdem endotheliale Progenitorzellen bei Patienten nach perkutaner Revaskularisierung intrakoronar infundiert. Hier zeigt sich eine deutliche, signifikante Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion im Mittel von 8,7 % (Schächinger et al., 2004).

Durch ihre Multipotenz und Fähigkeit zur Selbstvermehrung erschließen sich auf dem Stammzell-Sektor Möglichkeiten zur Züchtung von Gewebestücken bis hin zu kompletten Organen, was auf lange Sicht eine Alternative zur herkömmlichen Transplantation aus menschlichen und tierischen Spendern bietet. Bei Einsatz von autologem Material verringert sich zudem das Risiko einer Abstoßung. Erkrankungen, die durch den Verlust von spezifischen Zellen oder Funktionsverlust von Gewebe-Verbänden verursacht werden, beinhalten die Möglichkeit einer Therapie durch den Ersatz geschädigter oder fehlender Zellen durch gesunde Stammzellen mit regenerativem Potenzial.

Degenerative Erkrankungen wie Diabetes, Parkinson, rheumatoide Arthritis und myokardialer Infarkt stehen im Fokus der Stammzellforschung, wobei häufig das hohe Differenzierungspotenzial von embryonalen Stammzellen hervorgehoben wird (Mummery et al., 2002).

Einleitung

Bei der Behandlung des akuten Myokardinfarktes spielen natürlich die Stammzellen aus kardial orientiertem Material eine entscheidende Rolle. Die Zellen können nach der Vermehrung durch kardiogene Faktoren zur Differenzierung in Herzmuskelzellen angeregt werden, was zu direktem Ersatz von geschädigtem ischämischem Gewebe und zur Verminderung von narbigem Ersatzgewebe führen soll. Dabei macht man sich einen physiologischen Reparaturmechanismus zu Nutze (Abb. 1.4).

Das ischämische Organ steuert die Aufnahme (homing) und Inkorporation der Progenitorzellen durch die im Rahmen der Ischämie freigesetzten Botenstoffe, die nach Aufnahme in den Kreislauf auch die Mobilisation aus dem Knochenmark fördern (Schächinger et al., 2006).

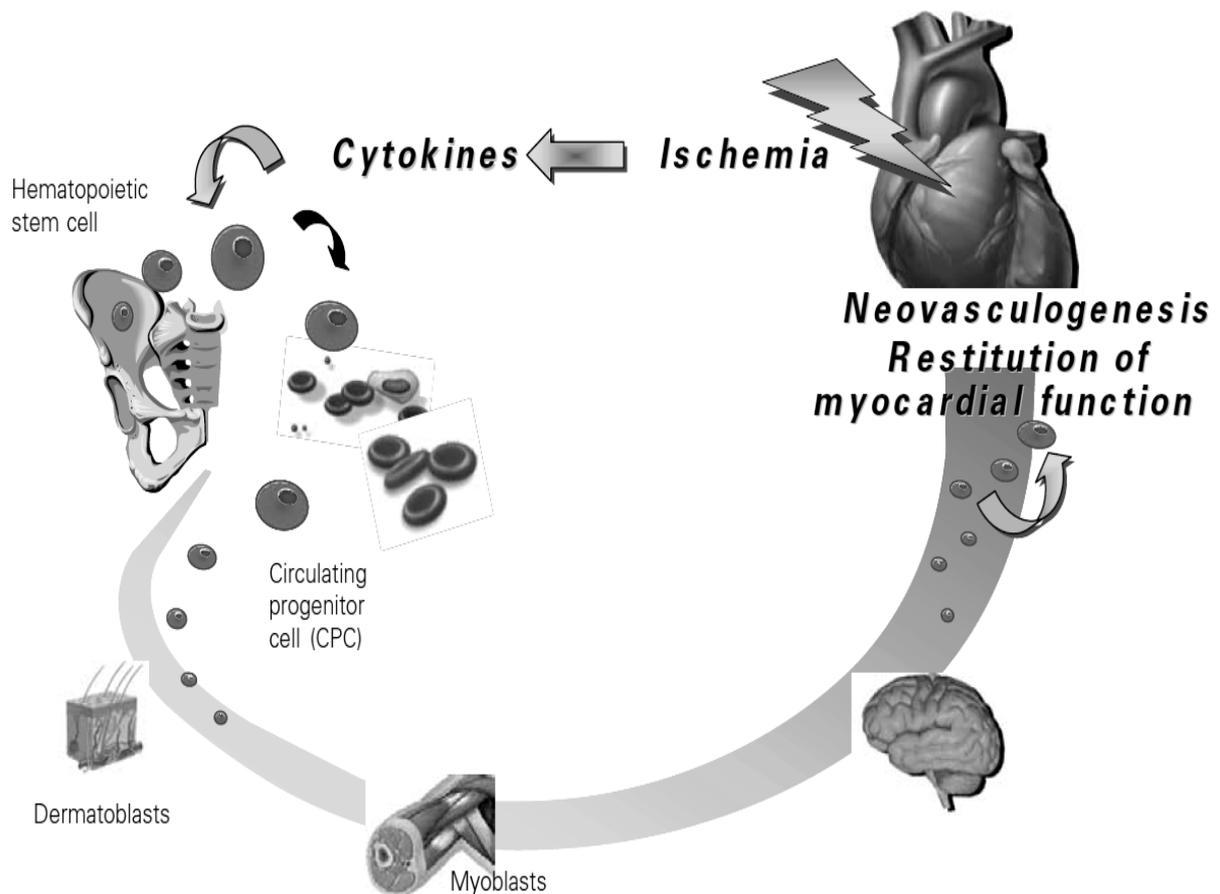


Abb. 1.4: Physiologische Rolle der Progenitorzellen: Ischämie führt zur Mobilisierung von Progenitorzellen aus dem Knochenmark durch Zytokin-Modulation. Zirkulierende Progenitorzellen sind an der Neovaskularisation von ischämischem Gewebe beteiligt. Quelle der Abbildung: (Schächinger et al., 2006)

1.4 Progenitorzellen in dieser Studie

1.4.1 Ziele

Maßgeblich für die Erforschung des Potenzials von Stamm- und Progenitorzellen auf dem Gebiet der Therapie bei bestehender Herzerkrankung, z.B. nach akutem Myokardinfarkt, ist die Tatsache, dass Zellen die aus dem Zielgewebe „Herz“ gewonnen werden aufgrund ihrer genetischen Kodierung für die Beeinflussung eben jenes Gewebes geeignet sind. Das bedeutet, dass aus dem Herzen entnommene Stammzellen nicht nur ihre Regenerationsfähigkeit erhalten, was ihre Kultivierung *in vitro* überhaupt erst ermöglicht, sondern dass sie durch gezieltes „Management“ in Richtung herzspezifischer Zellen gelenkt werden können.

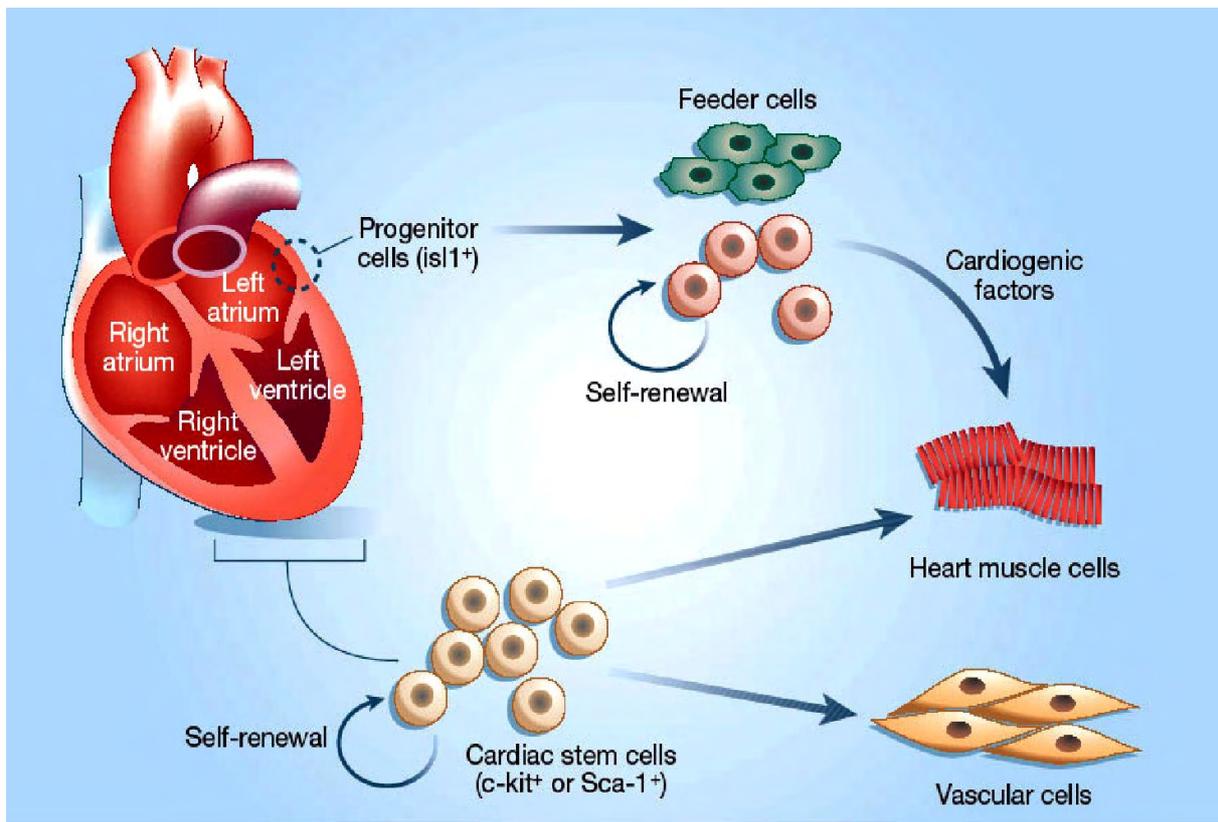


Abb. 1.5: Herkunft kardialer Stamm- und Progenitorzellen. Die kardialen Progenitorzellen haben das Potenzial zur Selbsterneuerung und Entwicklung zu Herzmuskelzellen. Die CPCs sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein des Isl-1-Proteins. Studien konnten zeigen, dass die Islet-1-Zellen im adulten Herzen Überbleibsel einer Population von kardialen Progenitorzellen aus dem Herzen des sich entwickelnden Fötus sind (Laugwitz et al., 2005). Kardiale Stammzellen haben die Fähigkeit zur Zellteilung und Differenzierung in verschiedenen Zelltypen. Diese Zellen exprimieren zudem weitere Stammzellmarker wie c-Kit und Sca-1. Quelle der Abbildung: (Mummery, 2005).

So ist die Züchtung von Progenitorzellen, welche bereits einige Eigenschaften einer ausdifferenzierten Kardiomyozyte besitzen, ein Ziel dieser Forschungsarbeit. Im weiteren Verlauf sollen die parakrinen Eigenschaften dieser Progenitorzellen untersucht und ihre Eigenschaften und ihr Wirkungspotenzial in verschiedenen Herz-Modellen analysiert werden. Dabei stehen vor allem die von den Progenitorzellen freigesetzten Zytokine im Fokus, welche durch ihre Zusammensetzung zu unterschiedlichen Effekten am Zielgewebe „Herz“ führen sollen.

1.4.2 Zytokine

Bei Zytokinen handelt es sich um hormonähnliche regulatorische Mediatoren, welche die Funktion verschiedener Zellen beeinflussen. Sie werden von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert und vermitteln vielfältige Wechselwirkungen zwischen Zellen. Sie sind an der Regulierung der Ontogenese, der Gewebereparatur, der Immunabwehr, von Entzündungen, der Kontraktilität in Herz und Gefäßen, der Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zellsterbens beteiligt.

Meist werden sie durch Stimulation produziert und sind hochaktiv (Wirkung schon bei Konzentrationen von pg bis ng). In der Regel handelt es sich um einfache Polypeptide (meist Glykoproteine) in der Größe von 5-100 kDa, welche an hochaffine Rezeptoren binden und dadurch unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzen. Die Freisetzung von Zytokinen in diverser Zusammensetzung führt schließlich zur Aktivierung unterschiedlicher Gene und verursacht so verschiedene biologische Funktionen.

Man unterscheidet im Wesentlichen fünf Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone, Kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren, Interleukine und Chemokine. Die Wirkweisen sind autokrin, parakrin, juxtakrin und in seltenen Fällen auch endokrin.

Versucht man die Zytokine nach ihren Funktionen einzuteilen fällt auf, dass jedes Zytokin mehrere unterschiedliche Effekte hat (Pleiotropie) und verschiedene Zytokine zu gleichen Effekten führen (Redundanz). Zudem können die Zytokine je nach Kombination („Zytokincocktail“) und Reihenfolge ihres Einwirkens auf Zellen andersartige Effekte hervorrufen.

1.4.3 Parakrine Effekte durch Zytokine

Obwohl es bisher eine ganze Reihe von Studien zu positiven Effekten kardialer Stamm- und Progenitorzellen gibt, sind deren zugrundeliegenden Mechanismen bisher größtenteils ungeklärt. Die Annahme, dass Progenitorzellen nekrotische oder apoptotische Kardiomyozyten ersetzen (Beltrami et al., 2003) wurde durch eine weitere Theorie ergänzt. Dieser zufolge agieren Progenitorzellen im Zuge eines parakrinen Mechanismus durch die Freisetzung von bestimmten Faktoren (Sadat et al., 2007). Eine immun-modulatorische Fähigkeit wird von anderen Autoren diskutiert (Mishra, 2008). Auch andere Arbeitsgruppen erklärten parakrine Mechanismen von Progenitorzellen als Hauptursache für die Verbesserung der ventrikulären Funktion (Lyngbaek et al., 2007). Trotz dieser Ansätze ist nur wenig über die freigesetzten Faktoren bekannt, welche den parakrinen Effekten zugrunde liegen und somit die Herzfunktion beeinflussen oder Remodeling-Prozesse verändern.

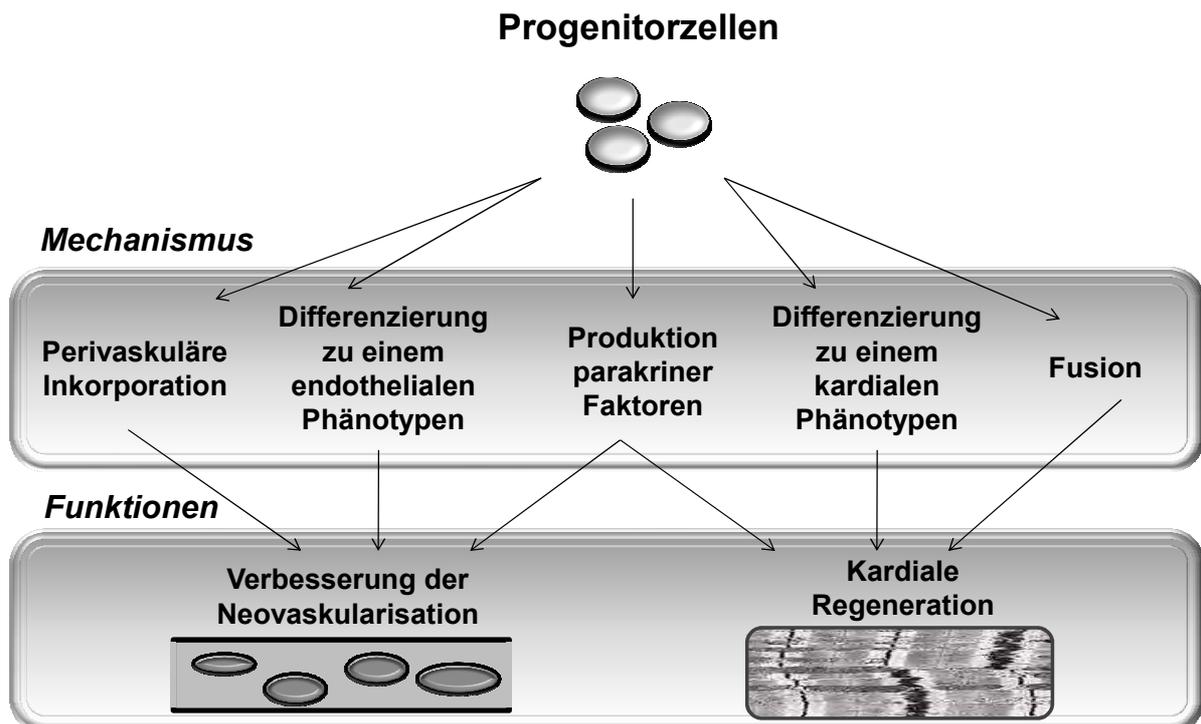


Abb. 1.6: Wirkmechanismen von Progenitorzellen. Sie sind in der Lage die funktionelle Erholung des infarzierten oder insuffizienten Myokards zu verbessern. Dies kann durch verschiedene potenzielle Mechanismen geschehen, unter anderem durch direkte oder indirekte Verbesserung der Neovaskularisation. Von Progenitorzellen freigesetzte parakrine Faktoren können die kardiale Apoptose minimieren, das Remodeling beeinflussen oder endogene Reparaturmechanismen in Gang setzen (zum Beispiel durch residuale Progenitorzellen). Die Differenzierung zu Kardiomyozyten könnte ebenfalls zur Regeneration des Herzens beitragen. Quelle: Modifiziert nach (Dimmeler et al., 2005).

1.4.4 Entwicklung der Methode zur Gewinnung von Progenitorzellen

Im Jahre 2004 beschrieb die Arbeitsgruppe um Elisa Messina eine Methode zur Isolation und Entwicklung adulter kardialer Stammzellen aus humanen Herzen und Mäuseherzen. Sie isolierten undifferenzierte Zellen, die als selbst-anheftende Cluster wachsen und bezeichneten dieses Phänomen als Cardiosphären (Messina et al., 2004). Diese Zellen sind klonogen, exprimieren Stamm- und endotheliale Progenitorzellmarker und zeigen Eigenschaften adulter kardialer Stammzellen. Sie haben die Fähigkeit, sich über einen langen Zeitraum selbst zu erneuern und zu verschiedenen spezialisierten Zelltypen des Herzens zu differenzieren, nämlich Kardiomyozyten oder Gefäßzellen, welche wiederum die für ihren Zelltyp charakteristischen Marker tragen. Bei cardiosphärischen Zellen aus Mäuseherzen konnte von der Arbeitsgruppe in der Kultur sogar ein spontanes „Schlagen“ festgestellt werden (Messina et al., 2004). Dieses Protokoll bildet die Grundlage für die in dieser Studie generierten Progenitorzellen. Im Gegensatz zur Methode „juvenile“ hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark zu gewinnen, werden hierbei residuale „adulte“ Stammzellen aus dem bereits ausdifferenzierten Gewebe des Herzens isoliert und durch eine spezielle Kultivierungsmethode zunächst zum Ausbilden von Cardiosphären gebracht.

Am Ende der Kultivierungszeit steht die Gewinnung von partiell differenzierten Progenitorzellen. Diese befinden sich in einem Stadium auf dem Weg zur Entwicklung in spezifisches Gewebe, nämlich dem einer ausdifferenzierten Kardiomyozyte. Die Spezifizierung erfolgt hierbei über einen im Kulturmedium enthaltenen Zytokincocktail.

1.4.5 Therapeutischer Einsatz von Stammzellen in der Tiermedizin

Auch in der Tiermedizin finden sich Studien zur Generierung und zum therapeutischen Einsatz von Stammzellen. Häufig werden in diesem Bereich mesenchymale Stammzellen (MSC) in experimentellen Projekten erforscht, in deren Rahmen neue Therapiemöglichkeiten bei einzelnen Patienten erprobt werden. MSC wurden auch schon in einem Infarktmodell bei Ratten eingesetzt (Mangi et al., 2003). Walter Brehm, Tierarzt aus Bern, untersuchte in einer Studie mit 120 Pferden die Auswirkungen einer intraläsionalen Injektion autologer Stammzellen auf Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne oder des Fesselträgers und erzielte eine Erfolgsrate von 80-85 %. Brehm beruft sich zudem auf gute vorläufige klinische Studien aus Großbritannien (R. Smith) und den USA (A. Nixon). Smith brachte bei 37 Rennpferden mesenchymale Stammzellen in hoher Zahl in Kernläsionen der oberflächlichen Beugesehne ein, wodurch eine bessere Regeneration und Funktionalität erreicht werden sollte. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Pferde, die wieder zum Renneinsatz kamen, im Vergleich mit Literaturdaten signifikant höher war (Smith, 2008).

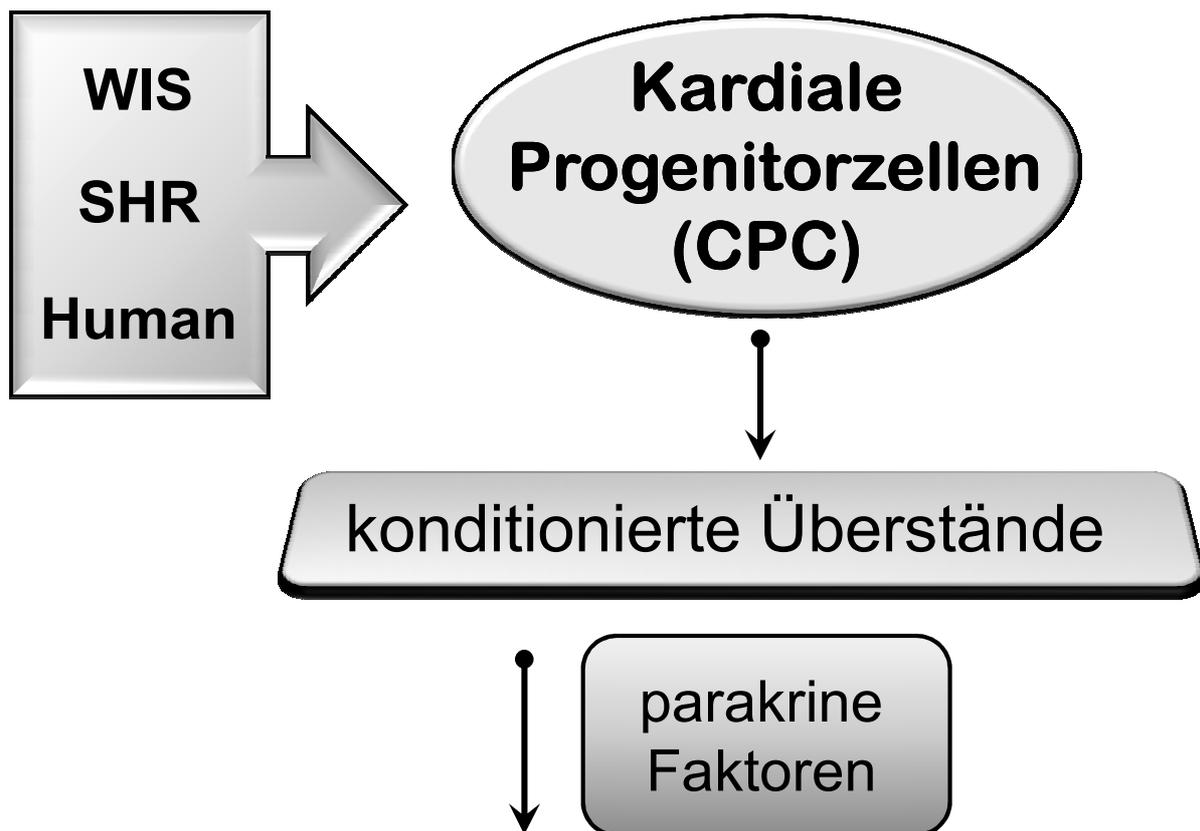
Die Arbeitsgruppe Oyama injizierte aus Skelettmuskel-Biopsien gesunder Hunde isolierte und expandierte Myoblasten mittels eines in die Femoralarterie eingeschobenen Katheters in die linke Koronararterie des jeweiligen Spenderhundes (Oyama et al., 2005). Das Anwachsen und Überleben der transplantierten Zellen im ventrikulären Myokard konnte hier nachgewiesen werden. Diese Technik könnte zukünftig in der Therapie von Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie verwendet werden, indem die transplantierten Zellen im Myokard zu funktionsfähigen Herzmuskelzellen differenzieren und so zur Regeneration des Herzens beitragen.

In einem Versuch konnte bei Ratten mit Querschnittslähmung durch Einsatz von Stammzellen aus dem Knochenmark eine wahrnehmbare Verbesserung ihres Zustandes erreicht werden (Himes et al., 2006). Auch transduzierte MSC wurden bereits erfolgreich in einem Myokardinfarkt-Modell des Schweins zur Regeneration von geschädigtem Myokard eingesetzt (Lim et al., 2006). In einem Tierversuch führte der Einsatz von adulten Stammzellen (canine Mesoangioblasten) zur deutlichen klinischen Verbesserung der Muskelfunktion bei Golden Retrievern mit genetisch bedingter Muskeldystrophie (Sampaolesi et al., 2006).

1.5 Fragestellung

In dieser Arbeit wird nun erstmals die parakrine Wirkung kardialer Progenitorzellen unter Beachtung der Interaktion von Donor und Empfänger untersucht. Folgende spezifischen Fragen sollen mit Hilfe der aktuellen Studie erörtert werden:

1. Welche Einflüsse haben die konditionierten Überstände kardialer Progenitorzellen auf isolierte Kardiomyozyten und Ganzherzen?
2. Haben die Beschaffenheit und die Herkunft des Donorgewebes einen Einfluss auf die durch Progenitorzellen hervorgerufenen positiven Effekte?
3. Haben die Beschaffenheit und die Herkunft des Empfängergewebes einen Einfluss auf die durch Progenitorzellen hervorgerufenen positiven Effekte?
4. Welche Rolle spielen parakrine Effekte, die durch sezernierte Zytokine hervorgerufen werden?



Funktion und Remodeling von isolierten Kardiomyozyten und Ganzherzen

Abb. 1.7: Vorgehensweise zur Untersuchung der Fragestellung

2 Material

2.1 Chemikalien

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| Acrylamid | Roth, Karlsruhe |
| Agarose | VWR, Darmstadt |
| 6-Aminohexansäure | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumpersulfat | Serva, Heidelberg |
| 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl Phosphat | Calbiochem, Schwalbach i.T. |
| Benzonase [®] | Merck, Darmstadt |
| Biotin Antibody Human Array I | Hözl Diagnostika, Köln |
| Bisacrylamid | Merck, Darmstadt |
| BFGF | Invitrogen, Karlsruhe |
| Bovines Serum-Albumin | Sigma, Taufkirchen |
| 100bp DNA Ladder | New England BioLabs, Frankfurt/Main |
| Bromphenolblau | Sigma, Taufkirchen |
| B27 Supplement | Invitrogen, Karlsruhe |
| Cacodylsäure | Merck, Darmstadt |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Carbogen [®] | Linde, Pullach |
| Cardiostrophin-1 | R&D systems, Wiesbaden |
| Chloroform | Roth, Karlsruhe |
| Citifluor | Plano, Wetzlar |
| Collagenase Typ CLSII | Biochrom, Berlin |
| Cytokin Antibody Array I Rat | Hözl Diagnostika, Köln |
| Diethylether | Roth, Karlsruhe |
| dNTPs | Invitrogen, Karlsruhe |
| Dithiotreitol | Sigma, Taufkirchen |
| DMEM | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| DMSO | AppliChem, Darmstadt |

Material

| | |
|---------------------------------|------------------------------|
| EDTA-Natriumsalz | Sigma, Taufkirchen |
| EGF | Calbiochem, Darmstadt |
| Eisessig | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Roth, Karlsruhe |
| FCS | Invitrogen, Karlsruhe |
| Fura-2-AM | Invitrogen, Karlsruhe |
| Glucose | Roth, Karlsruhe |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe |
| Glycin | Roth, Karlsruhe |
| HCl | Merck, Darmstadt |
| HEPES | Roche, Mannheim |
| Hoechst 33258 | Sigma, Taufkirchen |
| IMDM | Biochrom AG, Berlin |
| Isopropanol | Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| KH ₂ PO ₄ | Roth, Karlsruhe |
| L-Glutamine | PAA Laboratories GmbH, Cölbe |
| Medium 199/Earl's Salts | Biochrom, Berlin |
| Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| Mercaptopropandiol | Merck-Suchard, Hohenbrunn |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| MgCl ₂ | Invitrogen, Karlsruhe |
| MgSO ₄ | Merck, Darmstadt |
| M-MLV Reverse Transkriptase | Invitrogen, Karlsruhe |
| Molekulargewichtsmarker | GE Healthcare, Freiburg |

Material

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Roth, Karlsruhe |
| Natrium-Vanadat | Merck, Darmstadt |
| Nitro Blue Tetrazolium | Appli Chem, Darmstadt |
| | |
| Oligo-dt | Roche, Mannheim |
| | |
| PBS | Invitrogen, Karlsruhe |
| Penicillin-Streptomycin | Invitrogen, Karlsruhe |
| Poly-L-Lysine | Sigma, Taufkirchen |
| Propidiumjodid | Sigma, Taufkirchen |
| Proteinase K | Applichem, Darmstadt |
| | |
| RNA-sin | Promega, Madison |
| 5x RT-Puffer | Invitrogen, Karlsruhe |
| | |
| SDS | Merck, Darmstadt |
| SYBR [®] Green Supermix | BioRad, München |
| SYBR [®] Safe DNA Gel stain | Invitrogen, Karlsruhe |
| | |
| Taurin | Sigma, Taufkirchen |
| TCA | Merck, Darmstadt |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| Thrombin | Calbiochem, Darmstadt |
| TriFast [®] Reagenz | PEQLAB, Erlangen |
| Tris | Merck, Darmstadt |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Trypsin-EDTA | Invitrogen, Karlsruhe |
| Tween 20 | Sigma, Taufkirchen |

Alle übrigen Salze und Chemikalien werden in der jeweils höchsten Qualität bezogen und entsprechend den Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Die Anbieter sind Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Taufkirchen) und Calbiochem (Bad Soden). Soweit nicht anders angegeben, wird aqua bidest als Lösungsmittel für Lösungen, Medien und Puffer verwendet.

2.2 Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

Primäre Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenz

| | |
|-------------------------|---|
| ANP | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| Anti-Actin | Sigma, Taufkirchen |
| Bax | BD Biosciences, Heidelberg |
| Bcl-2 | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| β -MHC | Abcam, Cambridge, UK |
| Cardiotrophin-1 | R&D Systems INC., Wiesbaden |
| α -cardiac actin | PROGEN, Heidelberg |
| c-Kit | Cell Signaling Technology, Danvers |
| GATA-4 | Sigma, Taufkirchen |
| Isl-1 | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| NCX | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| Serca 2a | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| Sca-1 | BD Biosciences, Heidelberg |

Sekundäre Antikörper für Western Blot

| | |
|------------------|---|
| Anti-Rabbit IgG | Sigma, Taufkirchen |
| Anti-Mouse | Sigma, Taufkirchen |
| Donkey anti-goat | Santa Cruz Biotechnology INC., Heidelberg |
| Goat anti-rabbit | Sigma, Taufkirchen |

Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

| | |
|----------------------|------------------|
| Cy2 goat anti-rabbit | Dianova, Hamburg |
| Cy3 sheep anti-mouse | Dianova, Hamburg |

2.3 Primer

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe bezogen.

PCR- Primer (5'-3') Ratte

| | | |
|-----------------|----------|-----------------------------|
| Bax | forward: | ACT AAA GTG CCC GAG CTG ATC |
| | reverse: | CAC TGT CTG CCA TGT GGG G |
| Bcl-2 | forward: | ATC TTC TCC TTC CAG CCT GA |
| | reverse: | TCA GTC ATC CAC AGA GCG AT |
| HPRT | forward: | CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT |
| | reverse: | CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC |
| Serca 2a | forward: | TGA CTG GTG ATG GTG TGA ATG |
| | reverse: | GAT GAG GTA GCG GAT GAA CTG |
| NCX | forward: | CCG TAA TCA GCA TTT CAG AG |
| | reverse: | GCC AGG TTC GTC TTC TTA AT |
| c-Kit | forward: | AAA TGG GCA CTT GGT TTG AG |
| | reverse: | GGG GAT CAT TGT GAT GGT TC |
| β-MHC | forward: | TGG CAC CGT GGA CTA CAA TA |
| | reverse: | TAC AGG TGC ATC AGC TCC AG |
| Isl-1 | forward: | CCA TCA TGT CTC TCC GGA CT |
| | reverse: | AAG GAC AAG AAA CGC AGC AT |
| Sca-1 | forward: | GCT CCT CGA CAG ACA TCA CA |
| | reverse: | CGA GCC ACC TTT GAC TCT TC |
| α-cardiac actin | forward: | CAC GGC ATT ATC ACC AAC TG |
| | reverse: | ATA CAT GGC AGG CAC ATT GA |
| ANP | forward: | ATG GGC TCC TCC TCC ATC AC |
| | reverse: | TCT TCG GTA CCG GAA GCT G |

PCR- Primer (5'-3') Human

| | | |
|-------------------------|----------|-----------------------------|
| c-Kit | forward: | CCA CTG GCA GTA CAG AAG CA |
| | reverse: | TGA CTT ACG ACA GGC TCG TG |
| HPRT | forward: | ATG CTG AGG ATT TGG AAA GGG |
| | reverse: | GCA CAC AGA GGG CTA CAA TG |
| Isl-1 | forward: | AGC TAC AGG ACA GGC CAA GA |
| | reverse: | AAA CAG GAG CTC CAG CAA AA |
| Sca-1 | forward: | GTG GTC TGA ATG ACC GTG TG |
| | reverse: | GTG AAG CCT CCC CTT CTA CC |
| α -cardiac actin | forward: | GCC CTG GAT TTT GAG AAT GA |
| | reverse: | GGC TGG AAG AGT GTC TCA GG |
| β -MHC | forward: | GCT GCT CTA CAC CGA CTT CC |
| | reverse: | GCA GTT TCT CTG TGG CCT TC |
| ANP | forward: | CAG TGA GCC GAA TGA AGA AG |
| | reverse: | GGC ACC TCC ATC TCT CTG |

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Allgemein verwendete Geräte

| | |
|---------------------------------|---|
| Anlage für deionisiertes Wasser | Millipore, Eschborn |
| Calcium-Messkammer | Eigenbau des Physiologischen Institutes der J.-L.-U. Giessen |
| Glasgeräte | Schott, Mainz |
| Magnetheizrührer | Jahnke & Kunkel, Staufen |
| Pellet pestle cordless motor | Sigma, Taufkirchen |
| pH-Meter | WTW, Weilheim |
| Pipetten | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Schüttler | Biometra, Göttingen |

Material

| | |
|------------------------------------|--|
| Ultra-Turrax® (Ultra-Zerkleinerer) | IKA-Werke, Staufen |
| Vakuum-Pumpe Vacusafe | IBS INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald |
| Vortexer | Heidolph, Kelheim |
| Wasserbad | Julabo, Seelbach |
| Zentrifuge | Thermo Fischer, Langenselbold |

2.4.2 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände

Western Blot

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| Elektroblotkammer | Biometra, Göttingen |
| Filterpapier | Biotec Fischer, Reiskirchen |
| Flachbettscanner Scan jet 4c | Hewlett Packard, Eschborn |
| Hamiltonspritze (50µl) | Hamilton, Bonaduz, Schweiz |
| Hofer-Elektrophoresekammer | GE Healthcare, Freiburg |
| Hofer-Glasplatten | GE Healthcare, Freiburg |
| Hofer-Plattenklemmen | GE Healthcare, Freiburg |
| Hofer-Profilformer | GE Healthcare, Freiburg |
| Hofer-Spacer | GE Healthcare, Freiburg |
| Immobilon P (PVDF-Membran) | Millipore, Eschborn |
| Netzgerät (TypBiometra) | Biometrische Analytik, Göttingen |
| Thermoblock Dri-Block® DB.2D | Techne AG, Erlangen |

PCR und DNA-Gelelektrophorese

| | |
|--------------------------|--|
| Thermo Cycler | Techne, Wertheim-Bestenheid |
| iCycler™ | BioRad, München |
| NanoDrop® ND-1000 | PEQLAB, Erlangen |
| Elektrophoresekammer | GE Healthcare, Freiburg |
| Geldokumentations-System | Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen |

Material

Zellkultur

| | |
|-----------------------|---|
| Präparationsbesteck | Aeskulap, Heidelberg |
| Langendorff-Apparatur | Eigenbau des Physiologischen Institutes der J.-L.-U. Giessen |
| Gewebehacker | Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten |
| Nylonnetz | NeoLab, Heidelberg |
| Sterilbank | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank | Heraeus, Hanau |
| Mikroskop TMS-F | Nikon, Japan |
| Zellschaber | Becton Dickinson, Heidelberg |

System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

| | |
|----------------------------|---|
| Interface INT4 | Scientific Instruments GmbH, Heidelberg |
| Mikroskop | TMS-F von Nikon, Japan |
| Monitor | Philips One Dimensional Camera ZK4, Köln |
| One Dimensional Camera ZK4 | Scientific Instruments GmbH, Heidelberg |
| Oszillograph | Scientific Instruments GmbH, Heidelberg |
| Stimulator | Eigenbau des Physiologischen Institutes der J.-L.-U. Giessen |

Imaging-System für Calcium-Messung

| | |
|----------------------|---|
| Fluoreszenzmikroskop | X 70 Olympus Hamburg, Deutschland |
| Kamera | U-CMT Olympus Hamburg, Deutschland |
| Interface | ITC-16 Instrutech Long Island NY, USA |
| Computer | PC IBM kompatibel |
| Software | Tillvision V3.3 T.I.L.L. Photonic Martinsried, Deutschland |

Material

| | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Pipetten Falcon 5 ml | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Pipetten Falcon 10 ml | Becton Dickinson, Heidelberg |
| Pipettenspitzen | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml) | Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg |
| Sterilfilter, 0,2 µm Porenweite | GE Healthcare Europe, München |
| Sterilium® classic pure | Bode Chemie, Hamburg |
| Zellschaber | Becton Dickinson, Heidelberg |
| 0, 2 ml Thermo-strip (tubes+cups) | ABgene®, Hamburg |

Software

| | |
|----------------------------|---|
| Adobe Photoshop® | Adobe Systems, San Jose., USA |
| Microsoft Windows 7® | Microsoft Corp., Redmond, USA |
| Microsoft Word 2007® | Microsoft Corp., Redmond, USA |
| Microsoft Excel 2007® | Microsoft Corp., Redmond, USA |
| iCycler iQ™ | Bio-Rad, München |
| Quantity One® | Molecular Dynamics, Krefeld |
| SPSS Statistics 17.0 | SPSS GmbH Software, München |
| NanoDrop® ND-1000 | PEQLAB, Erlangen |
| Image Quant™ 3.3 | Molecular Dynamics, Krefeld |
| Till Vision® | TILL Photonics GmbH, München |
| BZ-Observation Application | Keyence GmbH, Neu-Isenburg |
| BZ-Analyzer | Keyence GmbH, Neu-Isenburg |
| Alpha DigiDoc RT2 | Sigma, Taufkirchen |
| Analysis Tool Software | Ray Biotech Inc., Georgia |
| MUCELL | Scientific Instruments GmbH, Heidelberg |

2.5 Puffer und Lösungen

Häufig verwendete Puffer werden als mehrfach konzentrierte Stammlösungen mit Millipore-Wasser angesetzt und steril filtriert. Falls nicht anders angegeben beziehen sich die Angaben auf einen Liter Puffer.

M 199/ HEPES- Stammlösung

| | |
|-------------------------|-----------|
| Medium 199/Earl`s Salts | 9,8 g/l |
| HEPES | 15 mmol/l |
| | pH 7,4 |

CCT-Kulturmedium

| | |
|----------------------------|-------------|
| M 199 / HEPES-Stammlsg. | x ml |
| Creatin | 5 mM |
| Carnitin | 2 mM |
| Taurin | 5 mM |
| Penicillin | 100 IU / ml |
| Streptomycin | 100 µg / ml |
| Cytosin-β-Arabinofuranosid | 10 µM |

Vorplattiermedium

| | |
|-------------------------|---------------|
| CCT-Medium | x ml |
| FCS | 4 % (vol/vol) |
| Penicillin/Streptomycin | 2 % (vol/vol) |

Ausplattiermedium/Waschmedium für isolierte Zellen

| | |
|-------------------------|---------------|
| CCT-Medium | x ml |
| Penicillin/Streptomycin | 2 % (vol/vol) |

Material

Powell-Medium zur Isolierung von Herzmuskelzellen der Ratte

| | |
|---------------------------------|----------|
| NaCl | 110,0 mM |
| KCl | 2,6 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,2 mM |
| MgSO ₄ | 1,2 mM |
| NaHCO ₃ | 25,0 mM |
| Glucose | 11,0 mM |

Auftrags-Puffer

| | |
|----------------|-----------------|
| 10 x TAE | x ml |
| Bromphenolblau | 0,25 % (wt/vol) |
| Glycerin | 50 % (wt/vol) |

100bp-Marker

| | |
|--------------------|-------|
| DNA Ladder (100bp) | 5 µl |
| Auftragspuffer | 10 µl |
| 1 x TAE | 58 µl |

50 x TAE

| | |
|------------|-------|
| Tris | 2 M |
| Eisessig | 1 M |
| 0,5 M EDTA | 50 mM |

10 x PBS

| | |
|--|----------|
| KCl | 2,7 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 mM |
| NaCl | 150,0 mM |
| Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O | 8,1 mM |

Material

10 x TBS

| | |
|------|--------|
| Tris | 10 mM |
| NaCl | 150 mM |
| | pH 7,4 |

Stammzell-Medium (Outgrowing Medium)

| | |
|-------------------|----------------|
| IMDM | x ml |
| FCS | 10 % (vol/vol) |
| Streptomycin | 100 µg/ml |
| Penicillin | 100 U/ml |
| L-Glutamine | 2 mmol/l |
| 2-Mercaptoethanol | 0,1 mmol/l |

Spezielles Stammzell-Medium (Cardiosphere Medium)

| | |
|-------------------|-----------------|
| DMDM | 65 % (vol/vol) |
| IMDM | 35 % (vol/vol) |
| FCS | 3,5 % (vol/vol) |
| B27 | 0,1 mmol/l |
| Streptomycin | 100 µg/ml |
| Penicillin | 100 U/ml |
| L-Glutamine | 2 mmol/l |
| EGF | 10 ng/ml |
| BFGF | 20 ng/ml |
| Thrombin | 40 nmol/l |
| Cardiotrophin-1 | 40 nmol/l |
| 2-Mercaptoethanol | 0,1 mmol/l |

Material

Perfusions-Medium (modifiziertes Krebs-Henseleit-Medium)

| | |
|---|---------|
| NaCl | 140 mM |
| KCl | 2,7 mM |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,4 mM |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | 1,0 mM |
| NaHCO ₃ | 24,0 mM |
| Glucose | 5,0 mM |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 1,8 mM |

Collagenase-Stammlösung

| | |
|-------------------------------|---------|
| Collagenase (chargenabhängig) | x mg |
| CaCl ₂ (100mmol/l) | 12,5 µl |
| Powell-Medium | 5 ml |

cDNA-Mix (Angaben für 1 Probe)

| | | |
|--------------|--------|--------------------------|
| 5x RT-Puffer | 2,0 µl | |
| Oligo-dt | 1,0 µl | (0,1 mg/ml) |
| dNTP's | 1,0 µl | (10 mmol/l je Nukleotid) |
| DTT | 0,5 µl | (0,1 mol/l) |
| RNAsin | 0,2 µl | (25 U/µl) |
| M-MLV-RT | 0,3 µl | (200 U/µl) |

PCR-Reaktions-Ansatz

| | |
|----------------------------------|---------|
| SYBR [®] Green Supermix | 10,0 µl |
| aqua bidest. | 6,4 µl |
| Primer fw+rev (1:10) | 0,6 µl |

Material

Lysispuffer

| | |
|--------------------|--------------|
| Tris/HCL | 50 mmol/l |
| SDS | 2 % (wt/vol) |
| Mercaptopropandiol | 2 % (wt/vol) |
| Natriumvanadat | 1 mmol/l |
| | pH 6,7 |

Auftragspuffer

| | |
|----------------|----------------|
| Glycerin | 20 % (vol/vol) |
| Aqua bidest | 80 % (vol/vol) |
| Bromphenolblau | 0,1% (wt/vol) |

Trenngele (Angaben für je ein Gel)

| | 7,5 % | 12,5 % | 15 % |
|-------------------|---------|---------|--------|
| AA/BA (30:1) | 5,25 ml | 8,75 ml | 15 ml |
| Trenngelpuffer | 4,75 ml | 4,75 ml | 7,5 ml |
| Aqua bidest | 9,55 ml | 6,0 ml | 7,5 ml |
| SDS 10 % (wt/vol) | 200 µl | 200 µl | 200 µl |
| TEMED | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| APS 10 % (wt/vol) | 200 µl | 200 µl | 300 µl |

Trenngelpuffer

| | |
|----------|-----------|
| Tris/HCl | 1,5 mol/l |
| | pH 8,6 |

Material

Sammelgel

| | |
|-------------------|--------|
| AA/BA (30:1) | 1,2 ml |
| Sammelgelpuffer | 2,5 ml |
| Aqua bidest | 6,4 ml |
| APS 10 % (wt/vol) | 100 µl |
| TEMED | 12 µl |
| SDS 10 % (wt/vol) | 50 µl |

Sammelgelpuffer

| | |
|----------|---------------------|
| Tris/HCl | 0,5 mol/l pH 6,8 |
|----------|---------------------|

Laufpuffer

| | |
|----------|-----------------|
| Glycin | 1,44 % (wt/vol) |
| Tris/HCl | 0,3 % (wt/vol) |
| SDS | 0,1 % (wt/vol) |

Konzentrierter Anodenpuffer (C)

| | |
|----------|---------------------------|
| Tris/HCl | 300 mmol/l |
| Methanol | 20 % (vol/vol) pH 10,4 |

Anodenpuffer (B)

| | |
|----------|---------------------------|
| Tris/HCl | 30 mmol/l |
| Methanol | 20 % (vol/vol) pH 10,4 |

Material

Kathodenpuffer (A)

| | |
|-------------------|----------------|
| Tris/HCl | 25 mmol/l |
| 6-Aminohexansäure | 40 mmol/l |
| Methanol | 20 % (vol/vol) |
| | pH 9,4 |

Antikörperlösung

| | |
|----------|------------------|
| Tris/HCl | 50 mmol/l |
| NaCl | 150 mmol/l |
| Tween 20 | 0,05 % (vol/vol) |
| BSA | 2 % (wt/vol) |
| | pH 7,4 |

AP-Puffer

| | |
|-------------------|------------|
| Tris/HCl | 100 mmol/l |
| MgCl ₂ | 5 mmol/l |
| NaCl | 10 mmol/l |
| | pH 9,5 |

Entwicklerlösung

| | |
|-----------|-------|
| AP-Puffer | 50 ml |
| NBT | 15 mg |
| BCIP | 7 mg |

Fura-2-Lösung

| | |
|--------------------|-------|
| Fura-2 AM (2,5 µM) | 50 µg |
| DMSO | 70 µl |

Material

Waschlösung A

| | |
|-------------|--------|
| 1 x PBS | 100 ml |
| Triton 100% | 1 ml |

Waschlösung B

| | |
|------------|--------|
| 1 x PBS | 100 ml |
| Triton 10% | 1 ml |

3 Methoden

3.1 Gewinnung von Herzgewebe für die Stammzellkultur

3.1.1 Versuchstiere

Zur Gewinnung von kardialen Progenitorzellen werden männliche 12 Monate alte SH-Ratten mit 300-400 g Lebendgewicht sowie männliche Wistar-Ratten (Alter 3-4 Monate) mit einem Lebensgewicht von 200-300 g verwendet. Die Ratten stammen aus der hauseigenen Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere haben freien Zugang zu Wasser und Futter (Standardfutter Altromin®).

3.1.2 Gewinnung von Stammzellmaterial aus dem Rattenherz

Die Ratten werden 1-2 Minuten mit Diethylether narkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Nach Thorakotomie wird das Herz mit der Lunge entnommen und sofort in eine Petrischale mit 4 °C kalter physiologischer Kochsalzlösung überführt. Nach Auswaschen des Blutes erfolgt die Präparation des Herzens durch Trennung von anhängendem Mediastinal- und Pulmonalgewebe. Die Aorta wird möglichst weit distal mit der Pinzette gefasst und hinter der ersten abzweigenden Arterie separiert. Danach wird das Herz mit der Aorta ascendens an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur angeschlossen und durch eine Schlaufe aus Operationszwirn fixiert. Das hierfür verwendete Langendorff-Perfusionsystem wird vor Beginn mit aqua bidest und Perfusionsmedium gespült. Anschließend wird die Anlage luftblasenfrei mit Perfusionsmedium gefüllt und kontinuierlich mit einem Sauerstoff-Carbogen-Gemisch begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten. Das Perfusionsmedium wird in der Perfusionsanlage konstant auf 37 °C gehalten.

Nun erfolgt die retrograde Perfusion des Herzens mit Perfusionsmedium für etwa 2 Minuten bis zur Blutfreiheit. Anschließend wird das Herz unterhalb der Vorhöfe von der Langendorff-Apparatur abgesetzt und mechanisch mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert.

3.1.3 Aufarbeitung des Materials

Die folgenden Schritte werden nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Messina vorgenommen (Messina et al., 2004). Das zerkleinerte Herzgewebe wird in vier unter der Sterilbank bereitstehende Petrischalen überbracht und dort zunächst mit ungefähr 10 ml steril filtriertem, auf 37 °C erwärmtem 1 x PBS (Ca^{2+} - Mg^{2+} -frei) durch leichtes Schwenken und vorsichtiges Absaugen der Flüssigkeit gewaschen. Darauf erfolgt eine dreimalige Behandlung mit einer 37 °C warmen Lösung aus 0,53 mmol/l Trypsin-EDTA, welche zuvor mit 0,05 g/l Collagenase versetzt wurde.

Jede Schale wird mit 4 ml Lösung gefüllt und für genau 5 Minuten in einem mit 5 % CO_2 begasten Brutschrank zum Verdauung des Gewebes inkubiert. Zwischen den Schritten wird die Lösung möglichst ohne Verlust von Gewebe abgesaugt. Im Anschluss wird jede Schale einmalig mit auf 37 °C erwärmtem Stammzell-Medium, welches speziell für Kulturen aus Herzgewebe angesetzt wurde, gewaschen.

Nun werden die Schalen mit jeweils 30 ml des Stammzellmediums gefüllt und nach Abflammen der Deckel in den CO_2 -begasten Brutschrank gestellt. Nach einwöchiger Inkubationszeit werden die Zellen erstmals gewaschen, indem man jeder Schale 15 ml Medium entzieht und durch die gleiche Menge an frisch angesetztem warmem Medium ersetzt. Ab diesem Zeitpunkt werden die Kulturen 3 Wochen lang im Abstand von 2 Tagen nach obiger Methode gewaschen, wobei stets die Überstände der verbrauchten Medien und eine Probe des frischen Mediums bei -20 °C eingefroren und zur späteren Untersuchung katalogisiert und aufbewahrt werden. Dabei werden die Kulturen stets makro- und mikroskopisch auf die Beschaffenheit der Zellen und Anomalien wie Keime und Schimmelbefall kontrolliert.

Nach einer gesamten Inkubationszeit von 4 Wochen werden die Zellen durch Trypsinierung aus den Petrischalen isoliert und zur weiteren Kultivierung auf kleine Petrischalen überführt. Hierbei verteilt man das Material aus einer großen Schale entweder auf 10 Kulturschalen Typ Falcon 3004 oder 20 Kulturschalen Typ Falcon 3001. Zunächst werden die kleinen Schalen vorbehandelt, indem man sie 5 Minuten lang mit je 500 µl Poly-L-Lysine (0,01 %) behandelt und nach dem Waschen mit je 1 ml aqua bidest für 2 Stunden unter der Sterilbank trocknet.

Danach wird das komplette Nährmedium der großen Schalen mit der Pipette gesammelt und eingefroren. Die in der Petrischale anhaftenden Zellen werden mit sterilem und erwärmtem 1 x PBS und im Anschluss mit EDTA gewaschen.

Methoden

Nun versieht man jede große Schale mit 5 ml Trypsin und inkubiert sie für 5 Minuten im Brutschrank. Nach Ablauf der Zeit wird per Mikroskop kontrolliert, ob sich die hellen opaken Zellen vom Boden der Petrischale gelöst haben. Die nun frei im Trypsin schwimmenden Zellen werden vorsichtig per Pipette in spezielles Stammzell-Medium überführt, welches zusätzlich bestimmte Zytokine enthält, welche für das Wachstum und die Differenzierung der Progenitorzellen maßgeblich sind.

Nachdem die Zellen im Medium durch vorsichtiges Aufziehen und Ausblasen der Pipette vermischt wurden, pipettiert man in jede Schale 2 ml Zellmedium (Typ 3004) bzw. in jede Schale 1 ml Zellmedium (Typ 3001) und inkubiert die Schalen zwei weitere Wochen im Brutschrank wobei man sie alle 2 Tage durch Teilerneuerung des Mediums versorgt.

Die entnommenen konditionierten Medien vom letzten Tag der Kultivierung (c-m) werden in nachfolgenden Versuchen durch unterschiedliche Methoden auf ihre Zusammensetzung via Zytokinarray (Punkt 4.8) und in ihrer Wirkung, sowohl auf isolierte Kardiomyozyten als auch auf Ganzherzen, untersucht. An isolierten Kardiomyozyten wird die Beeinflussung durch konditionierte Überstände hinsichtlich der kontraktile Funktion (Punkte 4.2 und 4.9), der Apoptose (Punkt 4.6) und der Proteinbildung (late remodeling) (Punkte 4.3 und 4.5) untersucht. Mit Versuchen an Ganzherzen analysiert man die direkte Funktionsverbesserung ischämischer Herzen anhand der Recovery (early remodeling) (Punkt 4.7.1) und die Expression spezifischer Gene per RT-PCR (Punkt 4.7.2). Als Kontrollen dienen stets die zum jeweiligen Zeitpunkt der Zellwaschung entnommenen unkonditionierten Proben des Nährmediums ohne Zellkultur (p-m).

Für die Charakterisierung werden die ausdifferenzierten Progenitorzellen entweder für Versuche mit Western Blot (Punkt 4.1.3) und RT-PCR (Punkt 4.1.2) geerntet (Schalen Typ 3004) oder zur Detektion von Calcium-Transienten (Punkt 4.1.6) und zur Ermittlung von Stammzellmarkern per Immunfluoreszenz (Punkt 4.1.4) in den Schalen auf Coverslips belassen (Schalen Typ 3001). Unmittelbar vor den Versuchen wird das gesamte konditionierte Medium von den Schalen entnommen und bei -20 °C gelagert.

Während der gesamten Kultivierungsdauer werden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und in bestimmten Abständen Fotos angefertigt, welche das Wachstum und die Entwicklung der Kultur dokumentieren (Punkt 4.1.1).

3.1.4 Gewinnung von Stammzellmaterial aus humanen Biopsien

Im Rahmen einer Kooperation mit der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie und der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen wird bei herzchirurgischen Eingriffen humanes Myokardgewebe gewonnen. Beispiele hierfür sind Korrektur-Operationen der subvalvulären Aortenstenose, des M. Fallot oder die MAZE-Prozedur. Die Patienten entstammen unterschiedlichen Altersgruppen und weisen unterschiedliche Vorerkrankungsmuster auf. Im Vorfeld des Eingriffs erfolgen die Aufklärung der Patienten bzw. der Sorgeberechtigten und deren schriftliche Einwilligung zur Freigabe des Gewebes. Die entsprechende Genehmigung der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen liegt ebenfalls vor (Az. 123/06 vom 22.11.2006). Die Gewebeproben werden noch intraoperativ unmittelbar nach Entnahme unter sterilen Bedingungen in gekühlte kardioplege Lösung überführt (i. d. R. Blutkardioplegie nach Buckberg) und zur Weiterverarbeitung in das Physiologische Institut verbracht, wo stets unverzüglich die weitere Aufbereitung der Probe erfolgt.

Unmittelbar nach Eintreffen des Herzstücks wird es in kalter physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt und mechanisch mit einem Gewebehacker bei einer Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert. Die weitere Bearbeitung des Materials erfolgt analog zu der bei den Ratten unter Punkt 3.1.3 beschriebenen Methode.

3.1.5 Auswertung von Patientendaten

Die im Rahmen der Kooperation erhaltenen Patientendaten- und proben werden auf dem Hintergrund von sowohl aktuellen Operations- und Medikationseinträgen als auch Behandlungen bewertet, welche in früherer Vergangenheit stattgefunden haben. Dabei werden das Alter, das Geschlecht und die kardialen Erkrankungen dokumentiert, aber vor allem der Status der Hypertonie vermerkt. Zur Gruppe der Hypertoniker werden jene Patienten gezählt, die entweder aufgrund ihrer klinischen Erkrankung oder ihrer dokumentierten antihypertensiven Medikation offensichtlich einen ausgeprägten Bluthochdruck aufweisen. Die folgende Tabelle soll einen Überblick über die in dieser Studie untersuchten humanen Patienten, deren Herzmaterial für die Generierung kardialer Progenitorzellen und somit der Gewinnung von konditionierten Überständen diene, geben.

Methoden

| Patient | Alter (Geburtsjahr) | Geschlecht | Kardiale Diagnosen | Hypertonus |
|---------|------------------------|------------|---|------------|
| 1 | 1978 | ♂ | Fallot, ASD, Stenose, Pulmonalinsuffizienz | - |
| 2 | 2006 | ♀ | Fallot | - |
| 3 | 2006 | ♂ | Fallot, VSD, ASD, Pulmonalatresie, PFO | - |
| 4 | 1959 | ♂ | Subaortenstenose, Aorteninsuffizienz, offenes Foramen ovale, Vorhofflimmern, Linksschenkelblock | - |
| 5 | 1983 | ♂ | Fallot, Pulmonalstenose, Bifurkationsstenose | - |
| 6 | 2007 | ♂ | VSD, Fallot, PFO | - |
| 7 | 1956 | ♂ | Mitralinsuffizienz, Vorhofflimmern | x |
| 8 | 1927 | ♂ | Koronare Dreifäßerkrankung, Aortenklappenstenose, Vorhofflimmern | x |
| 9 | 1937 | ♂ | Aortenstenose, koronare Eingefäßerkrankung, Vorhofflimmern | x |
| 10 | 1936 | ♂ | COPD, Mitralinsuffizienz, Vorhofmyxom, koronare Eingefäßerkrankung | x |
| 11 | 1951 | ♂ | Mitralinsuffizienz, Vorhofflimmern | x |
| 12 | 1956 | ♀ | Dreifäßerkrankung, Vorhofflimmern, Lungenschaden | x |

Tabelle 1: Auflistung aller humanen Patienten, deren Herzmateriale für die Gewinnung kardialer Progenitorzellen und anschließende Versuche verwendet wurde. Die Nummerierung ist willkürlich gewählt. Das „-“ steht für Nichthypertoniker und das „x“ für Hypertoniker.

3.2 Isolierung von Herzmuskelzellen

3.2.1 Versuchstiere

Die Herzmuskelzellen, welche man für die Messung der Apoptose, der Myokardzell-Kontraktion und im Weiteren für die Proteinbestimmung im Western Blot verwendet, werden aus männlichen Wistar-Ratten (Alter 3-4 Monate) und männlichen SH-Ratten (Alter 12 Monate) isoliert. Die Zucht und Haltung der Ratten erfolgt im Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig Universität Gießen. Die Tiere erhalten dort freien Zugang zu Nahrung (Standardfutter Altromin[®]) und Wasser.

3.2.2 Präparation ventrikulärer Kardiomyozyten aus Rattenherzen

Frisch isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten bilden die Grundlage der Versuche. Die Methode der Zellisolation wurde von (Piper et al., 1982) entwickelt und nach der Methode von Schlüter und Schreiber weiterentwickelt und durchgeführt (Schlüter et al., 2005).

Zu Beginn der Präparation wird die Langendorff-Perfusionsanlage vorbereitet. Dazu wird der für die Perfusion vorhandene Kreislauf erst mit aqua bidest und dann mit Powell-Medium gespült. Anschließend wird die Anlage mit 80 ml Powell-Medium gefüllt, welches luftblasenfrei zirkulieren muss und für die Dauer der Zellisolation mit Carbogen begast wird. Weisen das zirkulierende Wasser in den Glasmänteln sowie das Powell-Medium eine Temperatur von 37 °C auf, kann mit der Isolierung begonnen werden.

Die Betäubung und Tötung der Ratten sowie die Präparation der Herzen erfolgt wie unter Punkt 3.1 beschrieben. Nach der Eröffnung des Thorax werden die Brustorgane mit einem Scherenschnitt herausgelöst. Sie werden in eine mit 4 °C kalter physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Petrischale überführt. Durch das Schwenken der Organe in der Flüssigkeit werden Blut und Gewebereste entfernt, anschließend wird das Herz von noch anhängendem Mediastinal-Gewebe, den Lungenlappen sowie der Trachea und des Ösophagus befreit und die Aorta freipräpariert.

Methoden

Über die Aorta wird das Herz durch eine Perfusionskanüle an der Langendorff-Apparatur angeschlossen. Mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 Tropfen/sec wird das Herz mit 35 ml Powell-Medium blutfrei perfundiert. Nach Zugabe von 5 ml Collagenase-Stammlösung wird das System geschlossen. Anschließend wird es mit 50 ml Perfusionslösung rezirkulierend für 25 min perfundiert.

Nach der Reperfusion werden die Vorhöfe und die Aorta abgetrennt. Die Ventrikel werden in Stücke geschnitten und anschließend je zweimal quer und längs mittels eines Gewebhackers bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert.

Anschließend wird der Gewebebrei mit 12 ml der Perfusionslösung in einem 50-er Falcon-Röhrchen nachverdaut. Während der 5-minütigen Nachverdauung, welche unter kontinuierlicher Carbogenbegasung stattfindet, wird zur besseren Vereinzlung der Herzmuskelzellen aus dem Gewebeverband der Gewebebrei mit einer 5 ml Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert.

Zur weiteren Behandlung wird die Zellsuspension durch eine Nylongaze mit einer Porengröße von 200 μm filtriert und für 3 Minuten bei 400 rpm/min zentrifugiert. Durch das Zentrifugieren werden Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Collagenase-Lösung von dem Zellpellet, welches durch die intakten Zellen gebildet wird, getrennt. Das Zellpellet wird anschließend in 10 ml Powell-Medium mit einem CaCl_2 -Anteil von 200 $\mu\text{mol/l}$ aufgenommen und nochmals für 2 min bei 400 rpm/min zentrifugiert.

Das auf diese Weise gewonnene Zellpellet wird nochmals in Powell-Medium aufgenommen, welches diesmal einen CaCl_2 -Anteil von 400 $\mu\text{mol/l}$ aufweist, und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese Suspension wird auf Reagenzgläser, deren Anzahl auf die Zahl der präparierten Herzen abgestimmt ist und welche mit 2/3 Powellmedium mit einem CaCl_2 -Anteil von 1 mmol/l gefüllt sind, verteilt. Die Reagenzgläser werden für 1 Minute bei 300 rpm/min zentrifugiert. Durch dieses Protokoll erhält man eine Zellpopulation, die zu ca. 60 – 80 % aus intakten, calciumtoleranten und stäbchenförmigen Kardiomyozyten besteht.

3.2.3 Vorinkubation der Kulturschalen

Das komplette Vorgehen der Vor- und Ausplattierung wird unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Um die Anheftung der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten auf den Kulturschalen zu gewährleisten, werden diese über Nacht bei 37 °C mit Vorplattiermedium inkubiert, welches unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wieder abgesaugt wird.

3.2.4 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Das Zellpellet mit den isolierten Kardiomyozyten wird in CCT-Kulturmedium überführt, zu einer homogenen Suspension vermergt und auf die Kulturschalen Typ 3004 ausplattiert. Anschließend werden die Zellkulturen für zwei Stunden bei 37 °C unter CO₂-freien Bedingungen inkubiert. Nach Anheftung der Kardiomyozyten auf den Schalen werden die Kulturschalen zweimal mit Zellkulturmedium gewaschen, um abgerundete und nicht anheftende Zellen zu entfernen. Der Anteil an lebenden, intakten und stäbchenförmigen Zellen liegt nach dem Waschvorgang bei ca. 90 %. Dem im letzten Waschschrift auf den Schalen verbleibenden Medium werden je 10 µl der zu untersuchenden Substanz hinzugefügt. Hierbei werden die Schalen in zwei zu untersuchende Gruppen aufgeteilt, wobei eine mit einer 1:100-Verdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellkulturen (c-m) und die andere mit einer 1:100-Verdünnung des in der gleichen Kultur eingesetzten Mediums (p-m) als unkonditionierte Kontrolle behandelt wird. Die Verdünnung der Überstände erfolgt in allen Fällen mit sterilem aqua bidest.

3.2.5 Langzeitkultur der isolierten Kardiomyozyten

Die behandelten Kardiomyozyten werden für 24 Stunden bei 37 °C und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit mit den zugesetzten Substanzen inkubiert, bevor sie für weitere Untersuchungen zum Einsatz kommen. Auf diese Weise behandelte Zellen werden für die Untersuchung der Apoptoserate und die Messung der Myokardzellkontraktion verwendet, wobei letztere im Anschluss an die Versuche für die weitere Untersuchung per Western Blot geerntet werden.

3.3. Perfusion isolierter Rattenherzen

3.3.1 Grundlagen

Der Physiologe Oskar Langendorff (1853-1908) entwickelte 1895 eine Methode für Langzeit-Untersuchungen am isolierten, schlagenden Säugetierherzen. Bei dieser Versuchstechnik wird ein Perfusat über die Aorta ascendens Richtung Herz gedrückt und bedingt daraufhin durch die resultierende retrograde Perfusion des Organs den Schluss der Aortenklappe.

Dieser Mechanismus führt zu einer Umleitung des Perfusionsmediums in die Koronararterien und stellt somit eine ausreichende Versorgung des Myokards sicher. Der Abfluss des Perfusats erfolgt über den im rechten Vorhof liegenden Sinus coronarius. Die Ventrikel bleiben weitgehend leer (Döring et al., 1985). Ein intaktes Reizleitungssystem im Zusammenhang mit der Versorgung des Myokards ist die Grundlage für diese spontan schlagende Herzpräparation.

3.3.2 Aufbau der Langendorff-Anlage

Zur Perfusion der isolierten Rattenherzen wird eine Perfusionsanlage nach Langendorff eingesetzt. Die Anlage ist ein Eigenbau des Physiologischen Instituts der J.-L.-U. Gießen (Abb. 3.1).

Die Herzen befinden sich in einer auf 37 °C beheizten, geschlossenen Kammer. In einem über dieser Kammer gelegenen Pufferreservoir wird Perfusat mit Carbogen[®], einem Gemisch aus 95 % Sauerstoff (O₂) und 5 % Kohlendioxid (CO₂), begast, danach durch einen Wärmetauscher geleitet und dabei ebenfalls auf 37 °C erwärmt. Zwischengeschaltete Dreiwegehähne ermöglichen hierbei das Zuführen unterschiedlicher Lösungen. Zur Perfusion wird modifiziertes Krebs-Henseleit-Medium mit pH 7,4 bei einer Temperatur von 37 °C und Begasung mit O₂ und CO₂ verwendet.

Ein in den linken Ventrikel eingebrachter Latexballon und die Perfusionskanüle sind jeweils mit Druckaufnehmern verbunden und dienen zur Messung und Protokollierung.

Dabei werden der Perfusionsdruck (PerfPres), auch diastolischer Aortendruck genannt, der linksventrikuläre systolische (SysP) und der linksventrikuläre diastolische Druck (DiasP), sowie die Herzfrequenz (HF) aufgezeichnet. Zur Bestimmung des mittleren Perfusionsflusses wird das Transonic Flowmeter verwendet.

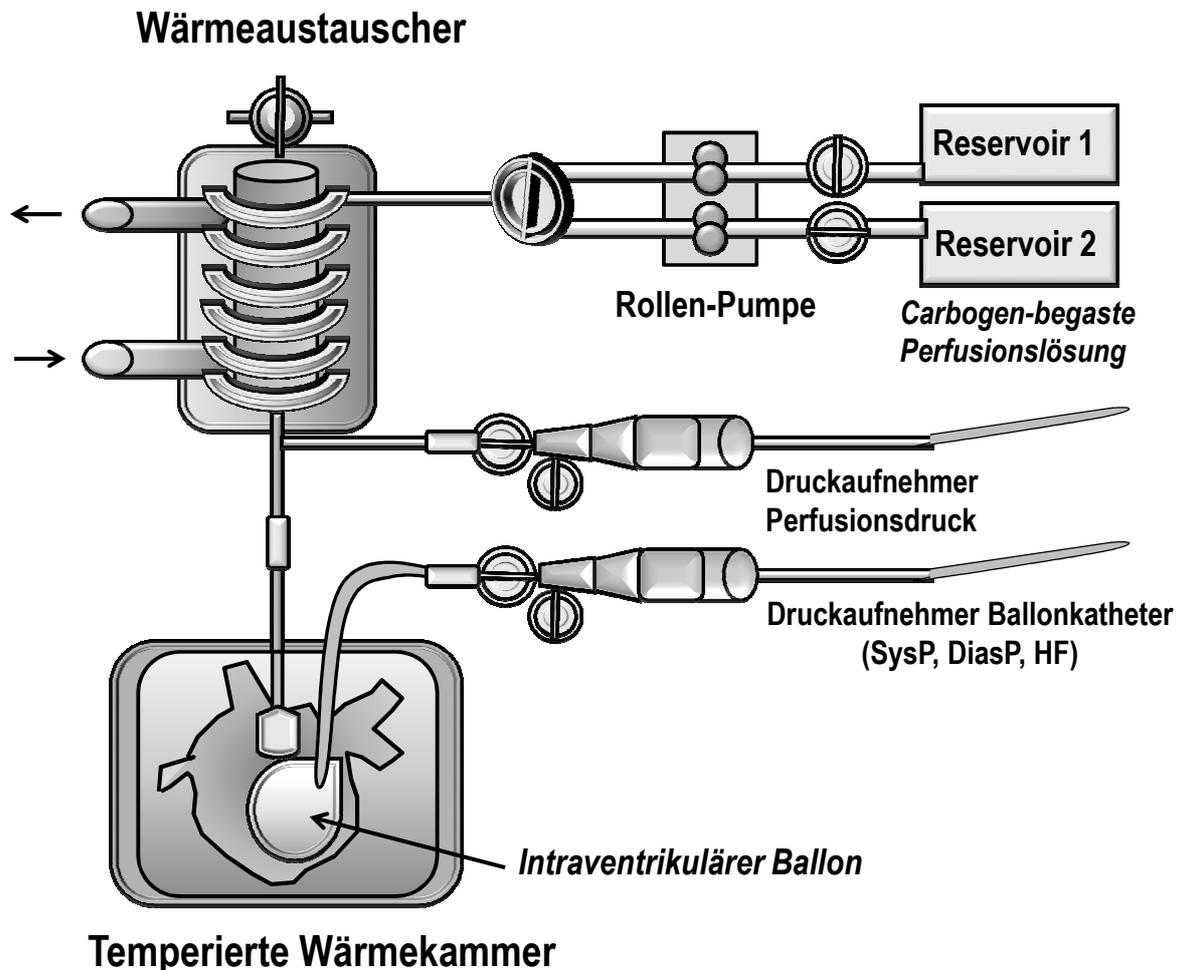


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau der Perfusionsanlage nach Langendorff nach Vorgaben von (Döring et al., 1985) modifiziert

3.3.3 Versuchstiere

Es werden 12 Monate alte männliche SH-Ratten mit 300-400 g Lebendgewicht sowie männliche Wistar-Ratten (Alter 3-4 Monate) mit einem Lebendgewicht von 200-300 g verwendet. Die Ratten stammen aus der hauseigenen Zucht des Tierstalls des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Tiere haben freien Zugang zu Wasser und Futter (Standardfutter Altromin®).

3.3.4 Präparation der isolierten Herzen

Die Betäubung und Tötung der Ratten sowie die Präparation der Herzen erfolgt wie bereits unter Punkt 3.1 beschrieben. Anschließend wird das Herz im Aortenbogen an einer Perfusionskanüle aus Edelstahl der Langendorff – Perfusionsanlage mittels einer Klemme befestigt und mit Operationszwirn endgültig fixiert.

Nach Inzision der freien Wand des linken Vorhofs und Eröffnung der Mitralklappe wird ein Latexballon in den linken Ventrikel vorgeschoben. Ab diesem Zeitpunkt wird das Herz bereits mit erwärmtem, Carbogen[®] - begastem Standardpuffer versorgt. Die Ausgangsrate beträgt 2,5 ml/min und wird während der Stabilisation auf einen mittleren Fluss, der einem Perfusionsdruck von 50 mmHg entspricht, gesteigert.

3.3.5 Versuche unter flusskonstanten Bedingungen

Nach dem Anhängen des isolierten Herzens erfolgen zunächst eine Vorlaufphase von ca. 20 Minuten und eine Stabilisierungsphase von zehn Minuten. Während der Stabilisierung werden der Füllungsgrad des Ballons und die Flussrate langsam auf den Basalwert eingestellt. Dieser beträgt für den diastolischen Druck 10 – 12 mmHg, was einem physiologischen diastolischen Druck entspricht und eine mittlere Flussrate darstellt, die einem Perfusionsdruck von 50 mmHg entspricht.

In situ werden Warmblüter-Hezen mit einem Druck perfundiert, der weitgehend dem diastolischen Aortendruck (70 – 90 mmHg) entspricht, welcher aber für das isolierte Herz zu hoch wäre. Bei salinen Lösungen beträgt der Strömungswiderstand der salinen Perfusionslösung nur etwa 50 % des Plasmawerts, was zu einer verdoppelten Flussrate führt. Durch die konstante unphysiologische Belastung der Aortenklappen kann es außerdem zum Durchschlagen kommen. Aufgrund des fehlenden kolloidosmotischen Drucks wird das Auftreten eines Gewebeödems verstärkt (Döring et al., 1985). Daher wird mit einem niedrigen Perfusionsdruck von 50 mmHg gearbeitet.

Nach der Äquilibrierungszeit erreichen die gemessenen Herzfunktionen ein stabiles Plateau. Durch Ausschalten der Rollenpumpen wird jegliche Versorgung des Herzens unterbrochen, was die Ischämie-Phase von 45 Minuten einleitet. Anschließend werden die Pumpen wieder aktiviert und das Herz für 30 Minuten reperfundiert.

Nun erfolgt die Behandlung mit den konditionierten Überständen (p-m und c-m) der Progenitorzellen für eine Dauer von 10 Minuten. Dabei werden die Überstände in einer 1:100-Verdünnung dem Puffer hinzugegeben, was einer Endverdünnung von 1:10000 entspricht. Diese Lösung wird dann dem System durch Umlegen des Dreiwegehahns zugeführt. Zum Schluss wird nochmals für 80 Minuten perfundiert.

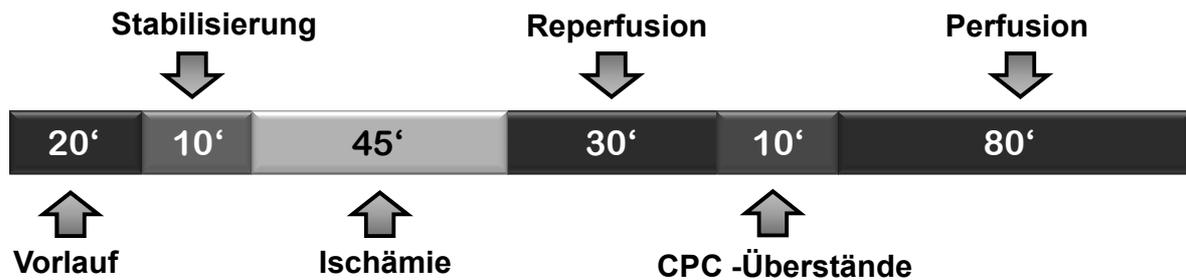


Abb. 3.2: Zeitliches Perfusions-Protokoll der Herzen im Langendorff-Apparat (Dauer: 195 Minuten)

3.3.6 Erfassung der physiologischen Parameter

Es werden fünf unterschiedliche physiologische Parameter erhoben: der Fluss, der Perfusionsdruck, die Herzfrequenz, der systolische sowie der diastolische Druck. Der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) entspricht der Differenz zwischen systolischem und diastolischem Druck. Die Messung des systolischen bzw. des diastolischen Drucks und der Herzfrequenz (HF) erfolgt über den im linken Ventrikel positionierten Latexballon, welcher mit aqua bidest gefüllt und zudem mit einem Druckaufnehmer verbunden ist. Durch den Füllungsgrad des Ballons wird der Druck innerhalb des Ventrikels auf einen Basalwert zwischen 10 – 12 mmHg eingestellt. Dieser Füllungsgrad wird für den Rest des Versuchs konstant gehalten. Für die spätere Auswertung des Versuchs wird das rate-pressure product (RPP) ermittelt. Das RPP stellt das Produkt aus LVDP und Herzfrequenz dar und gilt hier als Maß für die Postinfarkt-Erholung der isolierten Herzen. Die gemessenen Impulse werden über einen externen Aufnehmer und einen Analog-Digital-Wandler zu einem PC übermittelt. Der Perfusionsdruck wird über ein mit a.b. gefülltes Kathetersystem, welches wiederum mit einem Druckaufnehmer verbunden ist, protokolliert. Die Herzen werden nach der Perfusion in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, bei -80 °C aufbewahrt und im Weiteren für die Untersuchung per RT-PCR verwendet.

3.4 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

3.4.1 Technik

Durch fluoreszierende Substanzen kann Licht einer definierten Wellenlänge absorbiert werden. Dies führt dazu, dass bestimmte Elektronen aus dem Grundzustand in einen angeregten, energiereicheren Zustand übergehen. Beim Zurückspringen der Elektronen in den Grundzustand wird ein Teil der aufgenommenen Energie wieder frei und kann beispielsweise als Wärmeenergie abgegeben oder als Fluoreszenzlicht emittiert werden (Schild, 1996).

Zur Untersuchung wird ein invertiertes Fluoreszenz-Phasenkontrast-Mikroskop der Firma Biozero aus der Modellreihe BZ-8000 des Unternehmens Keyence verwendet, welches bereits über einen eingebauten Dunkelraum verfügt. Durch verschiedene Filter können die Zellen bei unterschiedlichen Wellenlängen und im Durchlicht betrachtet und fotografiert werden.

| Fluoreszenzfarbstoff | Absorbtion | Emission | Farbe in der Zelle |
|----------------------|------------|----------|--------------------|
| Cy2 | 494 nm | 525 nm | grün |
| Cy3 | 552 nm | 565 nm | rot |

Abb. 3.3: Absorptions- und Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe Cy2 und Cy3

Durch Erstellung von Bildern unterschiedlicher Wellenlängen ist es möglich Proteine, welche man durch unterschiedliche Primärantikörper spezifisch markiert, in den verschiedenen Zellkompartimenten mit Hilfe von fluoreszierenden Zweitantikörpern sichtbar zu machen (Abb. 3.3 und 3.4).

Nach Anfertigung von Overlays, also der digitalen Verschmelzung zweier Bilder, kann anhand der diversen Färbungen die Häufigkeit und Lokalisation im Zellkompartiment verschiedener Stammzellmarker und kardialer Marker innerhalb der Progenitorzellen detektiert werden. Die Bilder werden mit dem Computerprogramm BZ-Observation aufgenommen und mit dem BZ-Analyzer der Firma Keyence bearbeitet.

3.4.2 Immunzytochemische Färbung der Progenitorzellen

Als immunzytochemische Färbung oder Markierung wird eine Methode bezeichnet, bei der Antigene im Gewebe mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden können. Der Nachweis beruht auf der Affinität von Antikörpern zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop) als Antigen-Antikörper-Reaktion. Auf diese Weise ist es möglich, ein spezifisches Protein im Gewebe zu finden und zusätzlich die Lokalisation in dem Zellkompartiment zu bestimmen.

Im Zuge der Trypsinierung werden in die Zellkulturschalen Typ 3004 Deckgläschen gelegt, welche zuvor in Ethanol geschwenkt und über dem Bunsenbrenner abgeflammt wurden. Nach dem Entfernen des Mediums werden diese mit 1 ml 4 °C kalter TCA (10 %) für 20 min bei 4 °C fixiert.

Nach 30-minütiger Inkubation der Zellen mit der Waschlösung A bei Raumtemperatur erfolgt das Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen mit einer 2 %igen BSA-Lösung für eine Stunde. Die hohe Konzentration des Tritons in der Waschlösung A führt dabei zur Permeabilisierung der Zellmembran.

Die Waschlösung wird abgesaugt und die Zellen mit je 500 µl des ersten Primärantikörpers (GATA-4, Isl-1) für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, werden nach der Inkubationszeit die Progenitorzellen dreimal für jeweils 5 min mit Waschlösung B behandelt. Anschließend werden die Zellen mit je 500 µl des ersten Sekundärantikörpers (Cy2) für 45 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

| Sekundärantikörper | | Primärantikörper | |
|----------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| Cy2 goat anti-rabbit | Isl-1 | GATA-4 | GATA-4 |
| Cy3 sheep anti-mouse | α-cardiac actin | β-MHC | α-cardiac actin |

Abb. 3.4: Antikörper-Verteilung zur Immunfluoreszenz bei Progenitorzellen

Methoden

Ab diesem Vorgang bleiben die Schalen vor direkter Lichteinstrahlung geschützt, um die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers zu erhalten. Es erfolgt nochmals eine dreimalige Behandlung mit Waschlösung B für jeweils 5 min. Zusätzlich wird als Kontrolle der Eigenfluoreszenz stets eine Schale ohne Primärantikörper gleichzeitig mitbehandelt.

Das obige Prozedere wird nun mit einem zweiten Primärantikörper (β -MHC, α -cardiac actin) und einem zweiten Sekundärantikörper (Cy3) wiederholt (Abb. 3.4). Somit gelingt der Nachweis zweier verschiedener Proteine auf einer Schale, welche durch Antikörper unterschiedlicher Wellenlänge markiert sind.

Zum Schluss werden die Deckgläschen aus den Schälchen genommen und mit der Zellseite auf einen mit einem Tropfen Citifluor vorbereiteten Objektträger gelegt. Die auf diese Weise fixierte Probe kann entweder direkt unter dem Mikroskop betrachtet oder bei 4 °C im Dunkeln für einige Tage gelagert werden.

3.5 Nachweis von RNA

3.5.1 Gewinnung von RNA durch Isolierung aus Ganzherzen

Nach der Langendorff-Perfusion werden die gefrorenen Herzen in je 1 ml TriFast[®] Reagenz gegeben und am Ultra-Turrax[®] homogenisiert. Die gewonnene Suspension wird je in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 150 µl Chloroform überschichtet und für mehrere Sekunden am Vortexer vermischt bis eine milchige Trübung eintritt. Bei nachfolgender Zentrifugation, welche stets bei 12.500 rpm für 20 min bei 4 °C stattfindet, erfolgt eine Auftrennung in drei Phasen, wobei die obere klare Phase die RNA enthält. Jene wird in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und im Verhältnis 1:1 mit Isopropanol vermischt.

Während das Isopropanol-RNA-Gemisch über Nacht bei -20 °C inkubiert wird fällt die RNA aus und kann am nächsten Tag in einer erneuten Zentrifugation als Pellet gewonnen werden. Nach Dekantieren des Überstands wird das verbleibende Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol zentrifugiert und somit gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wird das Pellet luftgetrocknet und abschließend in 20 µl a.b. gelöst.

3.5.2 Gewinnung von RNA durch Isolierung aus Progenitorzellen

Nach Entfernen der konditionierten Medien werden die Schalen (Typ Falcon 3004) zunächst mit 1 x PBS gewaschen und nochmals mit je 600 µl 1 x PBS beschickt. Nun wird von jeder Schale die Flüssigkeit mit enthaltenen Progenitorzellen abgeschabt und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Abschaben wird nochmal mit 600 µl 1 x PBS wiederholt, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. Dieses wird für fünf Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert.

Der flüssige Überstand wird verworfen und das erhaltene Zellpellet bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wird mit 500 µl TriFast[®] Reagenz mit dem pellet pestle homogenisiert und mit 50 µl Chloroform überschichtet. Die anschließende Aufbereitung erfolgt wie bei den Ganzherzen.

3.5.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wird das Gerät NanoDrop® ND-1000 verwendet. Hierbei handelt es sich um ein UV/Vis-Spektralphotometer, mit dem RNA-, DNA- und Protein-Konzentrationen schnell und sehr genau ermittelt werden können. Dieses Gerät misst im Wellenlängenbereich von 120-750 nm, wobei der Messungsbereich für RNA zwischen 1,5 – 3.000 ng/µl liegt.

Aus der Probenlösung werden 1,5 µl auf den Sensor des NanoDrop® pipettiert und die Messung unverzüglich gestartet. Die Werte werden in ng/µl angegeben und sollten für die Weiterbearbeitung im idealen Fall zwischen 200 und 1000 ng/µl liegen. Liegt ein Wert über 1000 ng/µl, so wird die Probe mit aqua bidest bis zum Erreichen eines optimalen Wertes verdünnt.

3.5.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Für die Polymerase-Kettenreaktion muss die isolierte RNA in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben werden. Dazu wird von jeder Probe eine Menge von 1 µg RNA/5 µl benötigt. Da alle Proben unterschiedliche Konzentrationen an RNA enthalten, wird mit folgender Formel die Menge an Probenlösung errechnet, die entnommen werden muss um auf die oben genannte Konzentration zu kommen:

$$1000 / \text{Wert aus Nano Drop in ng/}\mu\text{l} = \text{Menge an zu entnehmender RNA-Lösung}$$

Die entsprechende Menge RNA wird entnommen und mit aqua bidest auf 5 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Die Proben werden in den Thermocycler verbracht und dort für 15 Minuten bei 60 °C denaturiert, damit sich die im cDNA-Mix enthaltene Reverse Transkriptase optimal an die RNA anlagern kann.

Die Proben werden mit je 5 µl cDNA-Mix versetzt und erneut in den Thermocycler verbracht. Die reverse Transkription erfolgt bei 37 °C für 1 Stunde. Abschließend werden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, um die entstandene cDNA zu denaturieren und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -20 °C.

3.5.5 Real-time Polymerase Kettenreaktion (RT- PCR am iCycler®)

Die RT-PCR dient der gezielten Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden. Als Starthilfe für die PCR sind Primer notwendig. Diese kurzen, einzelsträngigen DNA-Moleküle sind zu einem spezifischen Abschnitt einer definierten Sequenz, der DNA-Matrize (Template) komplementär. Damit die DNA-Matrize einzelsträngig vorliegt, wird diese zunächst durch eine hohe Temperatur denaturiert. Anschließend kommt es bei einer für jeden Primer unterschiedlichen Temperatur zur Anlagerung der Primer (Annealing) an die komplementären Sequenzabschnitte.

Nun erfolgt die Verlängerung der Primer entlang der denaturierten DNA-Matrize in 5'3'Richtung (Elongation) durch eine hitzestabile DNA-Polymerase bei 72 °C in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). So werden neue DNA-Stränge mit zur Matrize komplementärer Sequenz erzeugt, die in den folgenden Schritten auch wieder als Matrize dienen. Am Ende eines Zyklus liegt die DNA doppelsträngig vor.

Für die RT-PCR werden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:10 mit aqua bidest verdünnt. Von dieser Verdünnung werden 3 µl in spezielle PCR-tubes pipettiert und mit 17 µl eines PCR-Reaktionsansatzes versetzt. Für jede Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Laufkontrolle dient eine Doppelbestimmung mit reinem PCR-Reaktionsmix.

Der SYBR® Green Supermix enthält einen Farbstoff, der eine Fluoreszenz emittiert sobald er an doppelsträngige DNA bindet. Hierdurch kann nach jedem Zyklus die Menge an vorhandener DNA anhand der Stärke der Emission bestimmt werden.

Die mit dem Reaktionsansatz versetzten Proben werden in den iCycler verbracht und die PCR wird mit dem jeweils primer-spezifischen Protokoll gestartet.

| | | |
|-------------------|---|-----------------------|
| Zyklus 1 (1 x) | Step 1 | 95 °C für 2 Minuten |
| Zyklus 2 (45 x) | Step 1 (Denaturierung) | 95 °C für 30 Sekunden |
| | Step 2 (Annealing) | X °C für 30 Sekunden |
| | Step 3 (Amplifikation) | 72 °C für 30 Sekunden |
| Zyklus 3 (100 x) | Step 1 | 50 °C für 10 Sekunden |
| | (Temperatursteigerung in 0,5 °C-Schritten bis 100 °C) | |

Für jeden Primer wird in diesem Basisprotokoll die für ihn optimale Annealing-Temperatur eingestellt. Im 1. Zyklus wird das Proben-Reaktionsansatz-Gemisch auf 95 °C erhitzt, um die im Supermix enthaltene „Hot-Start“-Polymerase zu aktivieren. Zudem denaturiert bei dieser Temperatur die DNA, so dass die beiden DNA-Stränge getrennt voneinander vorliegen. Während des Annealing binden die Primer an den jeweils komplementären Strang der DNA.

Bei 72 °C erfolgt nun die Neusynthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts durch die im Supermix enthaltene DNA-Polymerase mit den ebenfalls enthaltenen Desoxyribonukleotiden. Demnach verdoppelt sich in jedem PCR-Zyklus die Menge der spezifisch gesuchten DNA, wodurch die Gesamtmenge der DNA exponentiell zunimmt. Nach Beendigung der PCR werden die PCR-tubes bei -20 °C eingefroren.

3.5.6 Auswertung der PCR

Die Auswertung der RT-PCR erfolgt mit dem Computerprogramm iQ5™ Optical System Software Version 2.0 von Bio-Rad. Die hier beschriebene Real-time PCR erlaubt eine semiquantitative Aussage über die Expression der untersuchten Gene in den Herzmuskelzellen der Versuchstiere. Eine Aussage über die absolute RNA-Menge in den Zellen kann hierbei nicht getroffen werden.

Die Auswertung erfolgt als relative Quantifizierung nach der Methode von Pfaffl (Pfaffl, 2001). Bei dieser Methode wird der Ct-Wert des Ziel-Gens in Beziehung zum Ct-Wert eines Housekeeping-Gens gesetzt, wodurch sich quantitative Aussagen treffen lassen. Ein Housekeeping-Gen muss in ausreichender Menge in den untersuchten Zellen vorliegen und es darf unter den verschiedenen Versuchsbedingungen nicht mit reguliert werden. Als Referenz-Gen in dieser PCR wird die HPRT verwendet.

Bei einer angestrebten Effektivität von 100% eines Primers sowie einer maximalen Sensitivität und Spezifität verdoppelt sich die Menge der Amplifikate in jedem Zyklus der PCR. Zu Beginn der Reaktion sind noch sehr wenige Produkte und dementsprechend auch nur wenig doppelsträngige DNA vorhanden. Das geringe Fluoreszenzsignal kann nicht vom Hintergrund unterschieden werden und überschreitet den Schwellenwert (threshold) noch nicht.

Erst nach einigen Amplifikationsschritten ist die DNA-Konzentration hoch genug damit ein entstehendes Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

Die Höhe des Schwellenwertes wird so festgelegt, dass der Schnittpunkt der Kurve aller Proben mit dem Threshold (Ct-Wert) möglichst im Bereich des beginnenden exponentiellen Anstiegs der Kurven liegt.

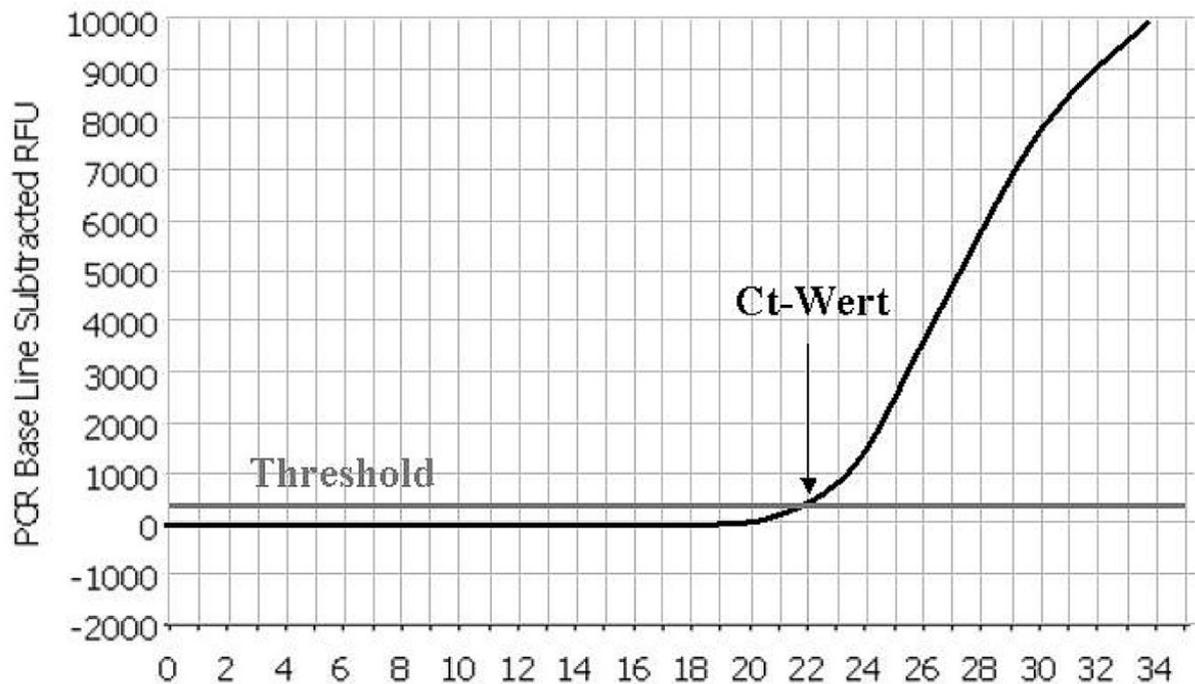


Abb. 3.5: Fluoreszenzverlauf einer Probe während der RT-PCR (schwarz). Der gesetzte Schwellenwert (threshold) ist dunkelgrau dargestellt. Der Schnittpunkt beider Funktionen ist der sogenannte Ct-Wert.

Da für jede Probe Doppelbestimmungen durchgeführt werden, wird von den erhaltenen Ct-Werten zunächst jeweils der Mittelwert bestimmt. Dieser Mittelwert wird dann direkt in Beziehung zu den Mittelwerten der Ct-Werte des Housekeeping-Gens HPRT gesetzt. Die relative Expression eines Zielgens wird beschrieben durch eine Exponentialfunktion zur Basis Zwei mit dem Exponenten $-\Delta Ct$.

$$\Delta Ct (\text{Zielgen}) = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Housekeeping-Gen})$$

$$\text{Relative Expression (Zielgen)} = 2^{-\Delta Ct (\text{Zielgen})}$$

3.5.7 Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung des Gels werden 3 g Agarose in 200 ml kochendem 1 x TAE-Puffer gelöst und mit 10 µl SYBR® Safe, einem DNA-interkalierenden Farbstoff, versetzt. Nach kurzem Abkühlen wird das Gel-Gemisch in eine Plastikwanne gegossen, Plastikkämme zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt und das Gel abgedunkelt. Nach dem Aushärten werden die Kämmen entfernt und das Gel in eine horizontale Elektrophorese-Kammer mit 1 x TAE-Gelpuffer überführt.

Nun werden in die erste Tasche 10 µl 100bp-Marker pipettiert und in die übrigen Taschen je 10 µl der Proben aus den PCR-tubes, welche zuvor mit je 2 µl des Auftragspuffers vermischt wurden. Die PCR-tubes enthalten die unter Punkt 3.5.5 eingefrorenen Proben, welche nach Abschluss der RT-PCR als denaturierte DNA-Fragmente vorliegen.

Die Elektrophorese wird bei 96 Volt für 45 min durchgeführt, anschließend werden die DNA-Fragmente mit einem UV-Transilluminator im Geldokumentations-System der Firma Intas bei 366 nm sichtbar gemacht. Mit der Bildbearbeitungssoftware Alpha DigiDoc RT2 wird das über die angeschlossene Kamera aufgezeichnete Bild eingestellt. Bei einer Belichtungszeit von 10 Sekunden wird eine Fotografie des Geles angefertigt. Anhand des 100bp-Markers und der Lage der Fragmente kann so das gesuchte Protein identifiziert werden. Durch Vergleich der Probenbanden mit den Banden bekannter Größe aus dem definierten 100bp-Marker kann so die Größe der DNA-Fragmente bestimmt werden.

3.6 Proteinnachweis im Western Blot

3.6.1 Probenvorbereitung

Die Ernte der Zellen für den Western Blot erfolgt bei isolierten Kardiomyozyten und kardialen Progenitorzellen in gleicher Weise. Nach Entfernen des Waschmediums bzw. der konditionierten Überstände wird den Schalen des Typs Falcon 3001 200 µl und den Schalen des Typs Falcon 3004 400 µl Lysispuffer zugegeben.

Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Zugabe von Benzonase in einer Endkonzentration von 50 U/ml bleiben die Schälchen für weitere 10 min auf dem Schüttler, anschließend werden die aufgelösten Zellen abgeschabt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Sie werden mit 20 µl Auftragspuffer (Typ 3001) und 40 µl Auftragspuffer (Typ 3004) versetzt und für 10 min im Heizblock bei 65 °C erhitzt.

Die Denaturierung der Proben erfolgt durch das im Lysispuffer enthaltene SDS, welches im Zusammenhang mit dem Vorgang der Erwärmung die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine auflöst sowie eine Streckung der Moleküle bewirkt. Das Mercaptopropandiol führt zu einer Aufspaltung der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen, die Nukleinsäuren werden durch die Zugabe der Benzonase verdaut und das Natriumvanadat hemmt die Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatasen.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Methode dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe bzw. ihrer molekularen Masse im elektrischen Feld. Hierbei zerstört das anionische Detergenz SDS die Disulfidbrücken der Proteine und führt so zur Auflösung der Tertiärstruktur. Die Proteine bilden mit dem SDS eine negativ geladene Verbindung und wandern im elektrischen Feld zu der positiv geladenen Anode. Durch die Porenstruktur des Gels werden größere Proteine eher zurückgehalten als kleinere, dadurch kommt es zu einer Auftrennung nach dem Molekulargewicht.

Das hierfür benötigte Polyacrylamid-Trenngel wird zwischen zwei durch Spacer getrennte Glasplatten, welche aufrecht in einen Ständer gespannt werden, gegossen und mit aqua bidest überschichtet.

Durch den Luftausschluss polymerisiert das Gel innerhalb einer Stunde aus. Nach Abschütten des aqua bidest wird das Trenngel mit einem Polyacrylamid-Sammelgel überschichtet, in welches Profilformer eingesetzt werden. Diese werden nach 20 Minuten entfernt und die Proben werden mit einer Glaskanüle in die entstandenen Taschen gefüllt.

Je nach Größe der gesuchten Proteine wird ein Trenngel in 7,5-, 12,5- oder 15 %iger Konzentration verwendet. Um die Lage des gesuchten Proteins zu bestimmen wird ein Molekulargewichtsmarker (von 10 kDa bis 250 kDa) in die erste Tasche pipettiert. Von den Proben werden jeweils in dreifacher Bestimmung 25 µl pro Tasche aufgetragen. Die mit Proben und Marker beladenen Gelkammern werden in eine Elektrophoresekammer eingehängt, welche mit Laufpuffer gefüllt ist. Bei einer Spannung von 200 V findet in zwei bis vier Stunden (je nach Proteingröße) die Gelelektrophorese statt.

3.6.3 Western Blot Verfahren

Im Anschluss an die SDS-PAGE werden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine vom Polyacrylamid-Gel mittels des „Semi Dry Blotting-Verfahrens“ (Kyhse-Andersen, 1984) auf eine PVDF-Membran transferiert.

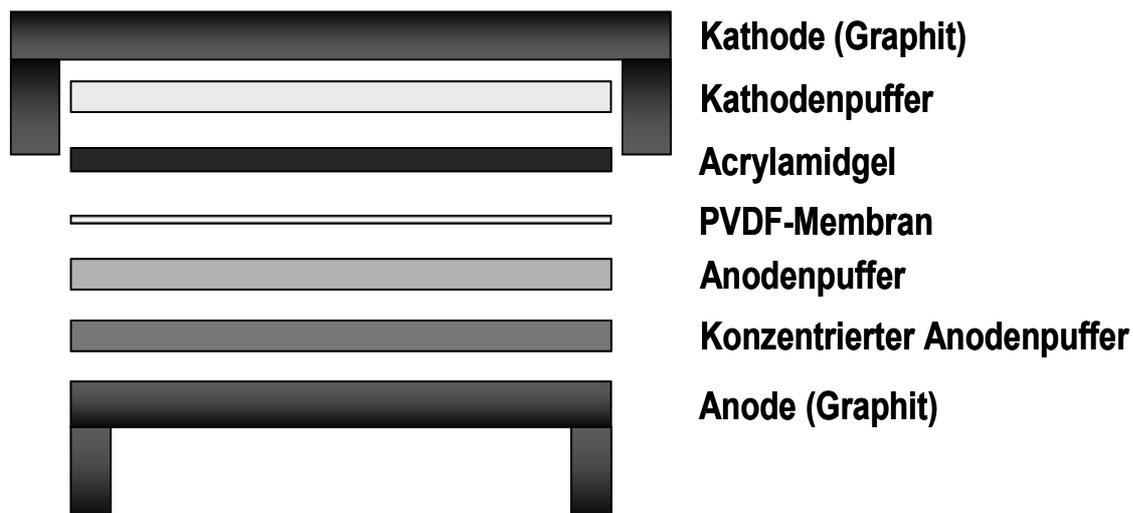


Abb. 3.6: Schematischer Zusammenbau des Semi Dry Blotting-Verfahrens

Hierfür werden je drei Filterpapiere, getränkt mit konzentriertem Anodenpuffer (C) und mit Anodenpuffer (B) luftblasenfrei in eine Blotkammer geschichtet. Darauf werden nacheinander die in 100 %igem Methanol getränkte PVDF-Membran und das Polyacrylamid-Gel gelegt und dieses abschließend mit drei in Kathodenpuffer (A) getränkten Filterpapieren belegt (Abb. 3.6).

Der Boden der Blotkammer dient als Anode, der Deckel als Kathode. Bei einer konstanten Spannung von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ werden in ein bis drei Stunden (je nach Größe) die Proteine vom Polyacrylamid-Gel auf die PVDF-Membran übertragen.

3.6.4 Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran werden die gesuchten Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar gemacht. Hierbei werden zunächst die noch verbleibenden freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch Zugabe von 1 x TBS, welche mit 3 %iger BSA versetzt ist, gesättigt. Somit kann der Antikörper spezifisch das gesuchte Protein binden. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für eine Stunde auf dem Schüttler.

Danach wird die Membran für 5 Minuten in 1 x TBS gewaschen und anschließend mit dem 1. Antikörper inkubiert. Dieser 1. Antikörper reagiert spezifisch mit dem zu ihm gehörenden Antigen auf der Membran und geht mit diesem einen Antigen-Antikörper-Komplex ein. Nach zweistündiger Inkubation wird der 1. Antikörper entfernt und die Membran mit 1 x TBS, versetzt mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100, zweimal für 5 Minuten gewaschen um restliche ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit dem 2. Antikörper. Dieser 2. Antikörper, welcher spezifisch am 1. Antikörper bindet, ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt.

Auch im Anschluss an diese Inkubation wird mit 1 x TBS, versetzt mit 0,5 % (vol/vol) Triton X-100, gewaschen um Reste des ungebundenen Antikörpers zu entfernen. Nun wird die Membran für eine Minute in AP-Puffer verbracht um sie zu äquilibrieren. Zum Schluss werden die gesuchten Proteinbanden auf der Membran durch Zugabe einer Entwicklerlösung sichtbar gemacht. Die an den 2. Antikörper gebundene alkalische Phosphatase dephosphoryliert das in der Entwicklerlösung enthaltene BCIP und reduziert gleichzeitig das ebenfalls enthaltene NBT.

Hierdurch entsteht ein schwer lösliches blau-violettes Präzipitat, welches den Antigen-Antikörper-Komplex und somit die gesuchte Proteinbande sichtbar macht. Der Entwicklungsprozess findet unter Lichtausschluss statt und wird bei eindeutigem Sichtbarwerden der Banden durch Abspülen der Membran mit aqua bidest unterbrochen.

3.6.5 Auswertung

Anhand des Rainbow-Markers, welcher sich zusammen mit den Proben im Gel auftrennt, wird die Position der gesuchten Bande ermittelt. Die getrockneten Membranen werden eingescannt, die Signalstärke der einzelnen Proteinbanden densitometrisch erfasst und im Programm Image Quant[®] von Molecular Dynamics quantitativ ausgewertet. Als Referenzprotein dient das in der jeweiligen Probe enthaltene β -Actin, dessen Bandenintensität ins Verhältnis zur Bandenintensität des untersuchten Proteins gesetzt wird.

3.7 Detektion von Calcium-Transienten

3.7.1 Inkubation der Progenitorzellen

Die im Versuch verwendeten Progenitorzellen werden wie bei der Immunzytochemie auf sterilen Coverslips in kleinen Schalen gezüchtet. Um die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu bestimmen, werden die Zellen mit je 7 μl Fura-2-Lösung in 1 ml CCT-Medium beladen und für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach 30-minütiger Beladungszeit wird der Coverslip in die Calcium-Messkammer eingespannt, mit 1 ml warmem CCT-Medium überschichtet und durch das Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Während der Messungsdauer von 30 Minuten pro Schale wird über eine Heizplatte eine Temperatur von 37 °C gewährleistet. Die Anregung von Fura-2 erfolgt mit den Wellenlängen 340 und 380 nm.

3.7.2 Calciumdetektion

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 ist ein sehr selektiver Indikator für Calcium-Ionen. Er bindet zwar auch andere bivalente Kationen (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} und Fe^{2+}), der Fluoreszenzeffekt ist jedoch vergleichsweise sehr gering und die Affinitäten von Fura-2 sind gegenüber diesen Ionen deutlich geringer als gegenüber verwandten Farbstoffen (Grynkiewicz et al., 1985).

In diesen Versuchen wird die ungeladene, lipophile Form Fura-2-AM verwendet. Fura-2 ist ein Ca^{2+} -Chelator und gelangt als Acetoxymethylester in die Zellen. Dort wird er hydrolytisch durch unspezifische Esterasen zur freien Säure Fura-2, Formaldehyd und Acetat gespalten und kann als geladenes Molekül nicht mehr durch die Membran permeieren. Verbindet sich der Farbstoff mit Calcium-Ionen, beginnt er zu fluoreszieren. Fura-2 hat dabei den Vorteil, dass es aufgrund seiner charakteristischen, von der Anregungswellenlänge abhängigen Leuchtintensität eine quantifizierbare Messung erlaubt. Die Calciumkonzentration in der Zelle kann unabhängig von der Gesamtmenge des aufgenommenen Farbstoffes, der Wegstrecke des Lichts oder der Sensitivität der Messinstrumente ermittelt werden, da sich bei Fura-2 das Emissionsmaximum in Abhängigkeit von der Calciumbindung zu einer anderen Anregungswellenlänge verschiebt.

Die Daten der Fura-2-Messungen werden als Ratio (340 nm/380 nm) wiedergegeben.

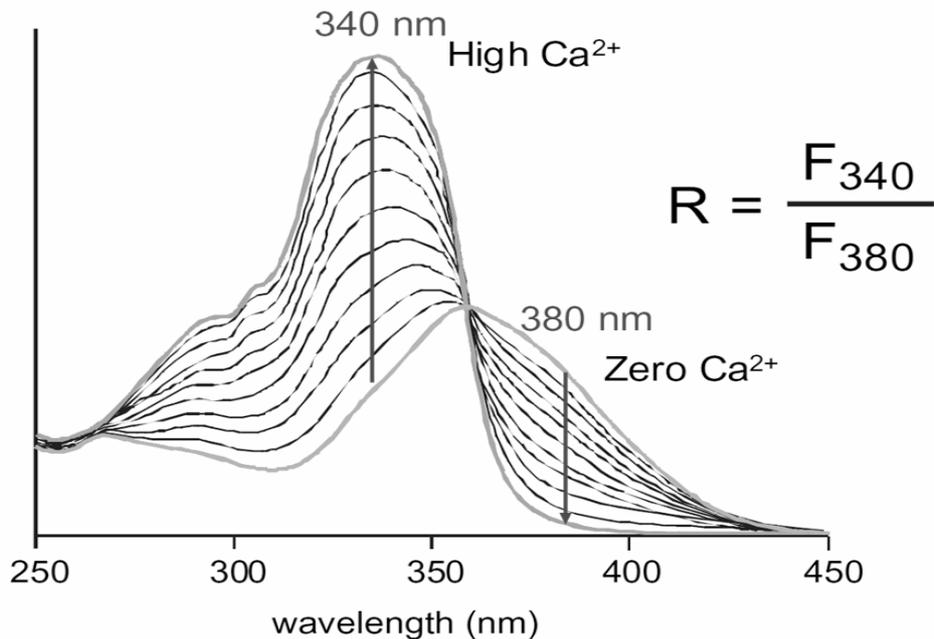


Abb. 3.7: Darstellung der Emissionmaxima bei 340 nm und 380 nm in Bezug auf die intrazelluläre Konzentration von Calcium Quelle: Rainer Strotmann, Molecular Biochemistry, Medical Faculty, IZKF Leipzig

3.7.3 Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Messungen basieren auf der Fluoreszenzmikroskopie. Die Beobachtung der Progenitorzellen erfolgt durch ein Öbektiv mit 40-facher Vergrößerung, so dass im Gesamtbeobachtungsareal 20-30 Zellen detektiert werden. Nachdem die geeigneten Zellen im Sichtfeld justiert sind, wird der Strahlengang des Mikroskops auf die CCD-Kamera umgestellt. Nun kann mittels der Ansteuerungs- und Analysesoftware Till Vision[®] ein „Schnappschuss“ bei 340 nm der im Sichtfeld scharfgestellten Zellen erstellt werden. Die Fluoreszenzwerte werden in Abhängigkeit ihrer Stärke von der Software in Falschfarben und Zahlenwerte umgesetzt. Die Farbskala reicht dabei von Dunkelblau bis Blau über Grün und Gelb bis hin zu Rot. Die dunkelblauen Bereiche der Aufnahme stellen Regionen mit geringer bis gar keiner Fluoreszenz dar.

Zellen mit intensiver Fluoreszenz und somit hoher Menge an freiem intrazellulärem Calcium werden grün bis gelblich dargestellt. Die zu messenden Progenitorzellen werden als regions of interest (ROI) markiert und die Veränderungen der Ca²⁺-Konzentration innerhalb dieser Regionen im Verlauf des Experimentes ermittelt.

3.7.4 Entstehung des Signals

Von einer Xenonlampe generiertes Licht wird mittels eines Monochromators gefiltert bis einwelliges Licht entsteht. Dieses Licht wird über einen Dichroidspiegel auf die zuvor mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Progenitorzellen in der Kammer gerichtet. Dadurch wird der Farbstoff angeregt und das emittierte Licht gelangt durch ein inverses Mikroskop, den Dichroidspiegel und einen Emissionsfilter schließlich zu einer Kamera, die das eintreffende Signal aufzeichnet.

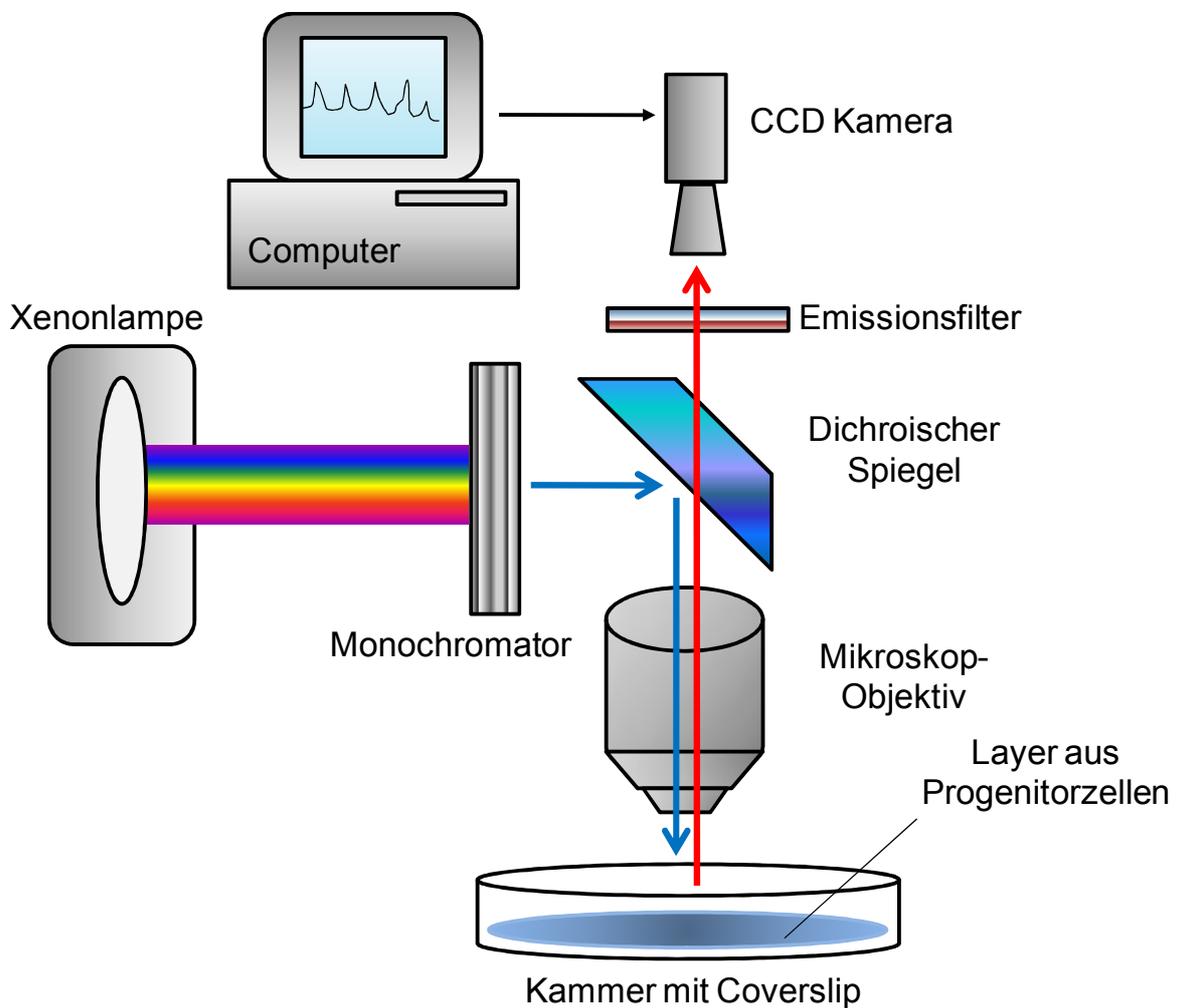


Abb. 3.8: Vereinfachte schematische Darstellung der Apparatur zur Messung von Calcium-Transienten (Anregungslicht = blaue Linie, Emissionslicht = rote Linie)

3.7.5 Auswertung

Die Erfassung von Ca^{2+} -Transienten erfolgt mit dem Programm Till Vision[®] von TILL Photonics GmbH. Bei Start des Versuchs werden über einen Zeitraum von einer halben Stunde die Emissionen der Zellen sowohl quantitativ ausgewertet und in einer Grafik als Kurve dargestellt als auch in Form eines Videos aufgezeichnet, welches später auf Calcium-Transienten analysiert werden kann.

Vom Programm wird bei einer Belichtungszeit von 15 ms über einen Zeitraum von einer halben Stunde alle sechs Sekunden ein Bild gespeichert. Alle angefertigten Bilder können hinterher einzeln oder als zusammenhängendes Video im Zeitraffer betrachtet und analysiert werden.

Das Mikroskop ist mit einer CCD-Kamera und einem Controller verbunden, die beide zum Fura-2 Data Acquisition System gehören (Till Photonics). Mit Hilfe der Image-Analyse-Software Till Vision[®] werden die erfassten Emissionen in Zahlenwerte (Ratio-Werte) umgesetzt und auf dem Monitor in Form einer Grafik dargestellt. Gleichzeitig werden diese Daten für die Auswertung des Versuchs auf einer Festplatte gespeichert.

3.8 Messung der Myokardzellkontraktion im elektrischen Feld

3.8.1 Elektrische Stimulation und Steuerung der Kontraktion

Die Methode der Myokardzellkontraktion im elektrischen Feld wurde bereits 1997 von Schlüter et al. beschrieben.

Die Schalen Typ 3001, die nach dem unter Punkt 3.2.4 beschriebenen Schema für 24 Stunden inkubiert worden sind werden dem Brutschrank entnommen, auf den Objektisch des Mikroskops gestellt und mit einem speziellen Deckel verschlossen. Dieser Deckel ist innen mit zwei parallel verlaufenden Drähten bestückt, welche in der Mitte der Schale einen Knick beschreiben, so dass sie über die größte Länge der Schale in die Flüssigkeit eintauchen. Diese parallel im CCT-Medium verlaufenden Drähte bilden die Kathode und Anode für den Aufbau eines elektrischen Feldes zwischen den beiden Polen. Durch die annähernd homogene Drahtform kommt es zu einem relativ gleichmäßigen Stromfluss im Feld zwischen den Drähten und somit durch die untersuchten Zellen.

Die Kardiomyozyten werden durch biphasische Stromstöße einer Frequenz von 0,5 Hertz zur Kontraktion stimuliert, welche von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen ausgelöst werden.

3.8.2 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter werden mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments aus Heidelberg erfasst. Die zu untersuchende Kulturschale befindet sich zum Zeitpunkt der elektrischen Stimulation auf dem Objektisch, wo sie zeitgleich von zwei Kameras erfasst wird. Die Videokamera dient zur Beobachtung des Okularbildes auf einem Monitor. Die Zeilenkamera ist in der Lage verschiedene Helligkeiten zu erkennen und somit die kontrastreichen Übergänge zwischen Zelle und Zellhintergrund zu erfassen. Zur Beobachtung der Zellkontraktion wird die Zeilenkamera so positioniert, dass sich beide Zellenden im Bild der eindimensionalen Zeile befinden. Somit verläuft die Längsrichtung der Zellen annähernd parallel zur Längsrichtung der Kamerazeile. Das Bild der Zeilenkamera wird in elektrische Signale umgewandelt und über ein Interface auf einem Oszillographen dargestellt.

Methoden

Die Ablenkzeit auf dem Horizontalverstärker ist auf 0,1 ms/cm geregelt, der Vertikalverstärker fest auf 5 V/div eingestellt. Durch ein internes Triggern erhält man ein stehendes Bild des Signals. Die Registrierung unterschiedlicher Helligkeiten durch die Zeilenkamera führt zu unterschiedlich starken Ablenkungen auf der y-Achse des Oszillographen. Anhand der horizontalen Bewegung der Amplituden bei der Zellkontraktion kann man die Zellgrenzen am Oszillographen identifizieren.

Über einen zweiten Kanal ist am Oszillographen eine festgelegte Spannung angeschlossen, welche sich als weitere horizontale Linie mit einer fixen Höhe darstellt. Bei nicht abgelesener Spannung wird am Oszillographen eine Linie der Höhe Null angezeigt. Diese Spannung kann extern über das Interface getriggert werden, indem man eine Triggermarke, welche am Bildschirm durch eine Amplitude dargestellt wird, vor die erste Amplitude des Zellbildes setzt. Somit wird der erste Fixpunkt für die linke Seite der Zellgrenze festgelegt. Erreicht nun die Amplitude des Zellbildes durch einen Spannungsanstieg die vorgegebene Triggermarke, so beginnt der Oszillograph die Interface-Spannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen.

Am Bildschirm wird dies als Ausschlag der Linie in Richtung der y-Achse dargestellt. Die Bewegung in Form einer Zellkontraktion kann nun als Verschiebung der Amplitude auf der x-Achse verfolgt werden. An der zweiten Amplitude, welche die rechte Zellgrenze erfasst, verfährt man mit der Triggerung analog. Nach der Einstellung ist es möglich am Bildschirm des Oszillographen die gesamte Zelllänge und ihre Kontraktionen zu verfolgen.

Die Informationen Interface-Spannung „An“ und „Aus“ werden vom Interface an einen Computer weitergeleitet, welcher die Signale mit dem Programm MUCCELL der Firma Scientific GmbH verarbeitet. Anhand der Information der wechselnden Spannungssignale registriert das Programm die Zelllänge zu einem bestimmten Zeitpunkt. Anhand der Zelllänge zu verschiedenen Zeitpunkten, ermittelt MUCCELL einen Graphen, der die Zelllänge in Abhängigkeit von der Zeit darstellt. Diese Kurve beschreibt somit die Kontraktion einer Myokardzelle. Der Beginn einer Kontraktion wird vom Programm durch die einsetzende Längenverkürzung registriert.

3.8.3 Mathematische Verrechnung der Parameter

Aus 4 Kontraktionen werden folgende Mittelwerte ermittelt:

1. Die maximale Zelllänge (diastolische Zelllänge) in Mikrometer
2. Die minimale Zelllänge (systolische Zelllänge) in Mikrometer
3. Die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion (time to peak in Millisekunden)
4. Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (bestimmt aus der ersten Ableitung der Kontraktionskurve)
5. Die maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometer pro Sekunde (Rel_{max})
6. Die Zeit von der 10-prozentigen Kontraktion bis zur vollständigen Zellkontraktion in Millisekunden
7. Die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 90 Prozent der Zellverkürzungsstrecke

Aus diesen Parametern wird der Quotient dL/L errechnet:

Man bildet die Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge. In Prozent ausgedrückt gibt dL/L an, um wie viel Prozent ihrer diastolischen Länge sich die Zelle während der Kontraktion verkürzt.

Nach dieser Methode werden pro Schale zehn Zellen gemessen und pro Bedingung (c-m oder p-m) jeweils sechs Schalen untersucht. Zur Auswertung werden jeweils die Einzelkontraktionen aus verschiedenen Präparationen zusammengefasst und der Mittelwert aus diesen bestimmt. Bei Vergleichen zwischen Gruppen wird ein konventioneller T-Test herangezogen. Daten mit $p < 0,05$ werden als „voneinander statistisch signifikant unterschiedlich“ bezeichnet.

3.9 Zytokinnachweis mittels Protein-Array

3.9.1 Ratten-Array

Die Analyse der konditionierten Progenitorzell-Überstände aus Rattenherzen auf sezernierte Zytokine wird mit einem Zytokin-Array (RayBio® Rat Cytokine Antibody Array I) der Firma Ray Biotech Inc. durchgeführt. Durch eine parallele punktförmige Anordnung der spezifischen Antikörper auf einer Nitrozellulosemembran können gleichzeitig 19 Proteine in Zellüberständen detektiert werden. Die Durchführung des Array erfolgt gemäß Herstellerangaben nach dem folgenden Schema.

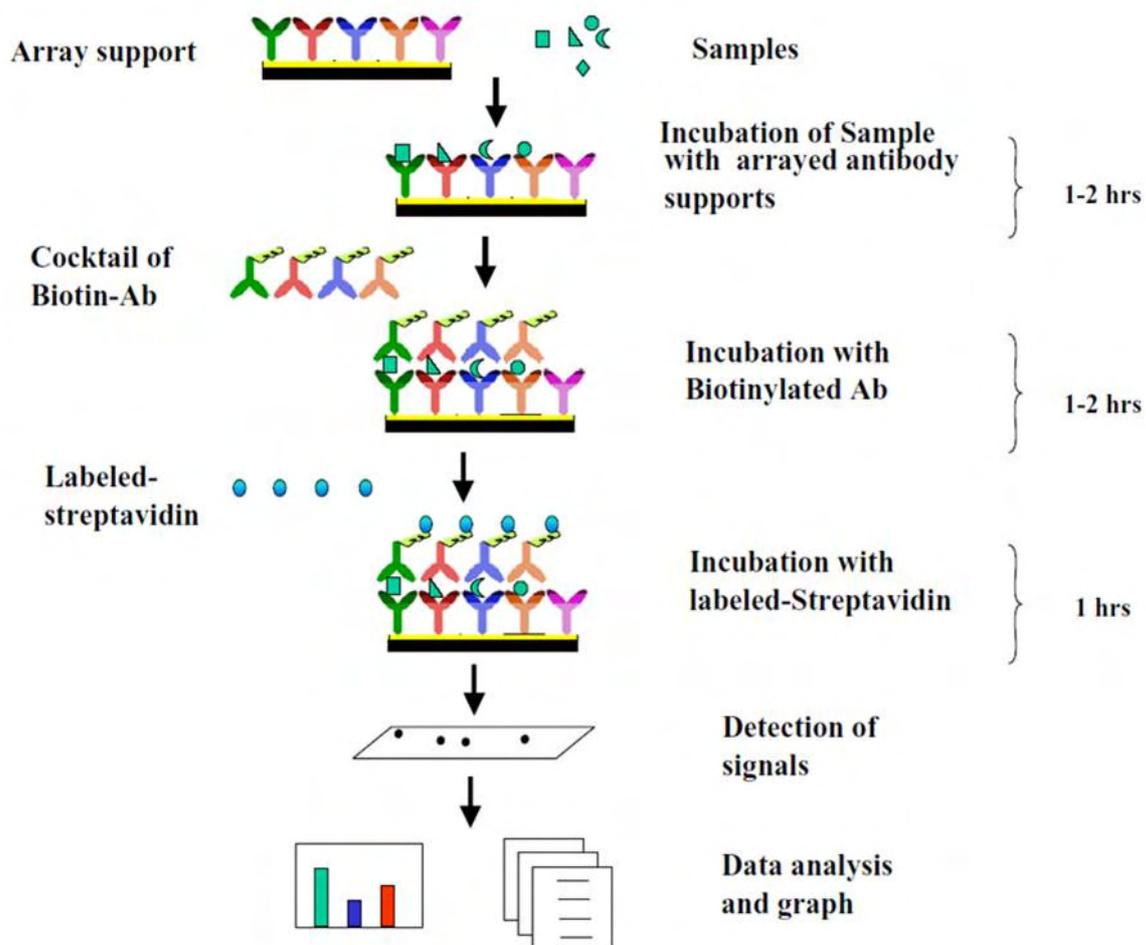


Abb. 3.10: Quelle: RayBio® Rat Cytokine Antibody Array Protocol

3.9.1.1 Durchführung der Blockierung und Inkubation

Bis zur Verwendung werden die Membranen und der Blocking Buffer bei -20 °C gelagert, während die übrigen Substanzen bei 4 °C aufbewahrt werden. Alle Inkubationen werden unter vorsichtigem Schütteln bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor jeder Zugabe einer neuen Substanz wird die vorherige Lösung vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt.

Die Membranen werden mit der Antikörper-beschichteten Seite nach oben in speziell dafür vorgesehene 8-Well-Multischalen gegeben, mit 2 ml Blockierungs-Puffer benetzt und für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgt eine zweistündige Inkubation mit den unverdünnten Überständen der Progenitorzellen.

Nun werden die Membranen mehrfach für jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer I und II behandelt. Von der laut Protokoll mit Waschpuffer I verdünnten Biotin-konjugierten Antikörper-Lösung wird pro Membran 1 ml zugegeben und dann für 2 Stunden inkubiert.

Zum Schluss erfolgt ein weiterer Waschprozess mit beiden Waschpuffern wie oben beschrieben. Nun werden zu jeder Membran 2 ml des 1000-fach verdünnten HRP-konjugierten Streptavidins hinzugegeben und für weitere 2 Stunden inkubiert. Es erfolgt ein letzter Waschschrift nach obigen Angaben.

3.9.1.2 Detektion der Proteine und Entwicklung der Membranen

In jede Kammer der Multischalen werden nun je 250 µl des Detektions-Puffers C und D gegeben und unter leichtem Schwenken für zwei Minuten inkubiert. Die Membranen werden nun mit der Protein-Seite nach oben und der Markierung in der oberen linken Ecke auf eine Glasplatte gelegt und mit der im Kit enthaltenen Plastikfolie luftblasenfrei abgedeckt.

Die Membranen werden im ChemiDoc XRS, einem Phosphoimager der Firma BioRad, entwickelt. In diesem System katalysiert das Enzym-Antikörper-Konjugat eine Chemilumineszenzreaktion. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym ist in diesem Fall die horseradish peroxidase (HRP). Diese katalysiert die Umsetzung von Luminol im Chemolumineszenz-Reagenz in seine oxidierte Form, bei welcher eine Lumineszenz detektiert werden kann. Die Oxidation führt zur Emission von Licht niedriger Intensität bei 428 nm.

In Gegenwart der chemilumineszenten Substrate wird dieses Lichtsignal bis zu 1000-fach verstärkt und kann mit einer Kamera detektiert werden. Während der Entwicklung der Membranen im ChemiDocXRS wird pro Minute ein Bild gespeichert. Die Belichtungszeit für ein Bild beträgt 30 Sekunden. Nach dem Speichern von 15 Bildern wird die am besten entwickelte, noch nicht überstrahlte Aufnahme ausgewählt und ausgewertet.

Nach der Entwicklung der Membran entsteht typischerweise das folgende Bild:

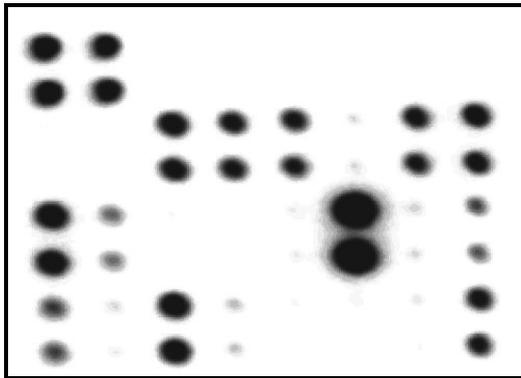


Abb. 3.11: Quelle: RayBio® Rat Cytokine Antibody Array Protocol

3.9.1.3 Auswertung

Die gespeicherten Bilder werden mit dem Programm Image-Quant™ analysiert. Zunächst wählt man aus den gespeicherten Dateien das Bild einer Membran aus, bei welcher noch keine Überstrahlung der Signale stattgefunden hat. Mit Hilfe der Software werden die geschwärzten Bereiche einzeln mit einer Matrix definierter Größe umrandet und somit der Messungsbereich eingegrenzt. Das Programm errechnet dann anhand der Schwärzung der einzelnen Bereiche einen Zahlenwert für jedes Zytokin. Die Werte der Kontrollmembranen mit unkonditioniertem Medium (p-m) werden von den Werten der Membran, welche mit konditioniertem Medium (c-m) behandelt wurden, subtrahiert.

Methoden

Die Werte, welche sich auf die geschwärzten Punkte der Membran beziehen, können anhand der Schablone (Abb. 3.12) den einzelnen Zytokinen zugeordnet werden.

| | | | | | | | |
|--------|---------------|----------------|--------------|--------|---------------|-------|-------------|
| Pos | Pos | Neg | Neg | CINC-2 | CINC-3 | CNTF | Fractalkine |
| Pos | Pos | Neg | Neg | CINC-2 | CINC-3 | CNTF | Fractalkine |
| GM-CSF | IFN- γ | IL-1 α | IL-1 β | IL-4 | IL-6 | IL-10 | LIX |
| GM-CSF | IFN- γ | IL-1 α | IL-1 β | IL-4 | IL-6 | IL-10 | LIX |
| Leptin | MCP-1 | MIP-3 α | β -NGF | TIMP-1 | TNF- α | VEGF | BLANK |
| Leptin | MCP-1 | MIP-3 α | β -NGF | TIMP-1 | TNF- α | VEGF | BLANK |
| BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | Pos |
| BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | BLANK | Pos |

Abb. 3.12: Diese Schablone zeigt die Verteilung der Zytokine auf der Nitrozellulose-Membran, wobei jedem Punkt der entwickelten Membran ein Zytokin zugeordnet werden kann.

(Quelle: RayBio[®] Rat Cytokine Antibody Array I)

3.9.2 Human-Array

Die Analyse der konditionierten Progenitorzell-Überstände aus humanen Herzen auf sezernierte Zytokine wird mit einem Zytokin-Array (Biotin Label-based Antibody Human Array I) der Firma Ray Biotech Inc.[®] durchgeführt. Hierbei können anhand der beiliegenden Schablone 507 humane Proteine detektiert werden.

Das Vorgehen entspricht weitgehend der zuvor für Ratte beschriebenen Methode. Der Unterschied liegt darin, dass die Progenitorzell-Überstände vor dem Schritt des Biotin-Labeling vorher einer Dialyse unterzogen werden, um diese per Osmose zu entsalzen.

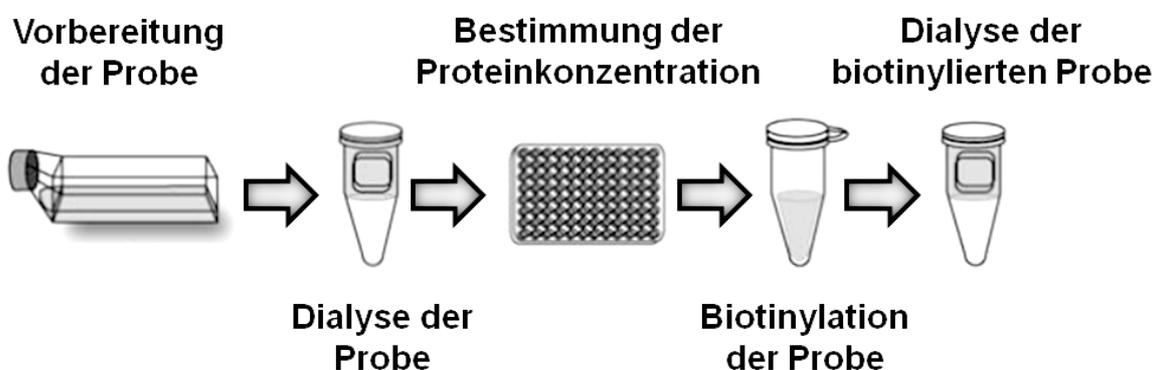


Abb. 3.9: Modifiziert nach Quelle: RayBio[®] Biotin label-based Array I Protocol

Methoden

Im Anschluss wird der Proteingehalt der Dialysate im Nano-Drop gemessen, um die Konzentration des Biotin-Labeling-Reagenz zu errechnen, welches zu den Überständen hinzugegeben wird. Nach einer Inkubationsphase von 30 Minuten wird die Flüssigkeit auf spezielle Zentrifugations-Säulen aufgetragen und durch mehrfaches Zentrifugieren von überschüssigem Biotin befreit.

Die weitere Behandlung mit Waschpuffern, die Beladung mit Streptavidin und die Entwicklung im ECL-Gerät erfolgt analog zum Ratten-Array (Punkt 3.9.1). Die Auswertung der Daten sowie die Erstellung von Graphen zu den einzelnen Zytokinen erfolgt mit der speziellen Analysis Tool Software der Firma Ray Biotech Inc.[®].

3.10 Messung der Apoptose in Herzmuskelzellen

3.10.1 Methode

Die Quantifizierung der Apoptose- und Nekroserate erfolgt mit einem Hoechst Assay. Hierfür werden die Farbstoffe Hoechst H33258 und Propidiumjodid verwendet. Der HOE Farbstoff ist ein DNA-Farbstoff, der in die Zelle aufgenommen wird und das Chromatin der Zellkerne anfärbt. Durch die intensive blau-grüne Fluoreszenz kann die für die Spätphase der Apoptose typische Chromatinkondensation in den Kernen gut sichtbar gemacht werden. Zudem ist die Apoptose durch eine Abkuglung der Zelle und der Zellkerne gekennzeichnet. Die Anregungswellenlängen für HOE liegen bei 340-360 nm. Das Propidiumjodid ist im Gegensatz dazu kein membrangängiger Farbstoff und wird nur von Zellen mit geschädigter Zellmembran aufgenommen. Deshalb zeigen propidiumjodidhaltige nekrotische Zellen bei Anregung im Spektrum von 510-550 nm eine intensiv rote Fluoreszenz.

3.10.2 Mikroskopie und Auswertung

Die isolierten Kardiomyozyten für den Apoptose-Assay werden wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben mit 10 µl einer 1:100 Verdünnung der Progenitorzellüberstände und deren entsprechenden Medien behandelt. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit den beiden Farbstoffen HOE 33258 1:10 (5 µl/ml) und Propidiumjodid (5 µl/ml) für 10 Minuten im Wärmeschrank inkubiert.

Die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen auf den Schalen wird mit dem Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 ausgewertet. Bei jedem zufällig gewählten Gesichtsfeld werden jeweils drei Fotos angefertigt: ein Bild im Durchlicht, eines im Rotfilter und eines im Blaufilter. Mit Hilfe der Software wird dann ein Overlay dieser drei Bilder angefertigt und der Anteil der nekrotischen bzw. apoptotischen Zellen bestimmt. Die Gesamtzellzahl pro Schale wird im Durchlicht bestimmt.

Dieses Vorgehen wird solange wiederholt bis man in der Summe mehr als 200 Zellen pro Versuchsbedingung pro Schale erfasst hat. Durch Auszählung werden die absoluten Zahlen an apoptotischen, nekrotischen und gesunden Zellen ermittelt und in Bezug auf die Gesamtzahl aller auf der Schale gezählten Zellen die prozentualen Anteile berechnet.

3.11 Statistik

Die Ergebnisse werden entweder als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) oder als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n verschiedenen Zellpräparationen dargestellt ($n > 3$). Die Daten werden durch eine ANOVA (One-Way Analysis of Variance) mit nachfolgenden Tukey-Test oder einem zweiseitigen Student-T-Test analysiert. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant angesehen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,01$ gilt als hochsignifikant. Alle Datenanalysen werden mit dem Statistikprogramm SPSS erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der kardialen Progenitorzellen

4.1.1 Dokumentation des Zellwachstums

Das Wachstum und die Differenzierung der Progenitorzellen werden während der Kultivierung kontinuierlich überwacht und dokumentiert. Im Verlauf der Kultivierungsphase von sechs Wochen werden zu verschiedenen Zeitpunkten Fotos im Mikroskop angefertigt. Dabei wird besonderes Augenmerk auf die Zeitpunkte kurz nach Gewinnung der Stammzellen (Abb. 4.1 A), kurz vor der Trypsinierung der cardiosphere-forming cells (Abb. 4.1 B), kurz nach Trypsinierung und Anzucht auf neuen Schalen in speziellem cardiosphere medium (Abb. 4.1 C) und den Tag der Ernte (Abb. 4.1 D) gelegt.

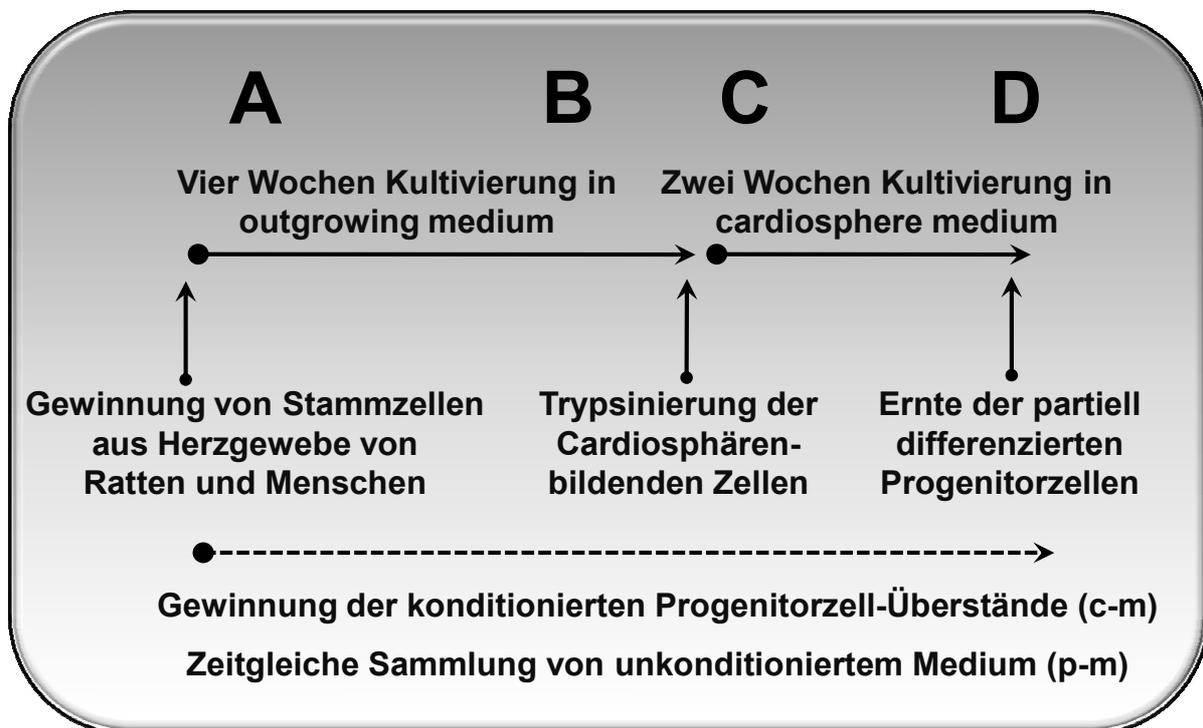


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Progenitorzellkultur im Zeitverlauf. Die Buchstaben A-D beziehen sich auf die im Folgenden dargestellten Bilder. Während der gesamten Kultivierungszeit werden konditionierte Überstände und deren zugehörigen unkonditionierten Medien entnommen. Am Ende der Kultivierung werden die gezüchteten Progenitorzellen geerntet.

Ergebnisse

Eine Woche nach Anlegen der Kultur werden die ersten Bilder angefertigt (Abb. 4.1 A). Zu diesem Zeitpunkt sind die Gewebestücke bereits eine Bindung mit der Polymer-Beschichtung der Zellkulturschale eingegangen.

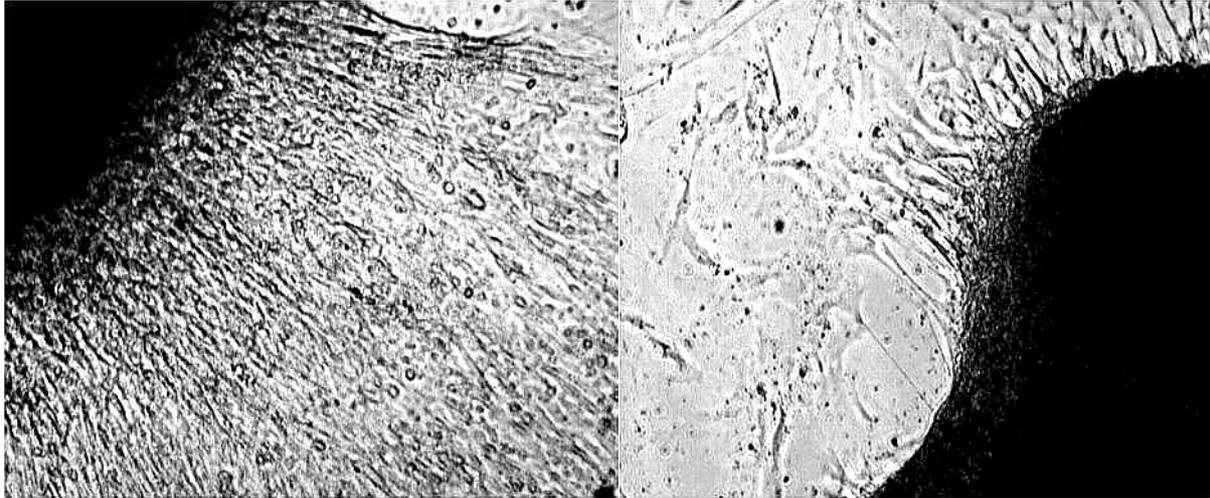


Abb. 4.1 A: Tag sieben der Kultur: Die Gewebestücke aus dem Herzen sind auf der Kulturschale angewachsen. Man kann das Auswachsen von Zellen aus dem Gewebe beobachten. Beide Bilder sind mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Nach dreiwöchiger Kultur im outgrowing medium ist das Auftreten von kleinen, runden, hell leuchtenden Zellen im Kulturmedium zu erkennen (Abb. 4.1 B). Diese opaken cardiosphere-forming cells, welche von Messina et al. als sphere-generating cells bezeichnet werden, sind die am Ende der Anzuchtphase gebildeten Zielzellen, die im Zuge der Trypsinierung gewonnen und auf neuen Schalen rekultiviert werden.

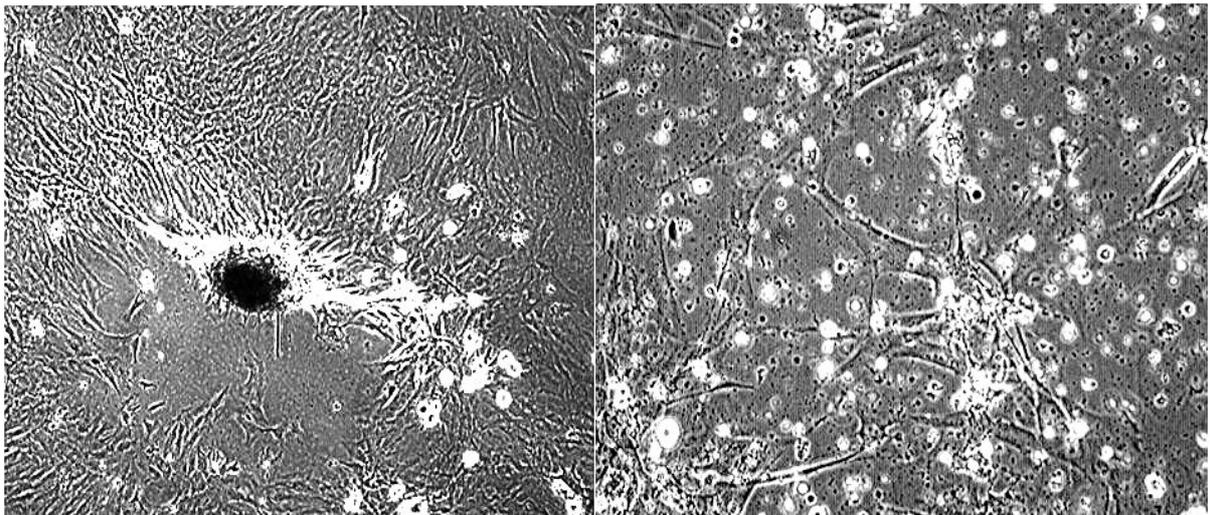


Abb. 4.1 B: Nach drei Wochen ist die Kultur durch das Auftreten von opaken Zellen, den sog. cardiosphere-forming cells, gekennzeichnet. Das linke Bild ist mit 100-facher Vergrößerung und das rechte Bild mit 200-facher Vergrößerung aufgenommen.

Ergebnisse

Die rekultivierten Zellen werden nun in cardiosphere medium für weitere zwei Wochen gezüchtet. Innerhalb kurzer Zeit kommt es bei den cardiosphärischen Zellen zur Vermehrung und teilweisen Zusammenlagerung zu größeren Sphären (20-150 µm) mit dunklerem, körnigem Phänotyp (Abb. 4.1 C).

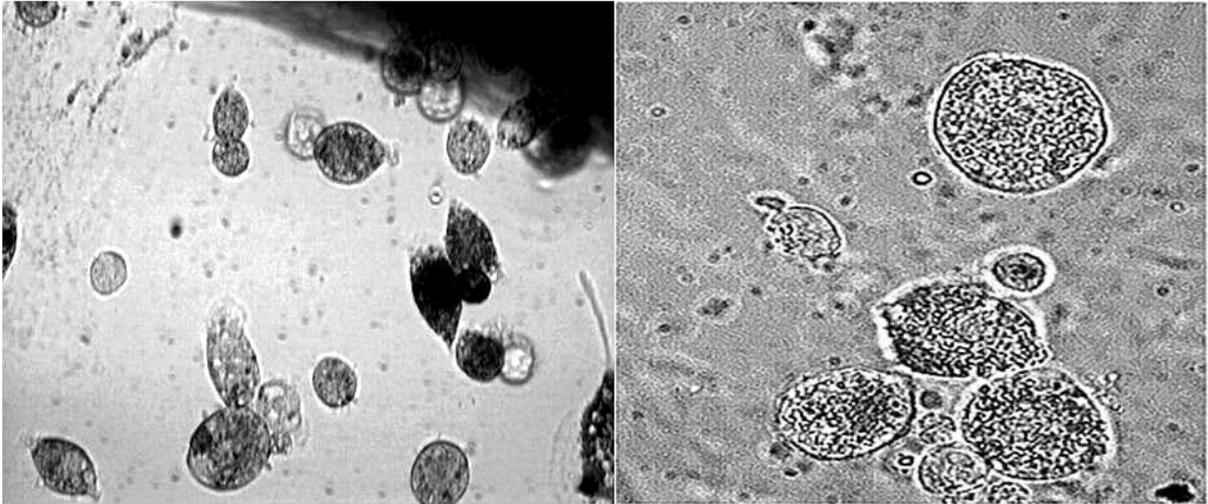


Abb. 4.1 C: Vermehrung und Zusammenlagerung der cardiosphärischen Zellen. Das linke Bild ist mit 200-facher Vergrößerung, das rechte mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

Zu diesem Zeitpunkt kommt es bereits zur festen Anheftung von fibroblasten-artigen Zellen an die Poly-Lysin-Schicht (Abb. 4.1 D). Diese Progenitorzellen bilden bis zum Ende der Kultivierungsperiode einen dichten Zellverband, welcher den kompletten Boden des Schälchens bedeckt. Diese Zellen und deren Überstände bilden die Grundlage aller folgenden Versuche und Ergebnisse.

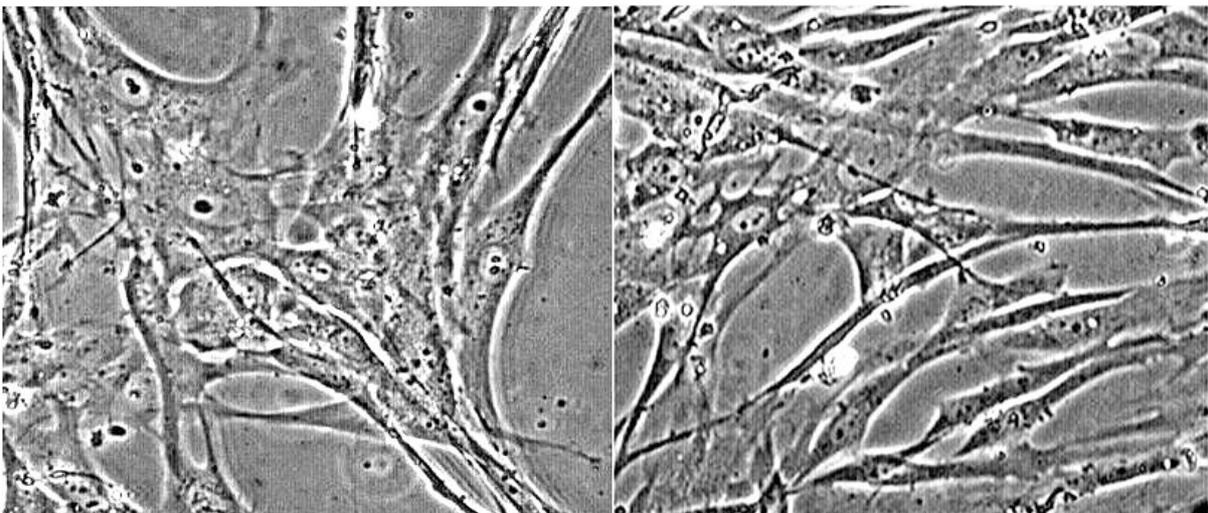


Abb. 4.1 D: Auf den neuen Schalen bilden die Progenitorzellen zum Teil dichte Netze in gewebeartigen Verbänden. Beide Bilder sind mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.1.2 Nachweis von kardialen Markern und Stammzellmarkern per RT-PCR

Die kardialen Progenitorzellen aus dem Herzgewebe von Ratten und Menschen exprimieren Stammzellmarker und kardiale Marker. Die bei der Ernte am Ende der Kultivierung gewonnenen Progenitorzellen werden per RT-PCR auf diese Marker untersucht. Dafür wird zunächst die mRNA-Expression quantitativ per PCR untersucht und anschließend semiquantitativ deren Expression im Agarose-Gel überprüft (Abb. 4.2).

Detektiert werden die kardialen Marker α -cardiac actin, β -MHC und ANP sowie die Stammzellmarker Sca-1, c-Kit und Isl-1 und das Housekeeping-Gen HPRT.

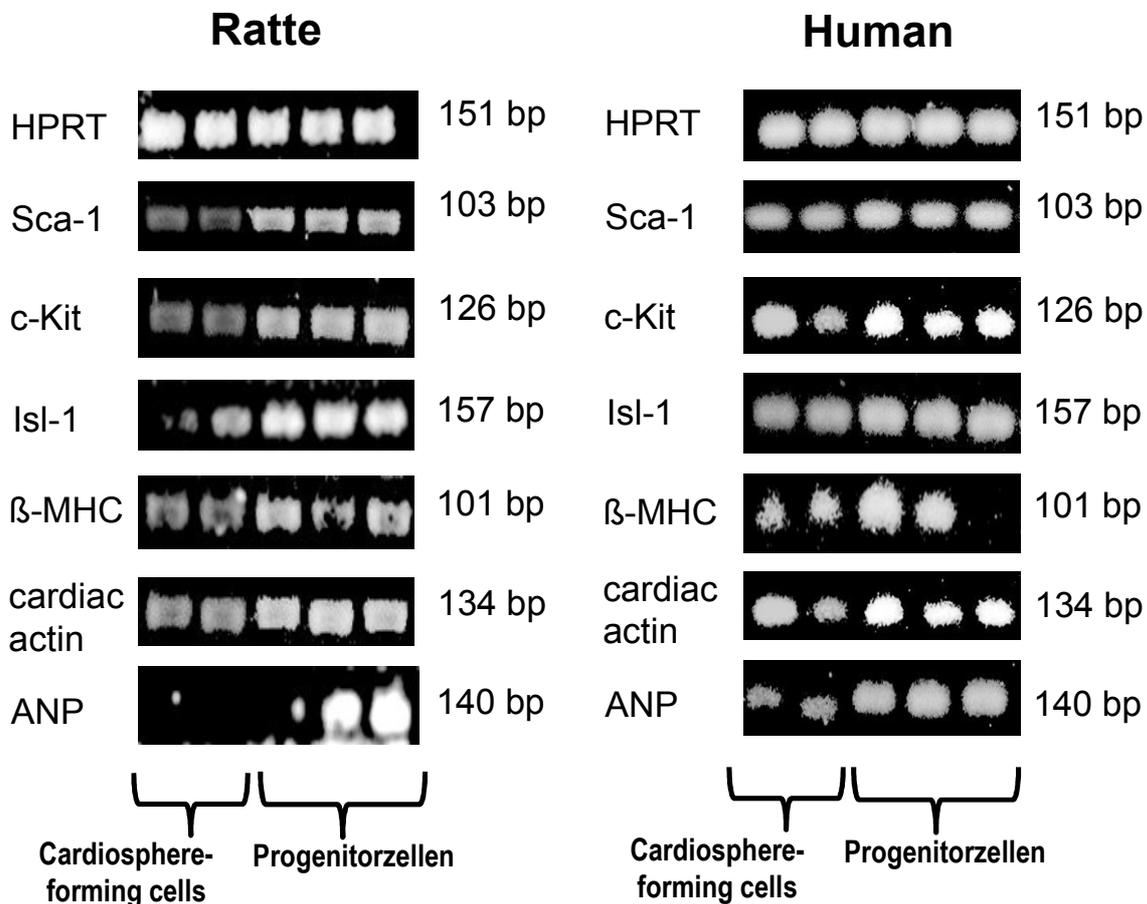


Abb. 4.2: Diese Darstellung zeigt die repräsentativen Agarose-Gele von cardiosphere-forming cells und Progenitorzellen von Ratte und Mensch, welche per RT-PCR untersucht werden. Aufgetragen von links nach rechts sind die Proben aus Kulturen zum Zeitpunkt der Trypsinierung nach vier Wochen und zum Zeitpunkt der Ernte am Ende der Kulturperiode nach sechs Wochen. Die ersten beiden Signale stammen von geernteten Zellen zum Zeitpunkt nach vierwöchiger Anzucht, die letzten drei von partiell differenzierten Progenitorzellen. HPRT wurde als Housekeeping-Gen verwendet.

4.1.3 Nachweis kardialer- und Stammzellmarker per Western Blot

In den Progenitorzellkulturen werden nach der Ernte auf Proteinebene per Western Blot diverse Stammzellmarker und kardiale Marker untersucht (Abb. 4.3). Hierbei werden die kardialen Marker α -cardiac actin, β -MHC, MLC-2 α , CT-1 und ANP und die Stammzellmarker Sca-1, c-Kit und Isl-1 und GATA-4 nachgewiesen. Das β -Actin fungiert als interne Kontrolle.

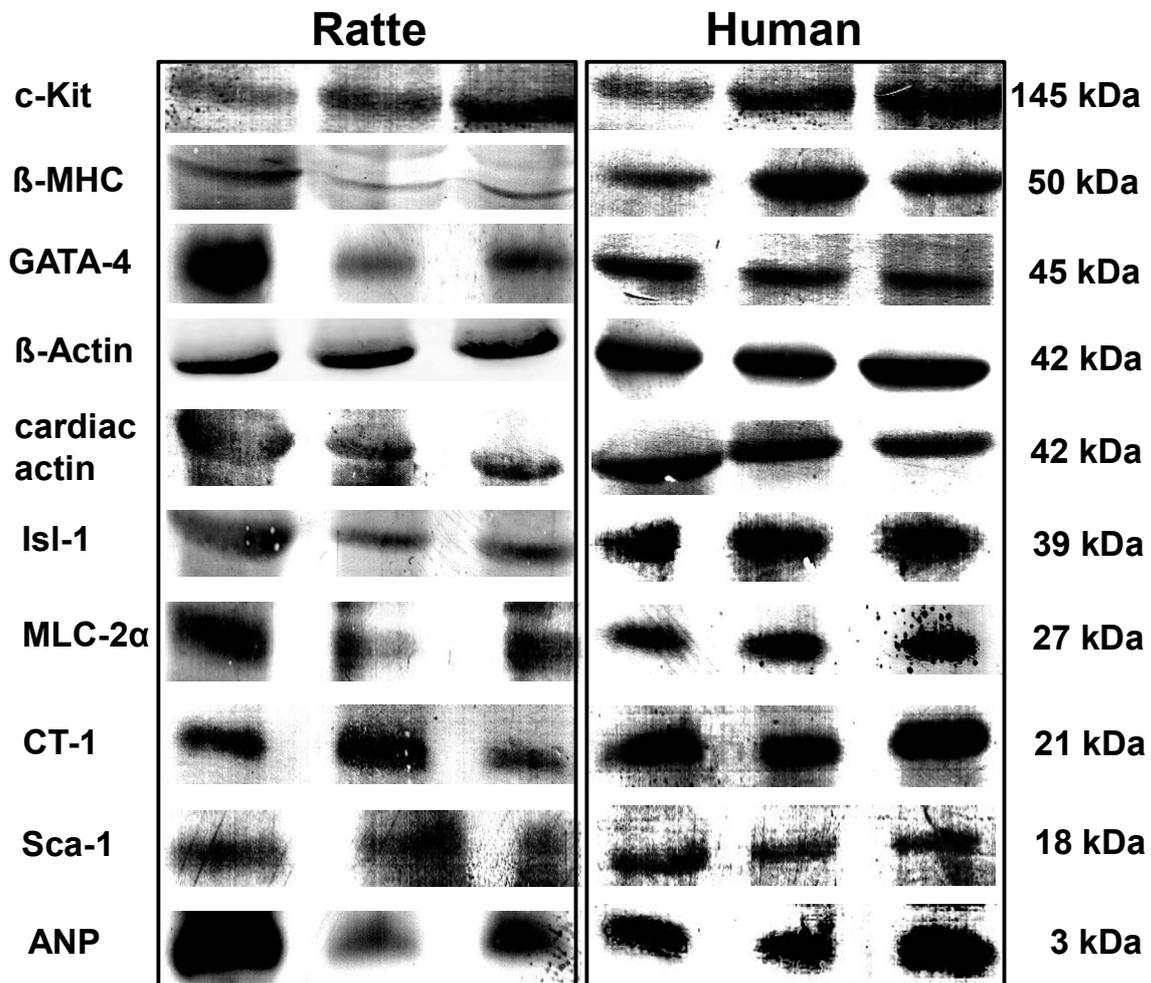
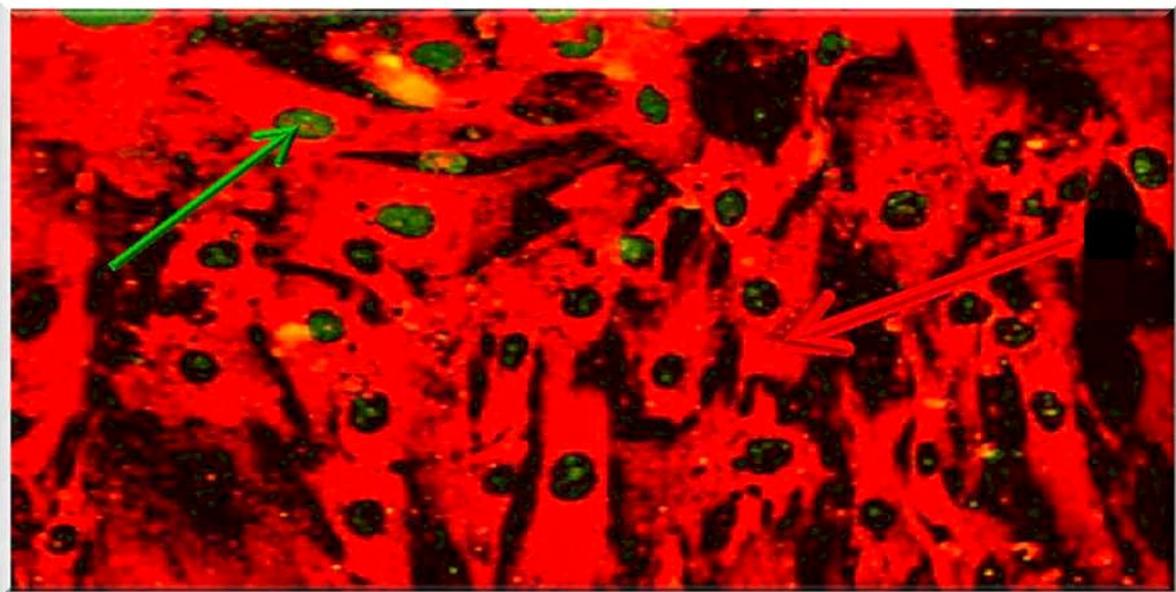


Abb. 4.3: Dargestellt sind die repräsentativen Blots von geernteten Progenitorzellen von Ratte und Mensch vom letzten Tag der Kultivierung in dreifacher Bestimmung.

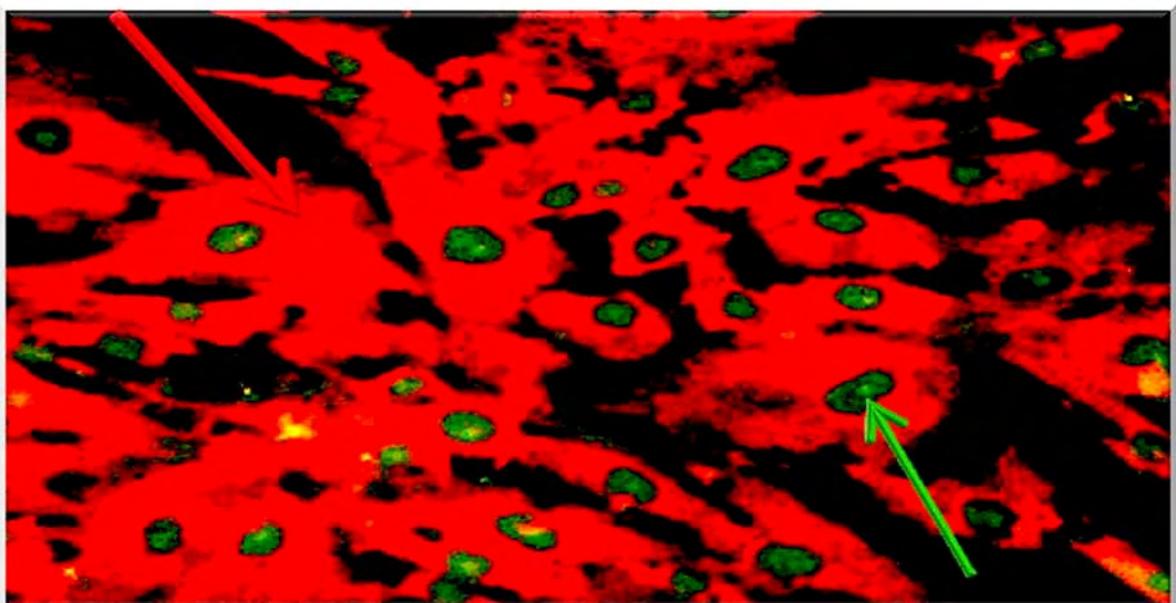
4.1.4 Nachweis von kardialen und Stammzellmarkern per Immunfluoreszenz

Zur Charakterisierung der Progenitorzellen werden Immunfärbungen mit fluoreszierenden Antikörpern durchgeführt (Abb. 4.4 A-C). Hierbei werden gleichzeitig jeweils ein kardialer Marker (α -cardiac actin oder β -MHC) und ein typischer Stammzellmarker (Isl-1 oder GATA-4) in den Zellen detektiert. Die Proteine α -cardiac actin und β -MHC befinden sich im Zytosol der Zelle (rot), während Isl-1 und GATA-4 im Kern lokalisiert sind (grün).

A: α -cardiac actin / Isl-1



B: β -MHC/ GATA-4



C: α -cardiac actin / GATA-4

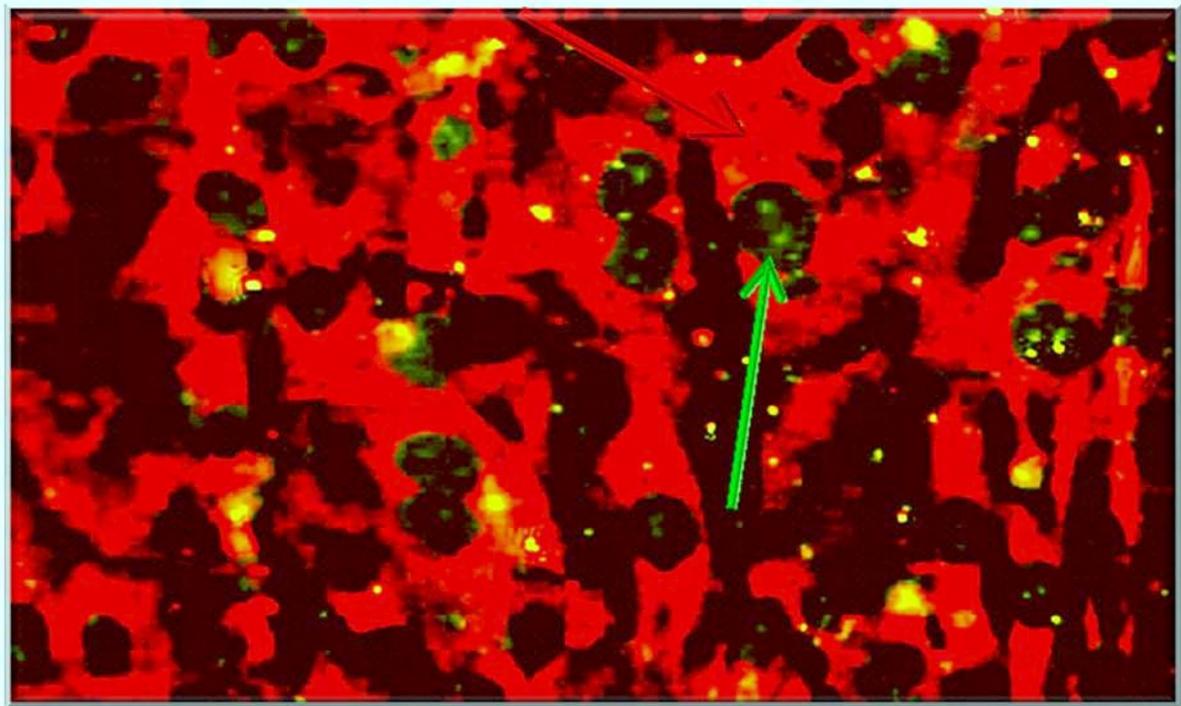


Abb. 4.4 (A-C): Die Immun-Doppel-Färbungen von Progenitorzellen am Ende der Kulturperiode zeigen die gleichzeitige Ausprägung von kardialen Markern (rote Färbung) und Stammzellmarkern (grüne Färbung) in einer Zelle.

4.1.5 Untersuchung der Progenitorzellkultur auf Fremdzellen

Das Vorkommen von Fibroblasten oder glatten Muskelzellen in der Progenitorzellkultur wird mit Hilfe von Kontrollfärbungen ausgeschlossen.

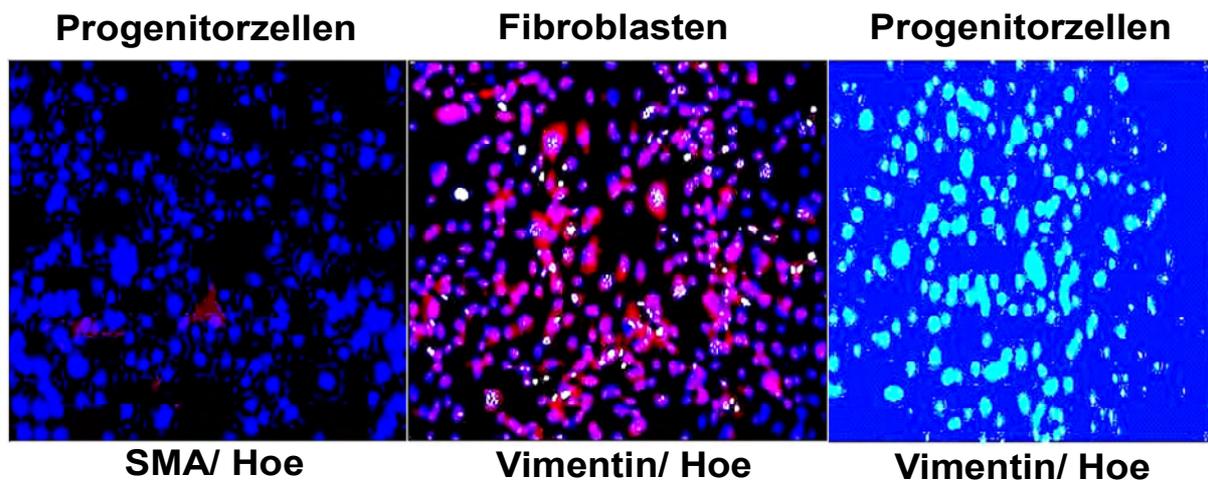


Abb. 4.5: Kontrollfärbungen der Progenitorzellen mit SMA (smooth muscle actin), Hoe (Hoechst Farbstoff) und Vimentin. Hoe führt zur Blaufärbung der Zellkerne, SMA macht glatte Muskelzellen durch Rotfärbung sichtbar und Vimentin führt in Fibroblasten zur Rotfärbung des Zytosols.

4.1.6 Untersuchung der Progenitorzell-Kultur auf Ca^{2+} -Transienten

Zur weiteren Charakterisierung werden die Progenitorzellen am letzten Kulturtage nach Markierung mit Fura-2 auf spontane Ca^{2+} -Transienten getestet. Über einen Zeitraum von einer halben Stunde werden Bilder der Zellen (Abb. 4.7 a, b) angefertigt und deren Fluoreszenz-Signal in Abhängigkeit von der Zeit (Abb. 4.6 a, b) erfasst.

4.1.6.1 Aufzeichnung des Fluoreszenz-Signals

Durch Markierung der einzelnen Progenitorzellen als regions of interest (ROI) kann während der Messung für jede Zelle ein Fluoreszenz-Signal verfolgt werden. Die plötzlichen steilen Peaks bedeuten ein spontanes intrazelluläres Auftreten von Calcium-Transienten (Abb. 4.6 a, b) und sind ein typisches Zeichen dafür, dass die Progenitorzellen Eigenschaften einer Herzmuskelzelle besitzen.

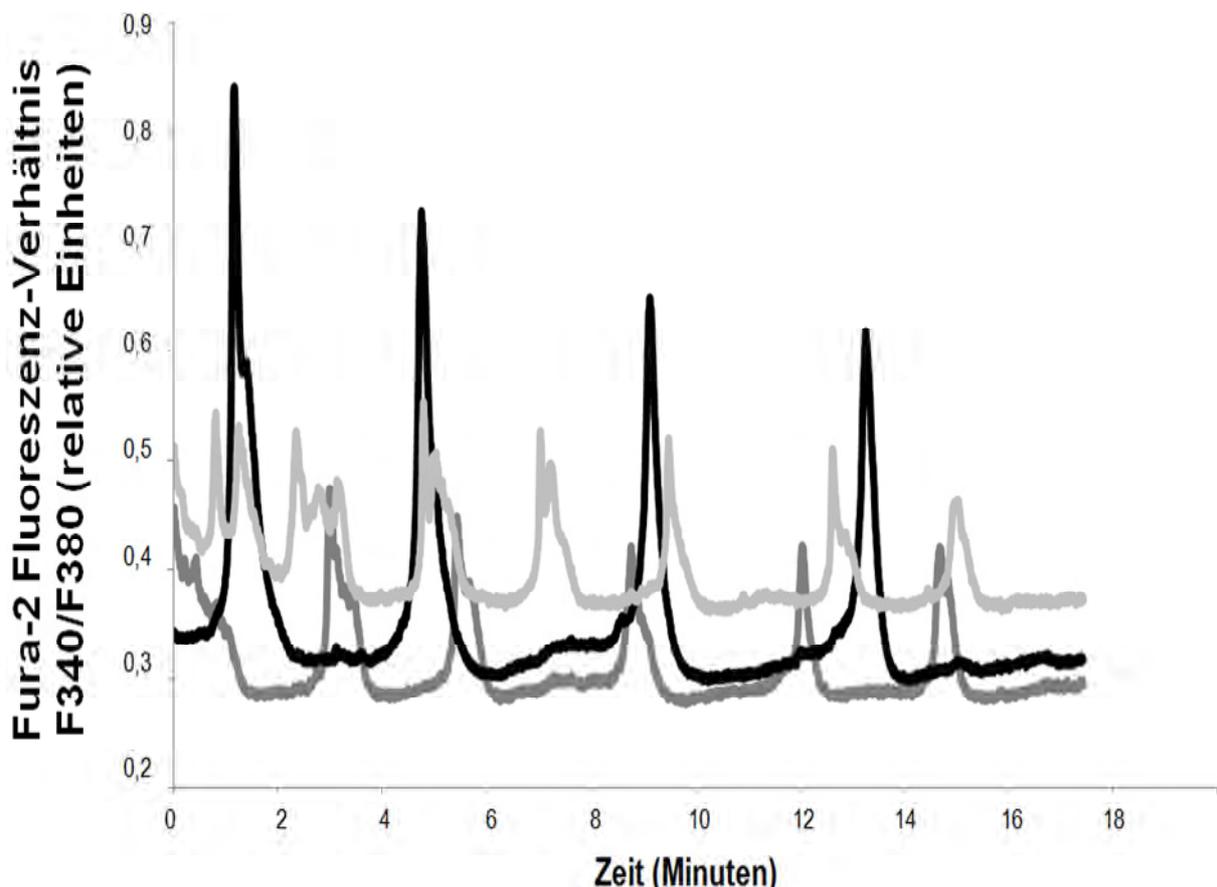


Abb. 4.6 a: Darstellung des Auftretens von spontanen Calcium-Transienten in drei als ROI markierten Progenitorzellen. Auf der x-Achse ist die Messungszeit in Minuten aufgetragen. Die y-Achse zeigt das Fura-2 Fluoreszenz-Verhältnis aus den beiden gemessenen Wellenlängen von 340 nm und 380 nm.

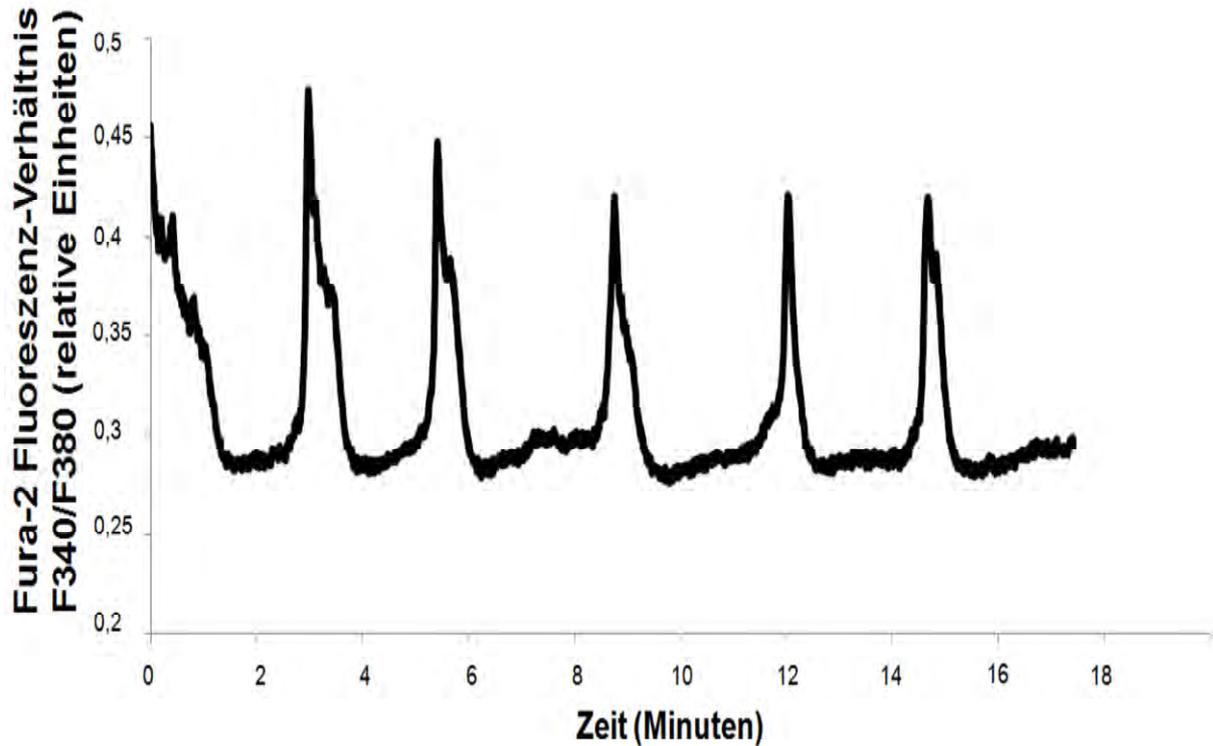


Abb. 4.6 b: Darstellung des Auftretens von spontanen Calcium-Transienten exemplarisch in einer als ROI markierten Progenitorzelle. Auf der x-Achse ist die Messungszeit in Minuten aufgetragen. Die y-Achse zeigt das Fura-2 Fluoreszenz-Verhältnis aus den beiden gemessenen Wellenlängen von 340 nm und 380 nm.

4.1.6.2 Dokumentation der Fluoreszenzmikroskopie

Die Bilder zur zeitlichen Dokumentation der Fluoreszenz (Abb. 4.7 a, b) zeigen zwei beispielhafte Messungen mit jeweils 5 Momentaufnahmen eines Gesichtsfeldes zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Durch die Videoaufzeichnung in Falschfarben kann anhand der unterschiedlichen Färbung der Progenitorzellen die Veränderung der relativen intrazellulären Calciumkonzentration im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Dabei weisen Bereiche mit dunkelblauer Färbung eine niedrige und Bereiche mit blau-grüner bis hin zu gelber Färbung eine hohe Konzentration an Calcium auf.

Ergebnisse

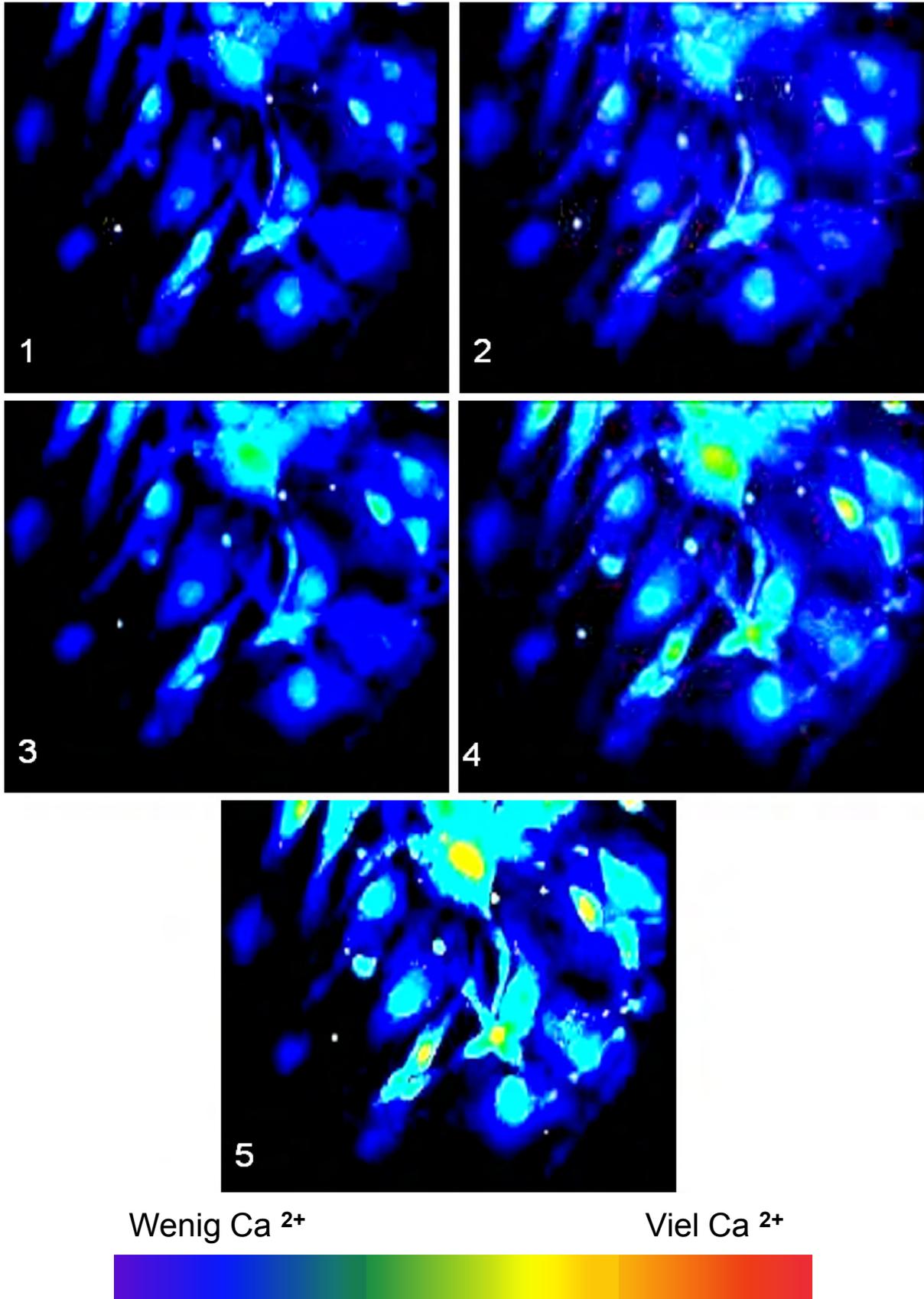


Abb. 4.7 a: Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Progenitorzellen im zeitlichen Abstand von jeweils 6 Minuten bei 400-facher Vergrößerung. Die Bilder 1-5 zeigen die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration im Verlauf einer halben Stunde.

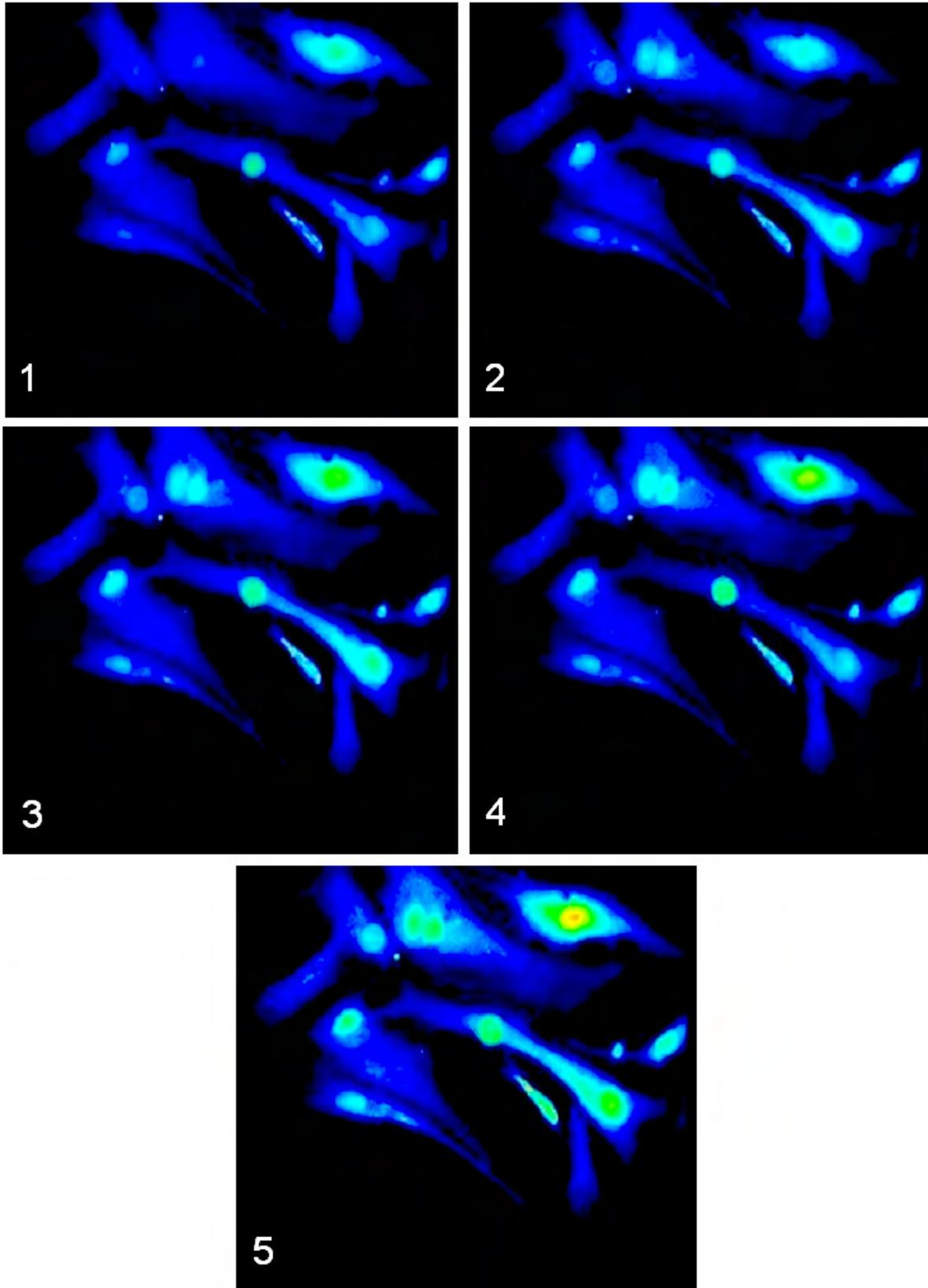


Abb. 4.7 b: Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Progenitorzellen im zeitlichen Abstand von 6 min. Die Bilder 1-5 zeigen die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration im zeitlichen Verlauf einer halben Stunde. In dunkelblauen Bereichen herrscht eine niedrige, in blau-grünen eine mittlere und in gelb-roten Bereichen eine hohe Konzentration an Calcium vor.

4.2 Untersuchung der kontraktilen Funktion isolierter Kardiomyozyten

Der Einfluss von konditionierten Überständen kardialer Progenitorzellen vom letzten Tag der Kultivierung auf die kontraktile Funktion isolierter Kardiomyozyten wird nach 24-stündiger Inkubation anhand der Zellverkürzung im elektrischen Feld gemessen. Dabei hat sich in Vorversuchen zur kontraktilen Funktion eine Endverdünnung von 1:10000 als die optimale erwiesen. Nach der Behandlung von Wistar Kardiomyozyten kommt es zu einer Verbesserung der kontraktilen Funktion von $7,1 \pm 1,8$ % SEM bei konditionierten Wistar Überständen (c-m) im Vergleich zur Kontrolle (p-m). Bei den SHR Überständen verbessert sich die kontraktile Funktion um $17,1 \pm 1,8$ % SEM.

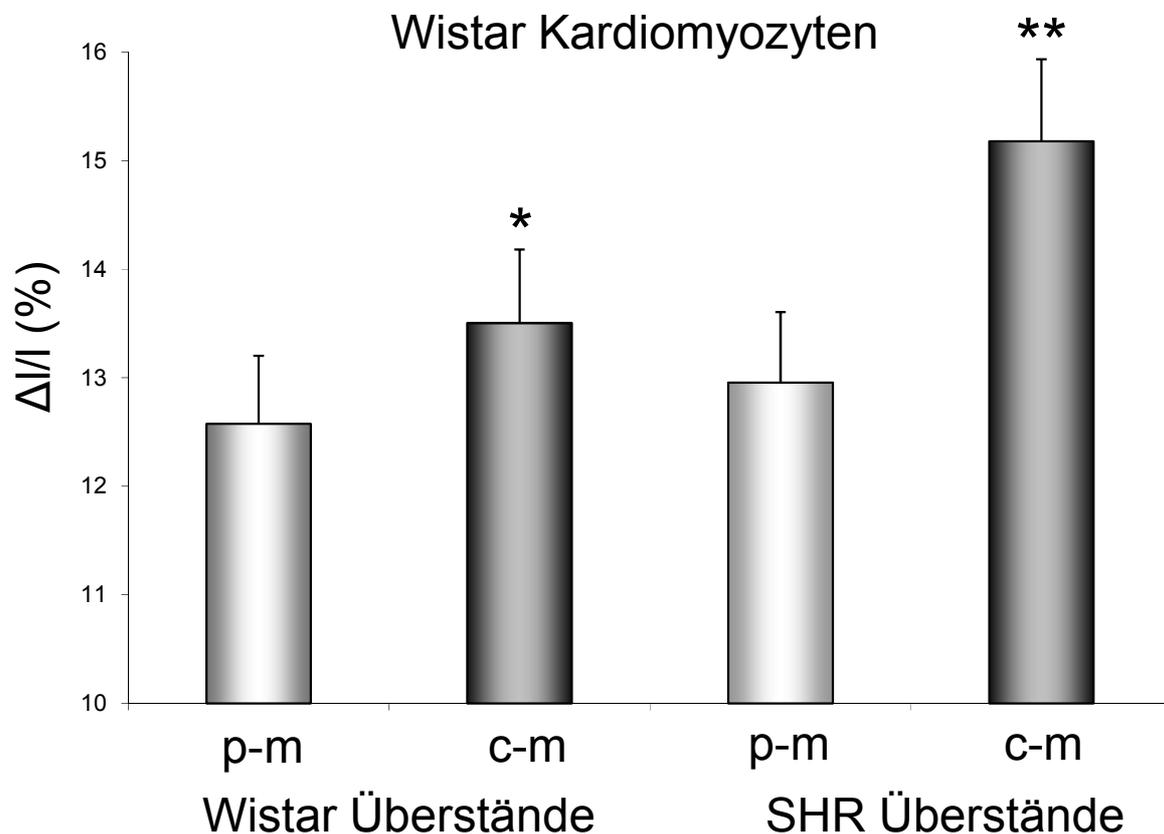


Abb. 4.8: Darstellung der kontraktilen Funktion ($\Delta l/l$) von isolierten Wistar Kardiomyozyten nach Behandlung mit Überständen aus Progenitorzellen von Wistar- und SH-Ratten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Schalen pro Bedingung aus je zwei unterschiedlichen Präparationen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Der Doppelstern (**) bezeichnet zur Kontrollgruppe hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$ vs. p-m). Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

Ergebnisse

Da die Herkunft des Donorgewebes einen Einfluss auf die Ausprägung der Effekte zu nehmen scheint wird zudem die Beeinflussbarkeit von unterschiedlichem Empfängergewebe untersucht. Hierfür werden in Analogie zu den getesteten Überständen aus SHR Progenitorzellen isolierte Kardiomyozyten aus SH-Ratten gewonnen und deren kontraktile Funktion untersucht. Die Kardiomyozyten werden wiederum für 24 Stunden mit konditionierten Überständen (c-m) und als Kontrollen mit unkonditionierten Überständen (p-m) inkubiert. Die kontraktile Funktion von isolierten SHR Kardiomyozyten wird durch die Inkubation mit Wistar Überständen nicht signifikant beeinflusst. Die Behandlung von SHR Kardiomyozyten mit konditionierten Überständen aus SHR Progenitorzellen führt zu einem Anstieg der kontraktile Funktion von im Mittel $30,2 \pm 2,7$ % SEM.

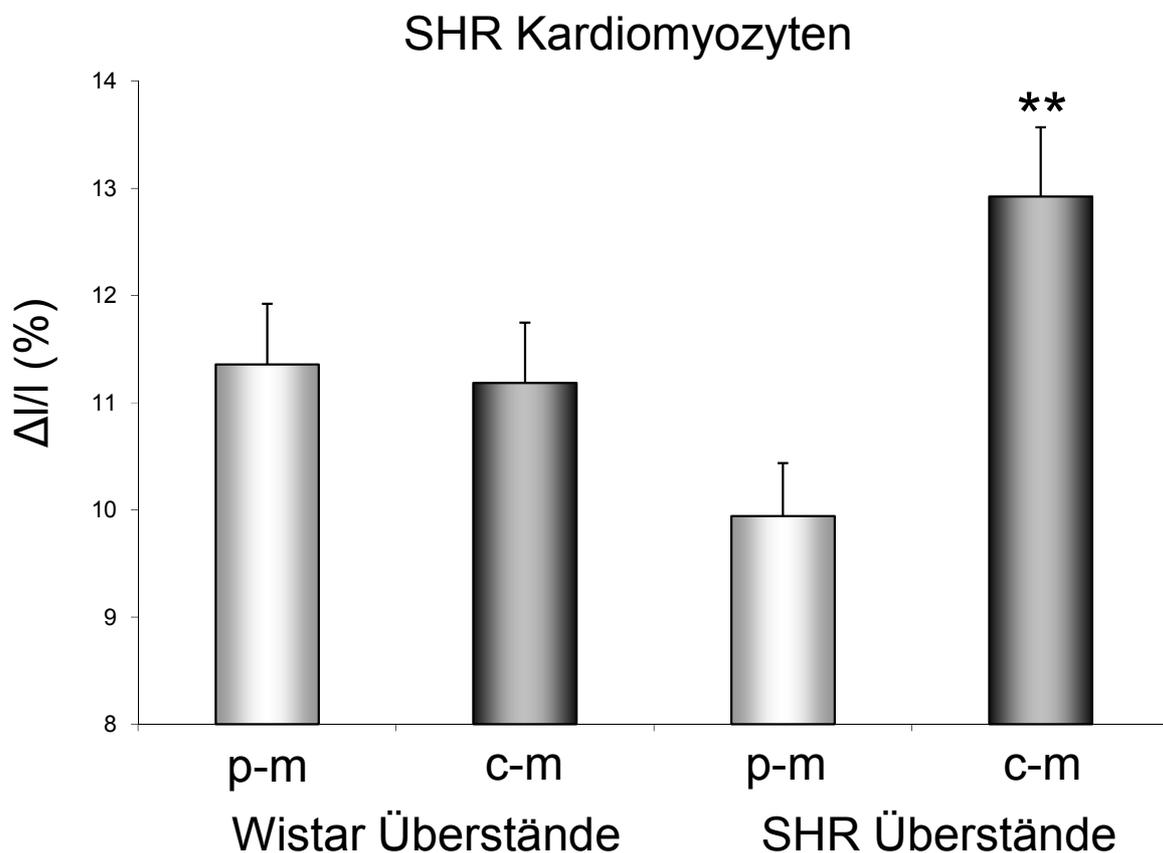


Abb. 4.9: Darstellung der kontraktile Funktion ($\Delta I/I$) von isolierten SHR Kardiomyozyten nach Behandlung mit Überständen aus Progenitorzellen von Wistar- und SH-Ratten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Schalen pro Bedingung aus je zwei unterschiedlichen Präparationen und der Standardfehler des Mittelwertes. Der Doppelstern (**) bezeichnet zur Kontrollgruppe hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$ vs. p-m). Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

Ergebnisse

Da die konditionierten Überstände von Progenitorzellen im Stadium der partiellen Differenzierung einen Einfluss auf die kontraktile Funktion von isolierten Kardiomyozyten haben, werden außerdem konditionierte Überstände von Zellen aus anderen Stadien nach 24-stündiger Inkubation mit Wistar Kardiomyozyten untersucht.

Die konditionierten Überstände aus der Phase vor der Trypsinierung, in welcher bei den Progenitorzellen noch keine Differenzierung stattfindet, haben keinen messbaren Einfluss auf die kontraktile Funktion isolierter Wistar Kardiomyozyten. Reines Zellkulturmedium (CCT) mit kultivierten ausdifferenzierten Wistar Kardiomyozyten hat ebenfalls keinen Effekt auf die kontraktile Funktion.

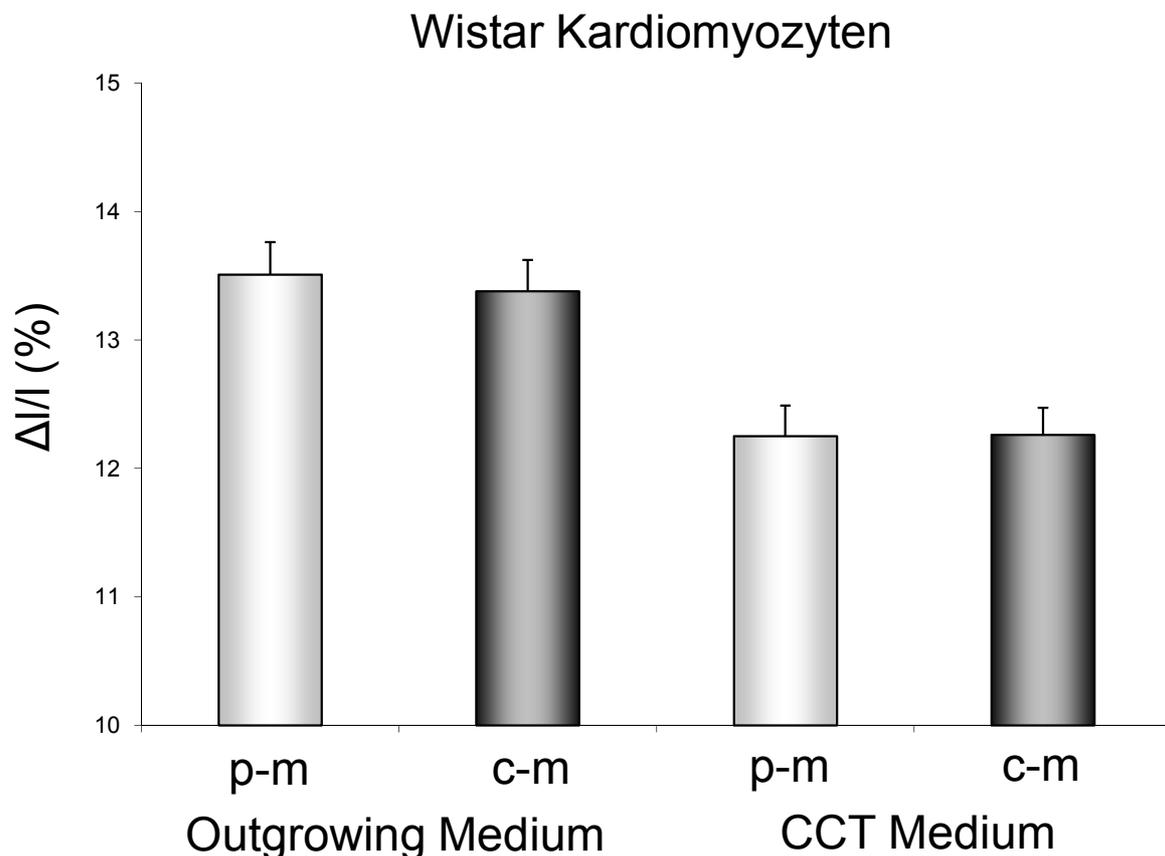


Abb. 4.10: Darstellung des Einflusses von konditionierten und unkonditionierten Überständen zum Zeitpunkt der Anzuchtphase der Progenitorzellen im outgrowing medium und des Überstandes von isolierten Wistar Kardiomyozyten im CCT Medium auf die kontraktile Funktion ($\Delta I/I$) isolierter Wistar Kardiomyozyten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Schalen pro Bedingung aus je zwei unterschiedlichen Präparationen. Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

4.3 Untersuchung von Calciumhandling-Proteinen

Zur Untersuchung des Calciumhaushaltes isolierter Kardiomyozyten nach Behandlung mit konditionierten Überständen (c-m) wird das Serca/NCX-Verhältnis im Western Blot ermittelt. Nach Inkubation von isolierten Wistar-Kardiomyozyten für 24 Stunden, kommt es bei jenen aus humanen CPC-Kulturen zu einem Anstieg des Serca/NCX-Verhältnisses um $112,5 \pm 10,5 \%$ und bei SHR-Überständen zu einem Anstieg um $65,7 \pm 13,6 \%$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (p-m), was auf eine Verbesserung des Calciumhandlings in den Kardiomyozyten schließen lässt.

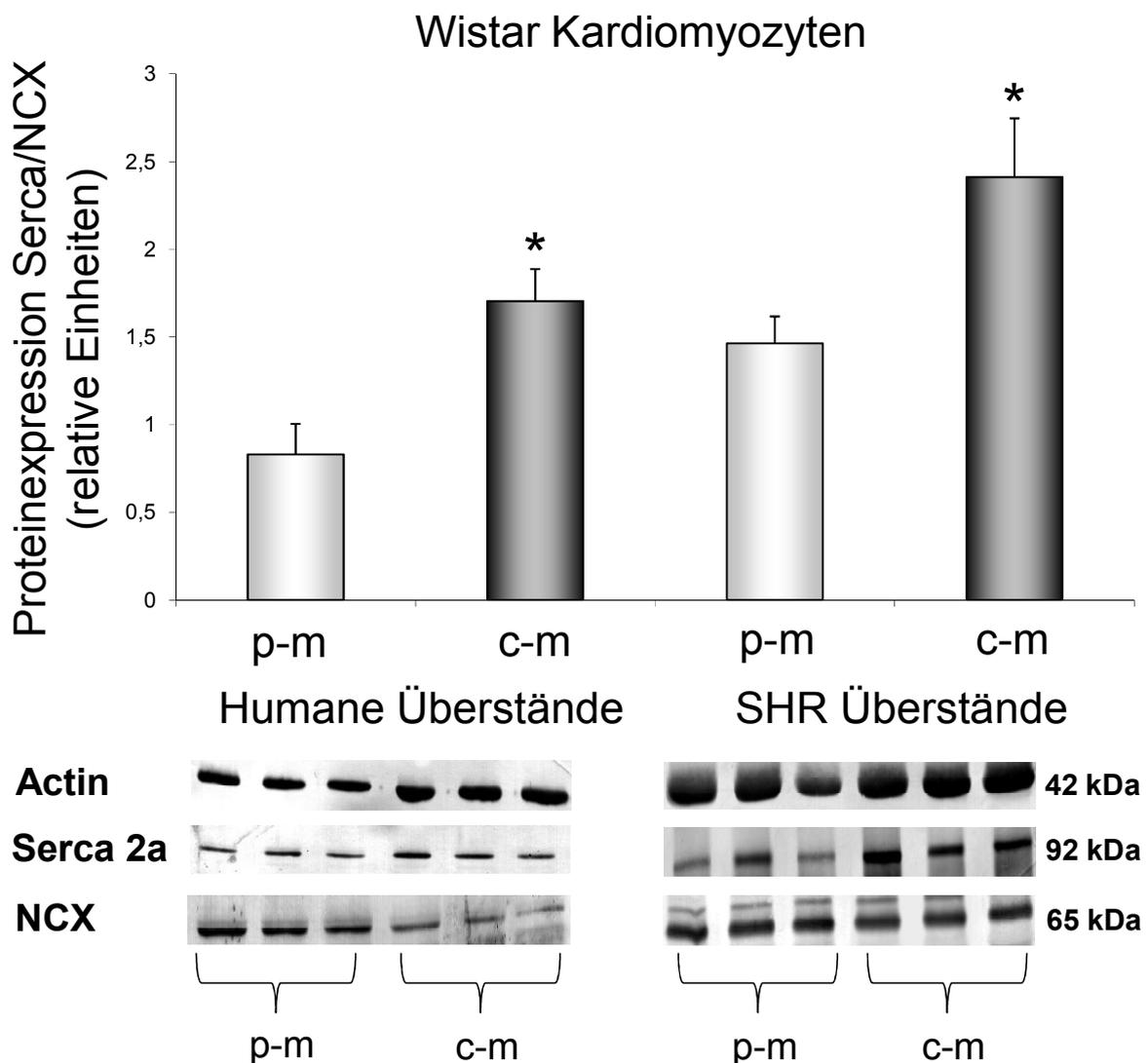


Abb. 4.11: Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Actin. Darstellung der Veränderung der relativen Proteinexpression von Serca 2a und NCX in isolierten Wistar Kardiomyozyten nach 24-stündiger Inkubation mit konditionierten Überständen von Progenitorzellen aus humanem und SHR Gewebe. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei Versuchsansätzen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Darunter abgebildet sind die zugehörigen repräsentativen Blots in dreifacher Bestimmung.

4.4 Korrelation zwischen Calciumhandling und kontraktile Funktion

Die konditionierten Überstände von Progenitorzellen sind also in der Lage, die Funktion und das Remodeling von isolierten Kardiomyozyten zu beeinflussen. Dabei kommt es offenbar zur Veränderung von zellinternen Regelmechanismen wie dem Calciumhandling. Um zu überprüfen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Verbesserung der kontraktile Funktion der behandelten Kardiomyozyten und dem Anstieg des Serca/NCX-Verhältnisses besteht, wird die Korrelation zwischen beiden untersucht. Hierbei kann ein deutlicher linearer Zusammenhang festgestellt werden. Die Verbesserung des Calciumhandlings hat also eine Verbesserung der kontraktile Funktion von isolierten Kardiomyozyten zur Folge.

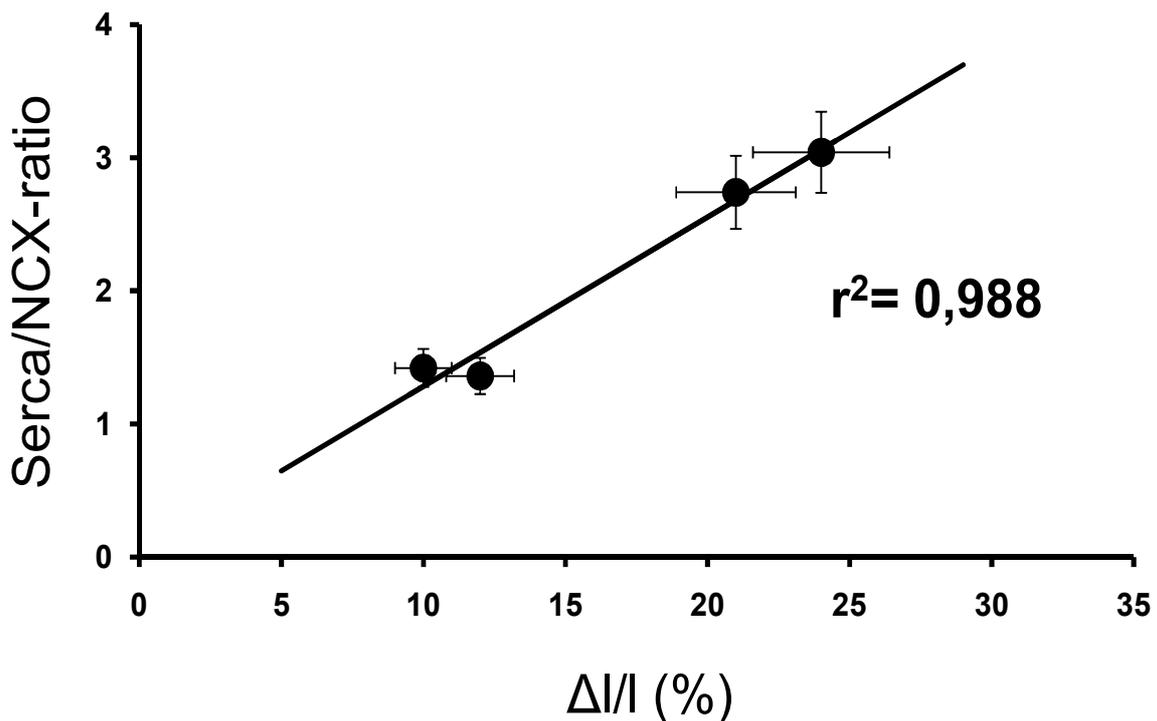


Abb. 4.13: Darstellung der Korrelation zwischen kontraktile Funktion ($\Delta l/l$) und dem Verhältnis von der Serca 2a zum NCX anhand von Messungen im elektrischen Feld und Durchführung von Western Blots mit Wistar Kardiomyozyten, welche für 24 Stunden mit konditionierten Überständen von humanen Progenitorzellen behandelt wurden. Der Determinationskoeffizient $r^2 = 0,988$ weist auf einen nahezu perfekten linearen Zusammenhang hin ($p < 0,05$).

4.5 Untersuchung Apoptose-regulierender Proteine

Zur Untersuchung der Beeinflussung von Apoptose-regulierenden Proteinen durch die konditionierten Überstände wird das Bcl-2/Bax-Verhältnis im Western Blot ermittelt. Durch die Inkubation von isolierten Wistar Kardiomyozyten für 24 Stunden kommt es zu einem Anstieg der relativen Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 im Verhältnis zum apoptotischen Bax von $35,7 \pm 6,6 \%$ bei humanen Überständen und einem Anstieg von $129,9 \pm 3,8 \%$ bei SHR-Überständen, was auf eine Verringerung der Apoptoserate in den Kardiomyozyten schließen lässt.

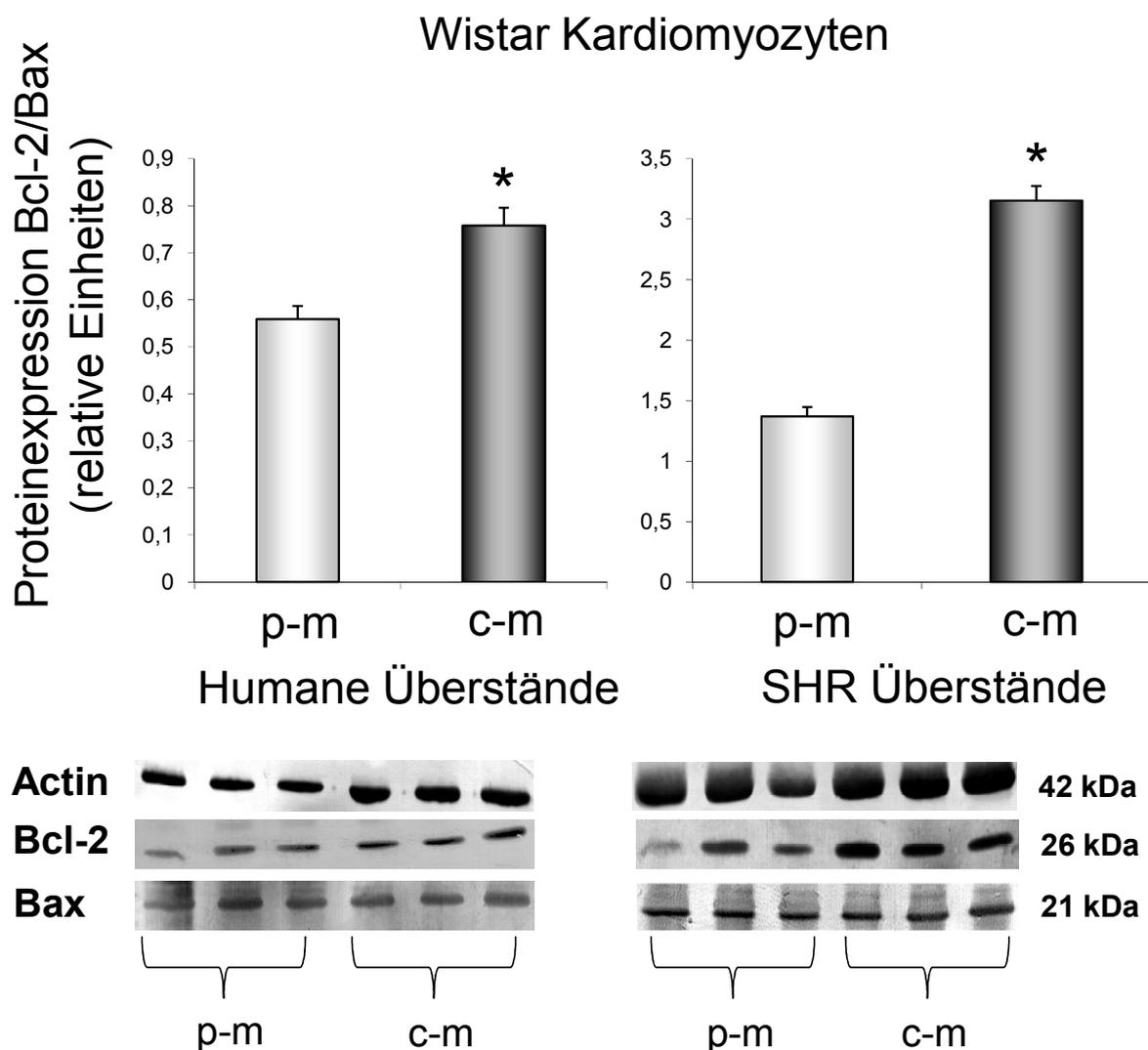


Abb. 4.12: Western Blot aus Gesamtprotein normiert auf Actin. Darstellung der Veränderung der relativen Proteinexpression von Bcl-2/Bax in isolierten Wistar Kardiomyozyten nach 24-stündiger Inkubation mit konditionierten Überständen von Progenitorzellen aus humanem und SHR Gewebe. Dargestellt sind der Mittelwert aus drei Versuchsansätzen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Darunter abgebildet sind die zugehörigen repräsentativen Blots in dreifacher Bestimmung.

4.6 Untersuchung der Apoptose in isolierten Kardiomyozyten

Die Veränderung der Expression von Apoptose-regulierenden Proteinen (Bcl-2/Bax) durch die konditionierten Überstände lässt auf eine verminderte Apoptose in den Kardiomyozyten schließen. Im Hoechst-Assay werden deshalb mit konditionierten Überständen (c-m) behandelte Kardiomyozyten auf ihre relativen Anteile an apoptotischen Herzmuskelzellen im Vergleich zu jenen, welche mit unkonditionierten Überständen (p-m) behandelt wurden, untersucht. Aufgrund der hochgradigen Effekte der SHR Überstände auf die kontraktile Funktion werden für die Ermittlung der Apoptose wiederum Überstände aus SHR eingesetzt. In den mit konditionierten Überständen behandelten Zellen kommt es zu einer hoch signifikanten Verminderung der Apoptose. Dabei kann bei behandelten Wistar Kardiomyozyten eine Verminderung der Apoptoserate um $49,9 \pm 1,9$ % SEM beobachtet werden und bei SHR Kardiomyozyten eine Verminderung um $77,3 \pm 2,3$ % SEM

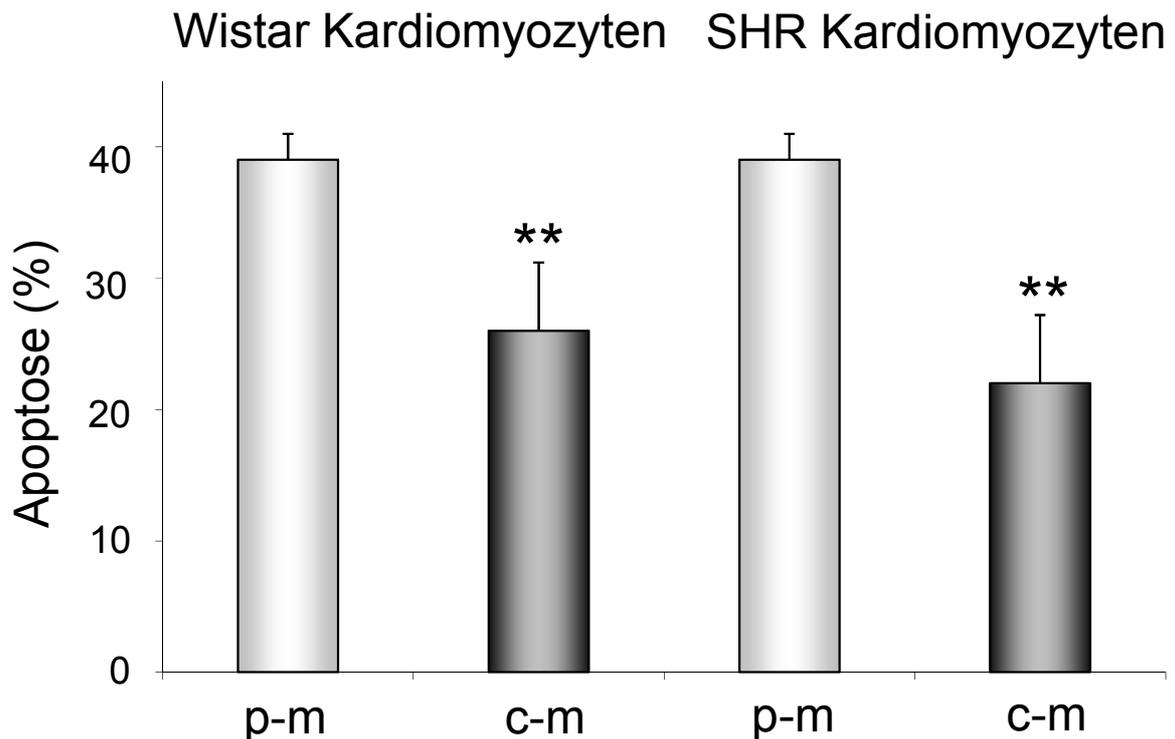


Abb. 4.14: Darstellung des prozentualen Anteils apoptotischer Kardiomyozyten von Wistar- und SH-Ratten nach 24-stündiger Inkubation mit Überständen von Progenitorzellen spontan hypertensiver Ratten. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Schalen pro Bedingung aus je zwei unterschiedlichen Präparationen und der Standardfehler des Mittelwertes. Der Doppelstern (**) bezeichnet zur Kontrollgruppe hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$ vs. p-m). Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

Ergebnisse

Die Untersuchung der Apoptose im Hoechst-Assay erfolgt nach optischen Gesichtspunkten. Hierbei werden Zellen, welche sich rot anfärben und somit als nekrotisch gelten, nicht in die Zählung mit einbezogen, da sie ansonsten das Verhältnis zwischen gesunden und erkrankten Zellen verfälschen würden. Durch die Doppelfärbung mit Propidiumjodid und Hoechst-Farbstoff und der Erstellung von Overlays dieser Bilder ist die Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich. Des Weiteren gelten Zellen mit länglicher Zellform und länglichen Kernen als gesunde, während Zellen mit runder Zellform, runden Zellkernen und im weiteren Stadium grünlicher Färbung des Zytoplasmas als apoptotische Zellen angesehen werden.

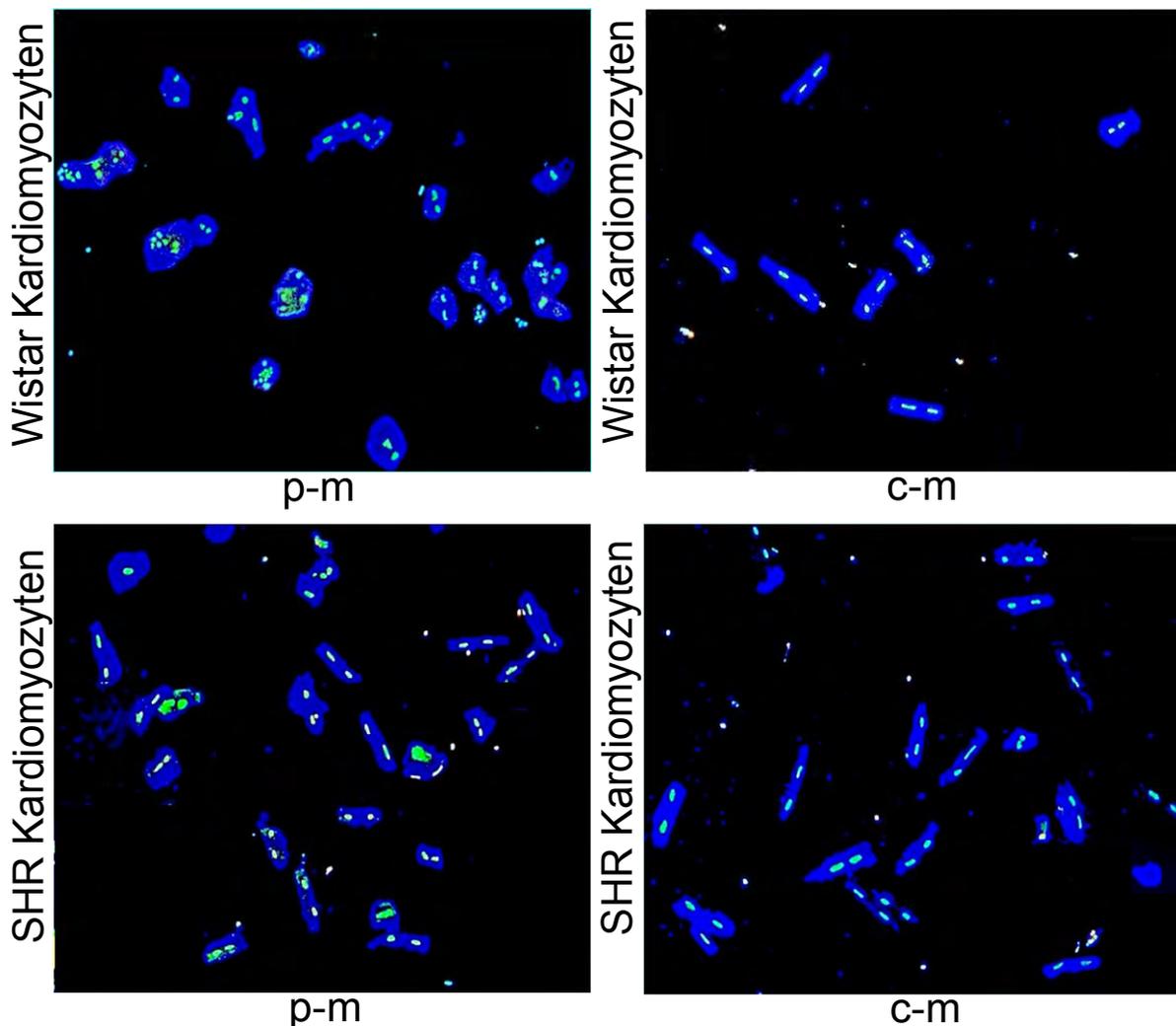


Abb. 4.15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Apoptose nach Hoechst/Propidiumjodid-Doppelfärbung in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Inkubation mit CPC-Überständen aus SHR. Gezeigt werden links Bilder nach Behandlung mit unconditionierten Überständen (p-m) und rechts Bilder nach Inkubation mit konditionierten Überständen (c-m) jeweils auf isolierten Kardiomyozyten von Wistar und SH-Ratten.

4.7 Untersuchung der Überstände im Langendorff-Modell

4.7.1 Einfluss auf die Recovery

Aufgrund der positiven Effekte der konditionierten Überstände auf die Funktion und das Remodeling der isolierten Kardiomyozyten werden die gleichen Parameter nun an Ganzherzen von Wistar und SHR untersucht. Hierfür werden die Herzen im Langendorff-Modell mit den konditionierten Überständen aus SHR Progenitorzellen und deren Kontrollen perfundiert (Abb. 3.2). Dabei wird das rate-pressure product (RPP), welches das Produkt aus LVDP und Herzfrequenz darstellt, als Maß für die Postinfarkt-Erholung der Herzen gemessen. Dabei zeigt sich in den perfundierten Wistar Herzen ein Anstieg des RPP um $44,5 \pm 5,3$ % SEM und in den SHR Herzen ein Anstieg um $57,5 \pm 4,1$ % SEM.

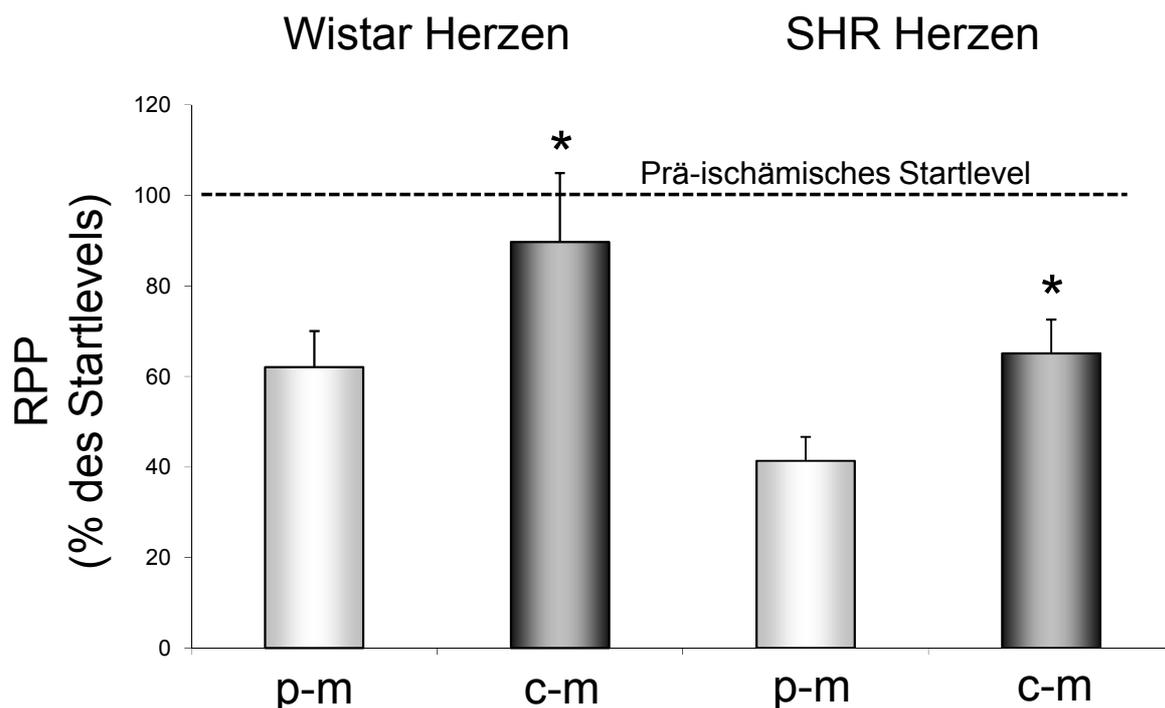


Abb. 4.16: Darstellung des prozentualen RPP (rate-pressure-product) in % des Erholungslevels vor Beginn der Ischämie als Indikator für die Postinfarkt-Erholung des Herzens. Untersucht wurden Ganzherzen von Wistar und SHR nach Behandlung mit Überständen aus SHR-Progenitorzellen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=8$ Herzen pro Bedingung und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt in der Perfusionslösung 1:10000.

4.7.2 Einfluss auf die Genexpression

In Analogie zum im Western Blot nachgewiesenen Effekt der konditionierten Überstände auf die Proteinbildung (late remodeling) wird die Untersuchung der Gen-Expression (early remodeling) in Rattenherzen nach Perfusion mit Überständen aus SHR-Progenitorzellen per RT-PCR durchgeführt.

4.7.2.1 Calciumhandling

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression des Verhältnisses von der Serca 2a zum NCX ist keine signifikante Veränderung festzustellen

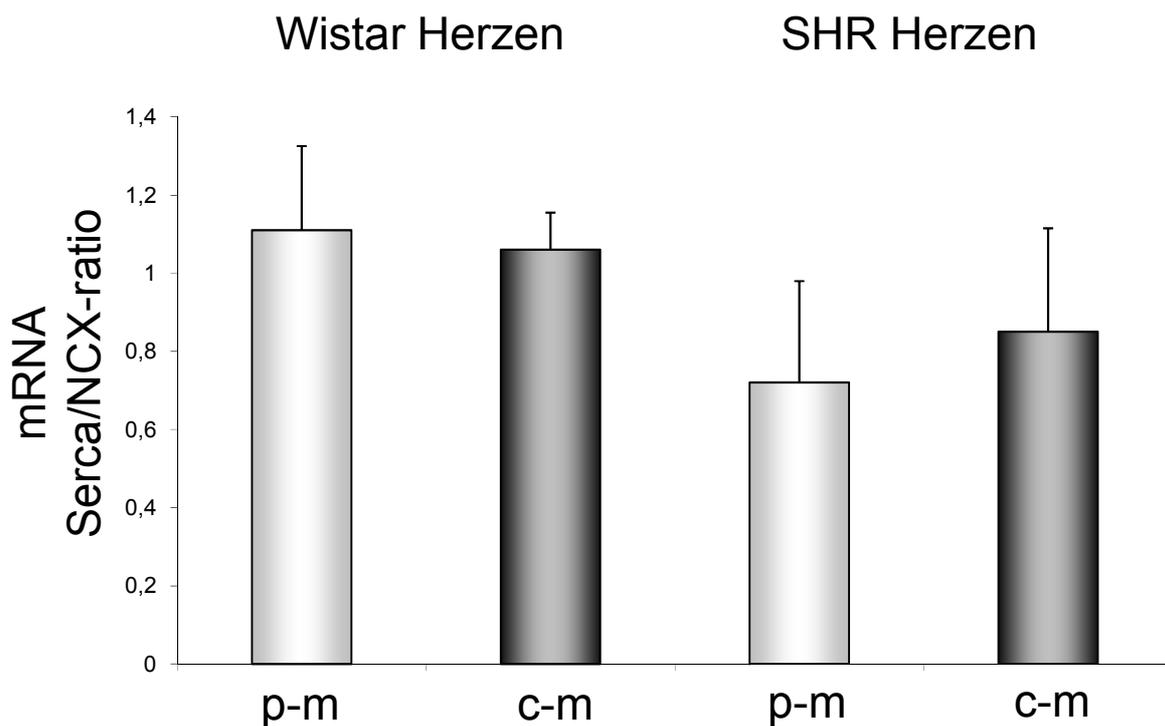


Abb. 4.17: Darstellung der relativen mRNA-Expression von Serca/NCX in einer quantifizierten RT-PCR nach Perfusion von Ganzherzen im Langendorff-Modell mit Überständen aus SHR Progenitorzellen. Die RT-PCR ist normiert auf HPRT. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus n=8 Herzen pro Bedingung und der Standardfehler des Mittelwertes. Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt in der Perfusionslösung 1:10000.

4.7.2.2 Apoptose

Ebenso wird das Bcl-2/Bax-Verhältnis als Maß für die Apoptose-Regulierung nach Perfusion im Langendorff-Modell und anschließender RT-PCR untersucht. Hierbei zeigt sich in den perfundierten SHR Herzen ein signifikanter Anstieg der Bcl-2-Expression gegenüber der mRNA-Expression von Bax von $141,6 \pm 29 \%$, während bei den Wistar Herzen kein signifikanter Unterschied festzustellen ist.

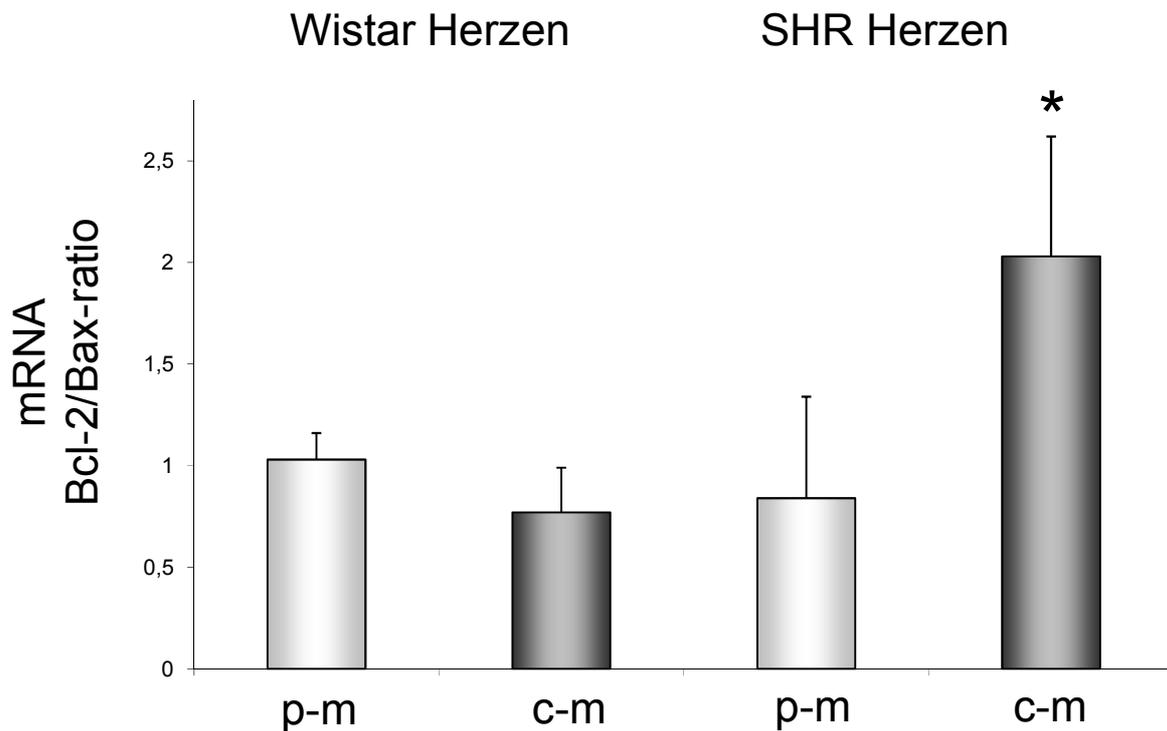


Abb. 4.18: Darstellung der relativen mRNA-Expression von Bcl-2/Bax in einer quantifizierten RT-PCR nach Perfusion von Ganzherzen im Langendorff-Modell mit Überständen aus SHR Progenitorzellen. Die RT-PCR ist normiert auf HPRT. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=8$ Herzen pro Bedingung und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unconditionierten Kontrollen (p-m) beträgt in der Perfusionslösung 1:10000.

4.8 Zytokine in konditionierten Überständen von Progenitorzellen

4.8.1 Ratten-Array

Auf der Suche nach Ursachen für die beobachteten positiven Effekte der kardialen Progenitorzellen werden Zytokinarrays durchgeführt. Mit dieser Methode können die verschiedenen konditionierten Überstände auf von den Progenitorzellen freigesetzte Zytokine untersucht werden und somit ein parakrines Profil dieser Zellen erstellt werden. Bei der Analyse der Überstände von Ratten-CPCs werden aus 19 detektierbaren Zytokinen im Vergleich zur Kontrolle folgende Zytokine vermehrt sezerniert. Reihe 1: CINC-3, Fraktaline, Reihe 2: IL-6, LIX, Reihe 3: MCP-1, MIP-3 α , TIMP-1, TNF- α und VEGF. Zudem gibt es Unterschiede zwischen den Überständen aus Wistar und SHR. IL-6 wird von den SHR Progenitorzellen im Vergleich zu den Wistar Progenitorzellen vermehrt freigesetzt, während MIP-3 α und TNF- α von SHR vermindert sezerniert werden. Zudem zeigen die Ergebnisse, dass die genannten Zytokine erst am Ende der Kulturperiode in verstärktem Maße abgegeben werden.

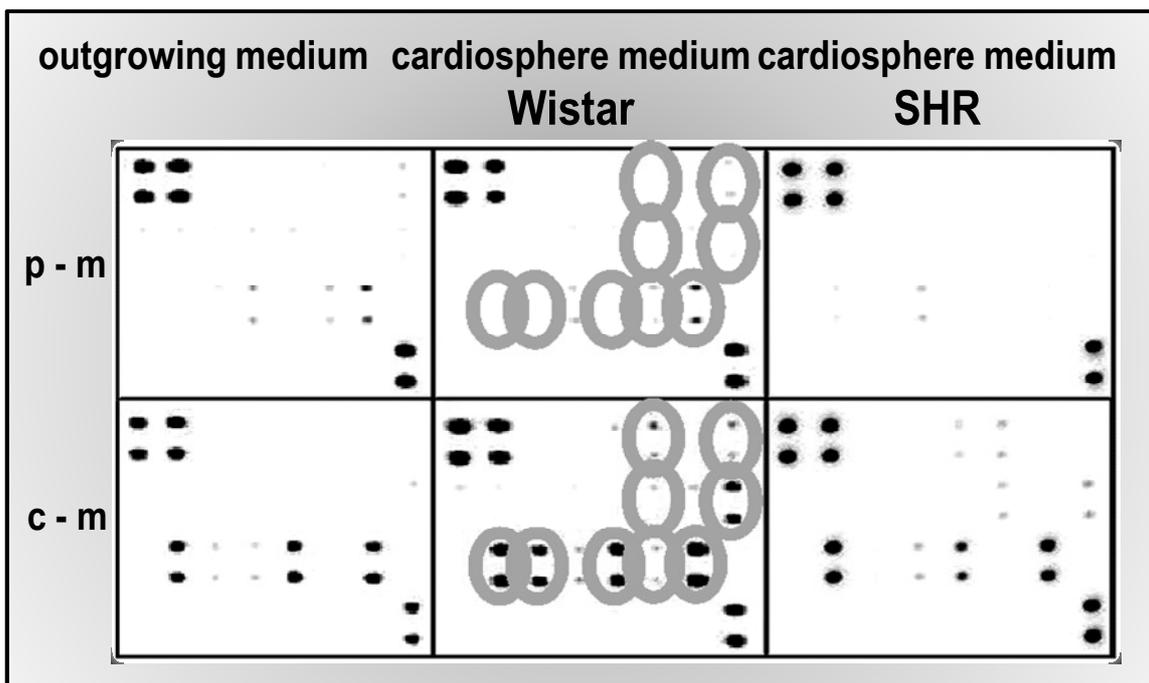


Abb. 4.19: Beispielhafte Darstellung der Membranen aus dem RayBio[®] Rat Cytokine Antibody Array I. Verglichen werden die konditionierten Überstände der Progenitorzellen (c-m) mit deren unkonditionierten Medien (p-m). Aufgeführt sind Überstände aus der Anzuchtphase (outgrowing) und Überstände vom letzten Tag der CPC-Zellkultur von Wistar und SHR. Die markierten Bereiche zeigen die unterschiedliche Intensität der Membranschwärzung in den Reihen 1 bis 3, in welchen die mengenmäßig veränderten Zytokine detektiert werden.

4.8.2 Human-Array

Bei der Auswertung des humanen Zytokinarrays wird aus 507 detektierbaren Zytokinen eine breite Palette an sezernierten Faktoren ermittelt, wobei hier wie bei den Ratten in den konditionierten Überständen aus Progenitorzellen ebenfalls Unterschiede zu den unkonditionierten Kontrollen festzustellen sind. Wie in Abb. 4.20 zu erkennen ist, werden von humanen Überständen eine ganze Reihe an Zytokinen im Vergleich zur Kontrolle vermehrt sezerniert. Dabei sind bei einigen Zytokinen wie zuvor bei den Ratten Unterschiede zwischen Hypertonikern und Nichthypertonikern zu erkennen.

Detektierte Zytokine in konditionierten Überständen aus humanen Progenitorzellen

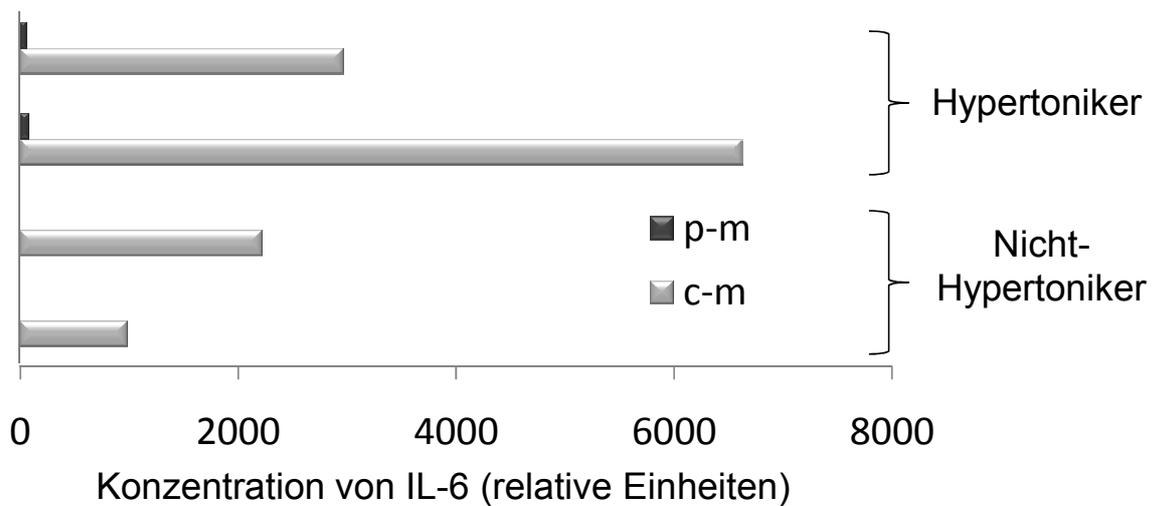
| | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Activin A | GRO |
| Activin C | Heregulin /NDF/GGF |
| Angiopoietin 1 | HVEM/TNFRSF 14 |
| Angiopoietin -like 1 | IGF BP3 |
| Angiopoietin -like 2 | IGF BP4 |
| APRIL | IGF BP6 |
| BDNF | IGF1 |
| BMP3 | IL-1 ra |
| BMP8 | IL-1 4R |
| CD30 ligand /TNFSF8 | IL-6 |
| CD40/TNFRSFS | IL-8 |
| CD40 ligand /TNFSF5/CD154 | IL-1beta |
| Dkk -4 | latent TGFbeta bp1 |
| EDA -A2 | LIF R alpha |
| EGVEGF/PK1 | MMP-1 |
| Erythropoietin | Pentraxin 3/TSG -14/ MCP-1 |
| FGFbasic | RELT/TNFRSF 19L |
| FGF -13 1B | SIGIRR |
| Galectin -3 | TIMP-1 |
| GDF -15 | TIMP -2 |
| Glut-1 | VEGF gamma |

Abb. 4.20: Dargestellt ist eine Liste aller in den konditionierten Überständen (c-m) aus humanen Progenitorzellen detektierten Zytokine, welche im Vergleich zur Kontrolle (p-m) in erhöhter Konzentration zu finden sind. Die hervorgehobenen Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1, MMP-1 und TIMP-1 werden in Überständen von Hypertonikern gegenüber Nichthypertonikern vermehrt sezerniert.

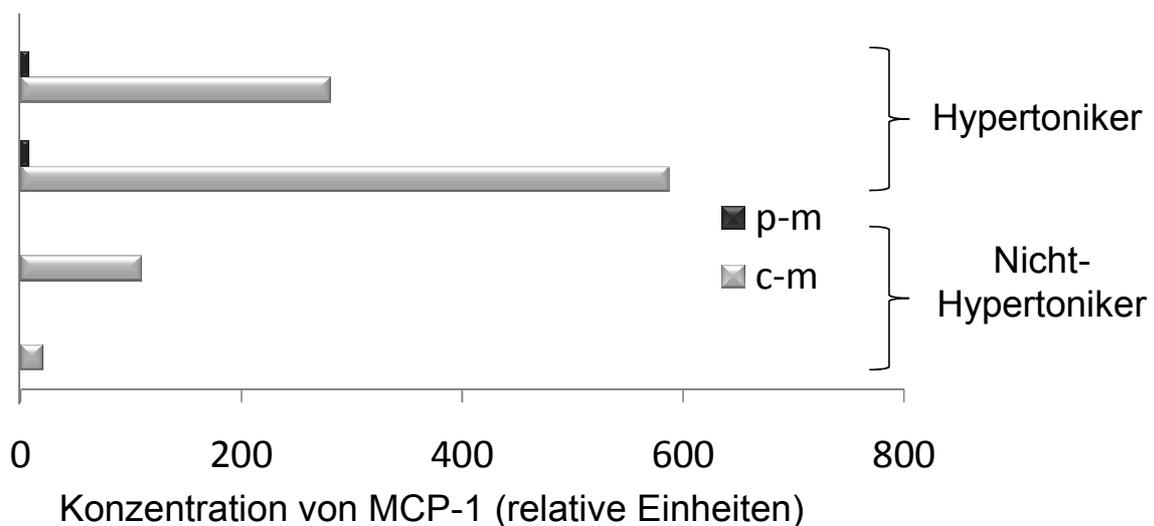
Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse zeigen die unterschiedlichen Mengen an detektierten Zytokinen in den Überständen aus humanen, zu Gruppen zugeordneten Progenitorzellen (Abb. 4.21 **A**: IL-6, **B**: MCP-1, **C**: TIMP-1). Dabei fällt deutlich die verstärkte Freisetzung der aufgezeigten Zytokine bei der Gruppe der Hypertoniker im Vergleich zu der Gruppe der Nichthypertoniker auf.

A



B



c

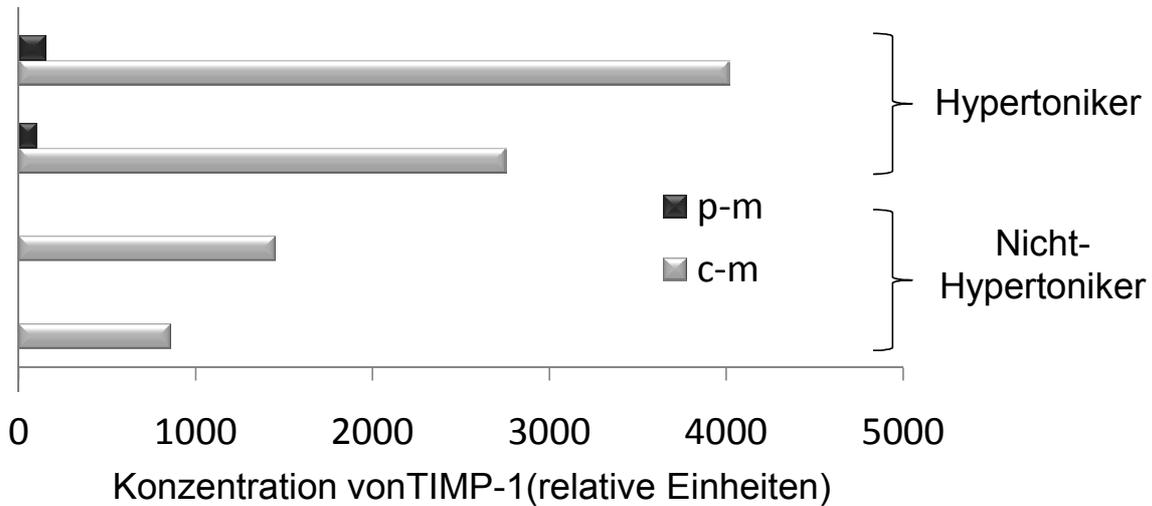


Abb. 4.21 A-C: Darstellung der relativen Menge an sezernierten Zytokinen in Überständen aus humanen Progenitorzellen von jeweils zwei Patienten aus der Gruppe der Hypertoniker und der Gruppe der Nichthypertoniker. Die Länge der Balken entspricht der Membranschwärzung im Bereich des jeweiligen Zytokins, welche von der Analysis Tool Software der Firma Ray Biotech Inc.[®] detektiert wird. Hierbei werden jeweils die konditionierten Überstände (c-m) mit den unconditionierten Überständen (p-m) und die Gruppe der Hypertoniker mit der Gruppe der Nichthypertoniker verglichen.

4.9 Einfluss der Hypertonie auf die kontraktile Funktion

Analog zum Ratten-Modell, in welchem die Effekte konditionierter Überstände aus normotensiven Wistar-Ratten und spontan hypertensiven Ratten verglichen werden, erfolgt die Untersuchung der kontraktilen Funktion von isolierten Wistar Kardiomyozyten nach Inkubation mit konditionierten Überständen aus humanen Progenitorzellen. Hierbei werden Überstände von Hypertonikern mit Überständen von Nichthypertonikern verglichen.

Ergebnisse

Zur Einteilung der Patienten wird der Status der Bluthruckerkrankung anhand von Operationsberichten und Medikationsdaten erhoben. Zudem werden Überstände aus verschiedenen Herzlokalisationen (Atrium und Ventrikel) verglichen, was allerdings keinen Einfluss auf die Effekte zu nehmen scheint. Die Effekte der konditionierten Überstände auf die kontraktile Funktion fallen ähnlich wie beim Ratten-Modell aus. Die Überstände der Gruppe der Nicht-Hypertoniker führen zu einem Anstieg der kontraktile Funktion um $7,5 \pm 1,9$ % SEM und die Überstände der Hypertoniker verursachen eine Verbesserung der kontraktile Funktion von $22,2 \pm 3,3$ % SEM (Atrium) und $22,3 \pm 3,4$ % SEM (Ventrikel).

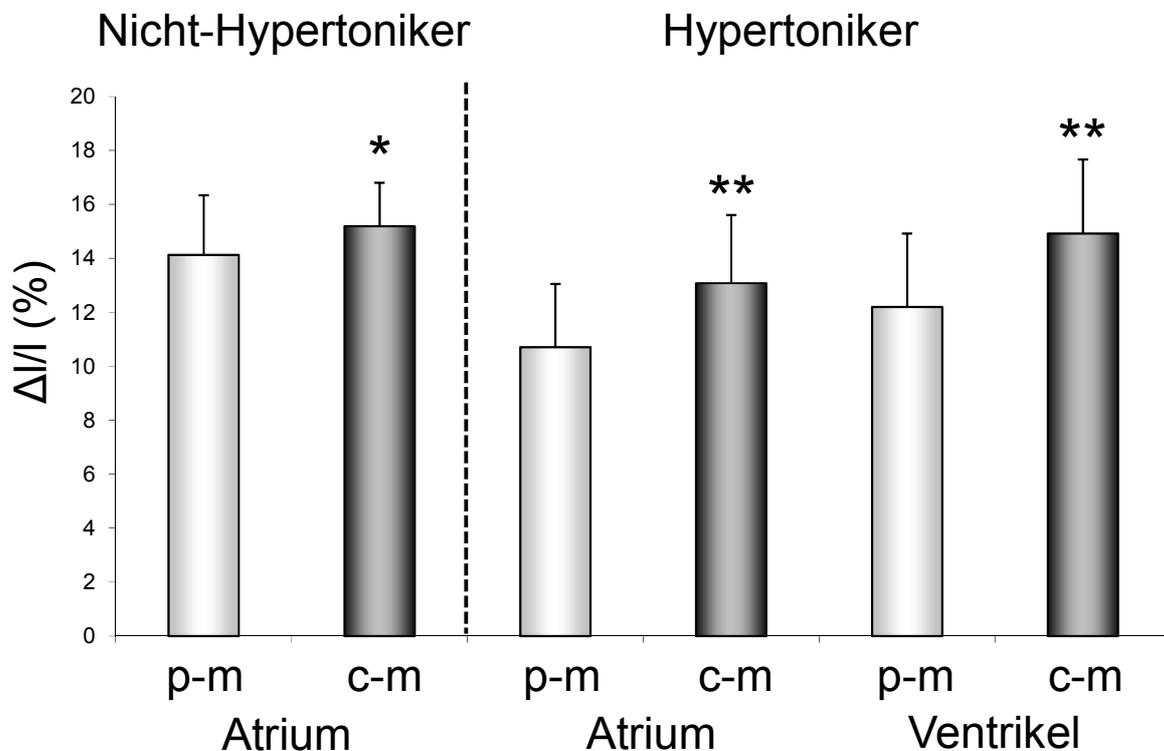


Abb. 4.22: Darstellung der kontraktile Funktion ($\Delta I/I$) von isolierten Wistar-Kardiomyozyten nach Behandlung mit Überständen aus Progenitorzellen von humanen Nichthypertonikern und Hypertonikern. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Schalen pro Bedingung aus je zwei unterschiedlichen Präparationen und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrollgruppe ($p < 0,05$ vs. zugehöriges p-m) sind mit einem Stern (*) markiert. Der Doppelstern (**) bezeichnet zur Kontrollgruppe hochsignifikante Unterschiede ($p < 0,01$ vs. p-m). Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

4.10 Korrelation zwischen Hypertonus und kontraktile Funktion

Die Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der Vorerkrankung des Gewebespenders (Hypertoniker) und der Ausprägung der positiven kardialen Effekte vermuten. Zur Überprüfung werden alle humanen Proben auf einen Zusammenhang zwischen dem Bluthochdruck und der kontraktile Funktion untersucht. Hierbei kann ein signifikanter Unterschied von im Mittel $66,1 \pm 6,7 \%$ zwischen der Gruppe der Nichthypertoniker gegenüber der Gruppe der Hypertoniker verzeichnet werden. Somit ist eine Korrelation zwischen dem Blutdruckstatus der CPC-Donoren und der Verbesserung der kontraktile Funktion von isolierten Kardiomyozyten anzunehmen.

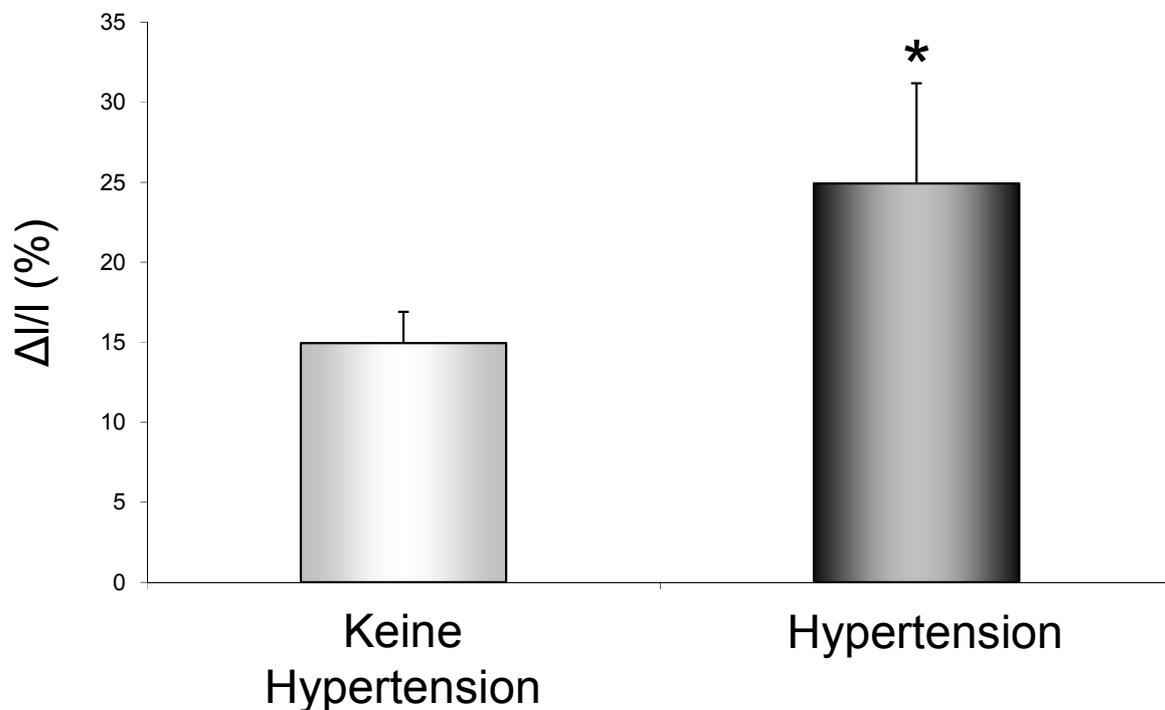


Abb. 4.23: Darstellung der kontraktile Funktion ($\Delta I/I$) von isolierten Wistar-Kardiomyozyten nach Behandlung mit Überständen aus Progenitorzellen von humanen Patienten mit unterschiedlichem Blutdruck-Status. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus $n=6$ Patienten je Gruppe und der Standardfehler des Mittelwertes. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p < 0,05$) sind mit einem Stern (*) markiert. Die Endverdünnung der konditionierten Überstände aus den Progenitorzellen (c-m) und deren zugehörigen unkonditionierten Kontrollen (p-m) beträgt auf den Versuchsschalen 1:10000.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wird ein positiver Einfluss von konditionierten Überständen ex vivo generierter kardialer Progenitorzellen auf die Funktion und das Remodeling des Herzens nachgewiesen. Darüber hinaus wird die Rolle der parakrinen Mechanismen als die wesentliche Ursache für die beobachteten Effekte deutlich. Des Weiteren kann gezeigt werden, dass die kardialen Konstitutionen des Gewebe-Donors und des Empfängers bei der Ausprägung dieser Effekte eine elementare Stellung einnehmen.

5.1 Maßgebliche Charakteristika von kardialen Progenitorzellen

Die Dokumentation der Kultivierung und die Charakterisierung von kardialen Progenitorzellen in der aktuellen Studie ermöglichen einen Rückschluss auf die Funktionalität und die Beschaffenheit der generierten Zellen. Das Auftreten von opaken Cardiosphären-bildenden Zellen und Cardiosphären selbst ist ein Kriterium für die Kultivierung von partiell differenzierten kardialen Progenitorzellen in Anlehnung an das Protokoll der Arbeitsgruppe von Messina (Messina et al., 2004).

Auch andere Arbeitsgruppen konnten durch Validierung der „Cardiosphären-Methode“ kardiale Progenitorzellen aus myokardialem Gewebe von Mensch und Ratte kultivieren und generierten ebenso von Cardiosphären abgeleitete Zellen (Davis et al., 2009). Diese klonogenen Kulturen waren ebenfalls in der Lage zur Differenzierung, zur Sekretion pro-angiogenetischer/ kardiogener Faktoren und zur Verbesserung der Herzfunktion im post-infarziellen Myokard und waren zudem durch das Auftreten kleiner, runder, opaker Zellen (cardiosphärische Zellen) gekennzeichnet (Davis et al., 2009).

Der Nachweis von typischen kardialen Markern und Stammzellmarkern in den Progenitorzellen ist ein weiterer Beweis für die Generierung von Zellen mit kardialen Merkmalen, die gleichzeitig auch die Eigenschaften von Stammzellen innehaben. Diese Stammzellmarker sind auch in anderen Studien der Ausgangspunkt einer Untersuchung von Einflüssen verschiedener Populationen von Stammzellen und Progenitorzellen auf die Funktion des (meist erkrankten) Herzens.

Dass die Zellen in dieser Studie einer Population von Progenitorzellen entsprechen, welche sich auf dem Weg zur Entwicklung in Richtung herzspezifischen Gewebes befinden, wird durch die Detektion von Calciumtransienten deutlich gemacht.

Das Auftreten von spontanen intrazellulären Calciumtransienten ist ein typisches Merkmal von Zellen mit kardiomyozytärem Charakter. So konnte bei Stammzellen in anderen Studien eine Differenzierung zu Kardiomyozyten und sogar ein spontanes Schlagen der Zellen festgestellt werden (Matsuura et al., 2004; Oyama et al., 2007).

5.2 Beurteilung des Einflusses auf die kontraktile Funktion

Die Untersuchung isolierter Kardiomyozyten im elektrischen Feld zeigt deutlich den Einfluss der konditionierten Überstände von Progenitorzellen auf die kontraktile Funktion. Der Großteil der Versuche beweist eine signifikante positive Beeinflussung der fraktionellen Zellverkürzung. Dieser günstige Effekt wird in unterschiedlichen Modellen auf seine Beeinflussbarkeit und seine möglichen Ursachen untersucht. Hierbei wird sowohl der Spender der kardialen Progenitorzellen als auch der Empfänger als Variable im Versuch unter ansonsten gleichen Bedingungen geändert. Zunächst zeigt sich bei Einsatz von konditionierten Überständen aus Progenitorzellen von spontan hypertensiven Ratten eine deutliche Zunahme des ohnehin positiven Effekts in Bezug auf die kontraktile Funktion.

Der Verdacht, dass die Vorerkrankung der Tiere mit bestehendem Bluthochdruck die unterschiedliche Ausprägung des positiven Effekts verursachen könnte, wird nunmehr in nachfolgenden Versuchen verifiziert. Es ist davon auszugehen, dass die SHR im Vergleich zu den normotensiven Kontrolltieren durch die Bluthochdruckbedingte Vorschädigung des Herzens eine veränderte endogene Aktivität ihrer kardialen Schutzfunktionen aufweisen. Der Status der pathologischen Vorschädigung des Herzens würde somit eine Veränderung der in das Kulturmedium sezernierten Substanzen bedingen. Ähnliche Studien der Arbeitsgruppe Gnecci konnten zeigen, dass konditionierte Überstände mesenchymaler Stammzellen inotrope Faktoren freisetzen, welche die kontraktile Funktion von isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten positiv beeinflussen (Gnecci et al., 2006). Auch sie analysierten die kontraktile Funktion und konnten ebenfalls eine signifikante Verbesserung der Effekte durch Überstände hypoxischer MSC nach bereits 24 Stunden verzeichnen. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls einen stärkeren Effekt von hypoxischen MSC aus dem Knochenmark auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten nach 72 Stunden Kultivierungszeit beobachten (Takahashi et al., 2006).

Davon ausgehend wird nunmehr die Beeinflussbarkeit von unterschiedlichem Empfängergewebe analysiert. Hierbei wird deutlich, dass Kardiomyozyten, welche ebenfalls von spontan hypertensiven Ratten stammen, eine Veränderung in Bezug auf ihre Ansprechbarkeit auf die unterschiedlichen Überstände aufweisen. Die hochgradige Verbesserung der kontraktile Funktion der Kardiomyozyten von SHR, welche zuvor mit konditionierten Überständen von SHR behandelt wurden, lässt auf eine vorschädigungsbedingte Veränderung der Beeinflussbarkeit schließen.

Es ist naheliegend, dass endogene Reparaturmechanismen und Regelkreise in den durch Bluthochdruck geschädigten Herzen eine Verschiebung der generellen Ansprechbarkeit der Zellen auf „herzschützende“ Mechanismen induzieren. Zudem kann aufgrund des Versuchsaufbaus auf einen parakrinen Effekt der konditionierten Überstände auf die isolierten Kardiomyozyten geschlossen werden.

Der Einfluss der Hypertonie auf die Ausprägung der positiven kardialen Effekte, welche in den Versuchen mit SH-Ratten zu beobachten sind, wird in weiteren Versuchen zur Myozytenkontraktion im elektrischen Feld ebenso mit humanen kardialen Progenitorzellen untersucht. Hierbei werden analog zu den Ratten die Überstände der humanen Progenitorzellen aufgrund von vorliegenden Krankendaten zu Gruppen von Nichthypertonikern und Hypertonikern zugeordnet. Die Experimente zeigen hierbei ebenfalls einen positiven Einfluss der konditionierten Überstände auf die kontraktile Funktion von isolierten Kardiomyozyten, welcher wiederum bei der Gruppe der Hypertoniker enorm verstärkt wird.

Diese Beobachtung untermauert die These, dass die positiven Effekte kardialer Progenitorzellen durch die Herkunft des Gewebes, d.h. den körperlichen Zustand des Spenders, stark beeinflusst werden. Der Vergleich von Gewebe unterschiedlicher Herz-Lokalisationen zeigt, dass der Entnahmeort des Gewebes offenbar keinen Einfluss auf die beobachteten Effekte zu nehmen scheint.

5.3 Veränderte Proteinexpression in behandelten Kardiomyozyten (late remodeling)

5.3.1 Calciumhandling in Kardiomyozyten

Die Veränderung der Expression der Calciumhandling-Proteine in den isolierten Kardiomyozyten, welche mit Überständen der Progenitorzellen von SHR behandelt wurden, weist auf ein intrazelluläres Remodeling hin.

Der Anstieg des Serca/NCX-Verhältnisses ist ein deutlicher Indikator für eine Verbesserung der elektromechanischen Kopplung, welche die Voraussetzung für die Kontraktionsfähigkeit des Herzens darstellt. Hierbei findet die Umwandlung der eintreffenden elektrischen Erregung in mechanische Arbeit statt.

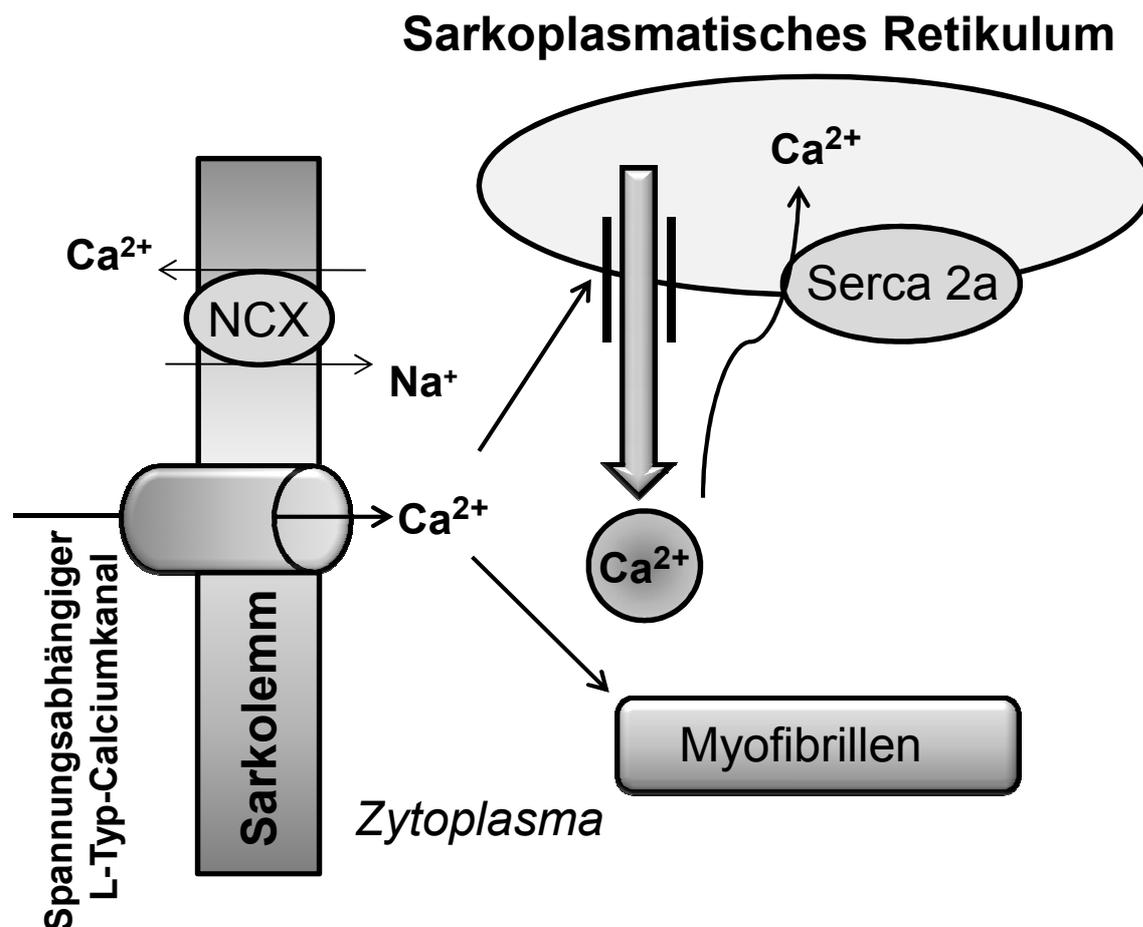


Abb. 5.1: Rolle von Serca und NCX bei der elektromechanischen Kopplung

Serca 2a: sarko(endo)plasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase Isoform 2a

NCX: sarkolemmaler $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher

Sowohl die sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase als auch der Natrium-Calcium-Austauscher sind für den Calciumtransport aus dem Zytosol am Ende der Kontraktionsphase verantwortlich. Die Serca 2a pumpt dabei den mengenmäßig größeren Anteil des zuvor in der Kontraktion freigesetzten Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum, wo es dann für den nächsten Kontraktionszyklus zur Verfügung steht. Speziesabhängig werden dabei 70 – 92% des intrazellulären Ca^{2+} von der Serca 2a transportiert (Bers et al., 2006).

Durch die Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum steigt die Ca^{2+} -Konzentration in kürzester Zeit um ca. zwei Zehnerpotenzen an. Ca^{2+} -Ionen binden am Troponin C-Molekül, wodurch die Konformation des Tropomyosins verändert wird. Dadurch werden Bindungsplätze für Myosin am Actin frei und die beiden kontraktile Proteine können sich miteinander vernetzen (Myofibrillen). Dies führt letztendlich zur Verkürzung und Kraftentwicklung jeder einzelnen Herzmuskelzelle und im Verband zur Kontraktion des Herzmuskels und zum Auswurf des Schlagvolumens.

Diese Verbesserung des Ca^{2+} -Managements der Kardiomyozyten kann somit als Ursache für die funktionelle Verbesserung (kontraktile Funktion) postuliert werden. Durch den Nachweis eines linearen Zusammenhanges beider Variablen ist die Richtigkeit dieser These sehr wahrscheinlich. So konnte auch in anderen Studien gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der Serca 2a in ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten unter adrenerger Stimulation zu einer deutlichen Verbesserung der kontraktile Funktion führt (Anwar et al., 2008).

5.3.2 Apoptosemarker in Kardiomyozyten

Der Anstieg des Bcl-2/Bax-Verhältnisses in den behandelten Kardiomyozyten spricht für eine Verminderung der Apoptoserate in den Zellen. Das Cytochrom C ist zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran lokalisiert und wird infolge entsprechender Stimuli durch die Membranporen freigesetzt und aktiviert daraufhin die Caspase-Kaskade (Abb. 5.2). Das Protein Bcl-2 dichtet die Mitochondrien-Membran ab und hindert Cytochrom C somit daran die Mitochondrien zu verlassen. Als extrazelluläre Stimuli können verschiedene Mediatoren über einen trimere Rezeptor an der Zellmembran die Caspase-Kaskade aktivieren. Extrazelluläre Mediatoren sind dabei das lösliche Protein TNF- α und andere Zytokine. TNF- α bindet an den spezifischen Rezeptor der Zellmembran, welcher dann eine Modulation des sich an der Innenseite der Zellmembran befindlichen „death inducing signaling complex“ bewirkt. Auch kann TNF- α über eine Aktivierung spezifischer Caspasen die Apoptose auslösen.

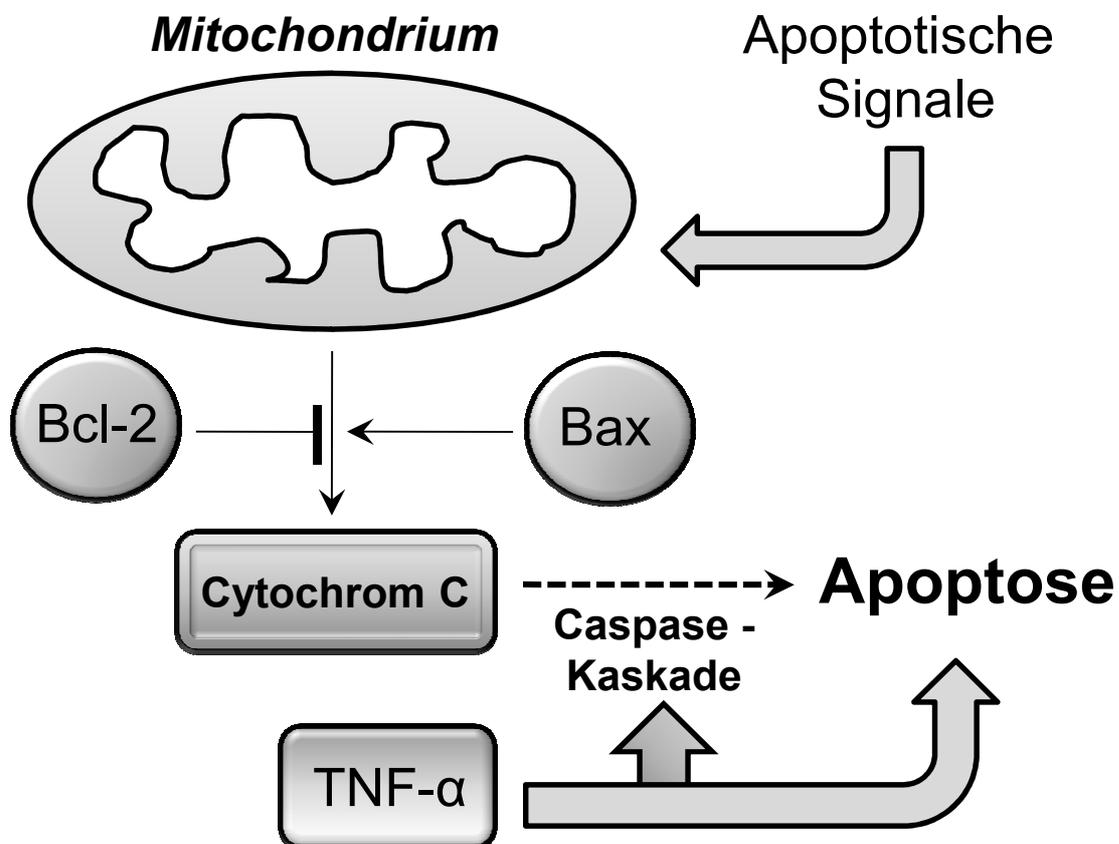


Abb. 5.2: Rolle von Bcl-2 und Bax bei der Regulation der Apoptose

Die Vertreter der Bcl-2-Familie sind entweder pro- oder anti-apoptotisch und regulieren die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Ihre Hauptfunktion ist die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium über eine Veränderung der Membranpermeabilität (Elmore, 2007).

Bei einer stärkeren Expression von Bcl-2 im Verhältnis zu Bax überwiegen die anti-apoptotischen Effekte in den betroffenen Zellen. Durch eine Bildung von Heterodimeren zwischen pro- und anti-apoptotischen Vertretern verschiebt sich das Gleichgewicht und die Apoptose kann eingeleitet werden. Zum Beispiel kommt es durch Bildung eines Heterodimers von Bad mit Bcl-2 zur Neutralisierung der protektiven Wirkung, was den Zelltod bewirken kann (Yang et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen konnten zudem zeigen, dass Bcl-2 seine anti-apoptotische Wirkung entfaltet indem es Bax bindet (Bagci et al., 2006).

5.4 Schutz vor Apoptose in behandelten Kardiomyozyten

Aufgrund der Verschiebung im Verhältnis der Apoptose-regulierenden Proteine werden isolierte Kardiomyozyten von Wistar und SH-Ratten mit Überständen von Progenitorzellen spontan hypertensiver Ratten behandelt und ihre Apoptoseraten untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine hoch signifikante Verminderung des Anteils an apoptotischen Zellen nach 24 Stunden bei Wistar Kardiomyozyten, welcher bei SHR Kardiomyozyten sogar in noch stärkerem Maße vermindert ist. Der Anteil an apoptotischen Zellen wird somit durch die Inkubation mit den konditionierten Überständen reduziert. Zudem zeigt dieser Versuch wiederholt eine erhöhte Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten von SHR auf die konditionierten Überstände der Progenitorzellen von spontan hypertensiven Ratten.

In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass konditionierte Überstände von hypoxischen mesenchymalen Stammzellen die Apoptose und Nekrose in isolierten Kardiomyozyten von Ratten, welche unter niedriger Sauerstoffspannung standen, reduzieren (Gnecchi et al., 2005). Die Vermutung liegt nahe, dass bei den in dieser Studie eingesetzten blutdruckbelasteten SHR mit suboptimaler Sauerstoffversorgung des Herzens ähnliche Mechanismen zur Funktionsverbesserung beitragen. Ebenso konnten einige Studien nach Behandlung von isolierten Kardiomyozyten mit Überständen aus hypoxischen MSCs eine Verminderung der Apoptose und eine Heraufregulation des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 in den Kardiomyozyten feststellen (Uemura et al., 2006; Xu et al., 2007).

5.5 Überprüfung der Genexpression und der Postinfarkt-Erholung (early remodeling) nach Langendorff-Perfusion

Durch die Perfusion von isolierten Rattenherzen im Langendorff-Modell lässt sich anhand der RT-PCR eine frühe Expression bzw. Induktion bestimmter Gene untersuchen und zugleich anhand des gemessenen rate-pressure products (RPP) die Postinfarkt-Erholung der Herzen überprüfen. Durch die Langendorff-Perfusion als Infarkt-Modell kann eine postischämische funktionelle Verbesserung von Herzen durch Behandlung mit unterschiedlichen Substanzen direkt und mit klinischem Hintergrund überprüft werden.

5.5.1 Recovery in isolierten Ganzherzen

Nach der Behandlung mit Progenitorzell Überständen von SHR zeigt sich in Bezug auf das Startlevel sowohl bei den Wistar Herzen als auch bei den SHR Herzen nach der Ischämie eine signifikante Verbesserung des rate-pressure products. Diese schnelle Postinfarkterholung der perfundierten Herzen ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die konditionierten Überstände bereits in niedrigen Konzentrationen und schon zu einem frühen Zeitpunkt zu Funktionsverbesserungen, möglicherweise durch günstige Umbauprozesse innerhalb des Herzens, beitragen.

Die Verbesserung der Recovery deutet somit auf eine optimierte post-ischämische Funktionserholung der Herzen durch parakrine Mechanismen hin. Die Arbeitsgruppe von Gnechi konnte einen unmittelbaren parakrinen Effekt von Stammzellen in einer ischämischen Umgebung verzeichnen (Gnechi et al., 2008). Hierbei kam es zur Freisetzung von zytoprotektiven Molekülen, welche direkt die Überlebensrate der Kardiomyozyten steigerten.

Somit kann also postuliert werden, dass diese oder ähnliche Zytokine in den konditionierten Überständen der Progenitorzellen in der aktuellen Studie gleichermaßen mittels parakriner Mechanismen zur Verbesserung der Herzfunktion beitragen.

5.5.2 Calciumhandling in isolierten Herzen

In diesen perfundierten Herzen wird nun per RT-PCR die Expression jener Gene analysiert, deren Untersuchung auf Proteinebene auch bei den Kardiomyozyten per Western Blot im Fokus steht. Hierbei zeigt sich auf genetischer Ebene keine signifikante Veränderung der mRNA-Spiegel von Serca 2a und NCX. Dies ist vermutlich auf eine verlangsamte Genaktivierung im Vergleich zum late-remodeling-Versuch an isolierten Kardiomyozyten zurückzuführen. Während letztere nach 24 Stunden geerntet und untersucht werden, ist die Perfusion in der Langendorff-Anlage dagegen ein Kurzzeit-Modell.

Die Herzen zeigen zwar einen Trend zur Verbesserung des Serca/NCX-Verhältnisses, allerdings keinen signifikanten. Die veränderte Ansprechbarkeit der Calciumhandling-Proteine im Versuch könnte wiederum auf die Vorschädigung durch die chronische Blutdruckbelastung zurückzuführen sein. Zahlreiche Studien konnten eine Verminderung der mRNA-Expression der Serca 2a in Herzen mit Hypertrophie und bei Herzinsuffizienz (Mercadier et al., 1990; Levitsky et al., 1991) nachweisen.

Auch bei Hunden mit kongestiver Herzinsuffizienz konnte gezeigt werden, dass diese Erkrankung mit einer nachteiligen Veränderung des Calciumhandlings sowie kontraktile Dysfunktion einhergeht (Yeh et al., 2008).

Die Perfusion nach Langendorff ist durch die Phase der Ischämie ein dem „natürlichen“ Herzinfarkt sehr nahe kommendes Modell. Es wäre möglich, dass der durch die konditionierten Überstände zu erwartende positive Effekt an den bereits vorgeschädigten Herzen nicht ausreicht, um eine verminderte Genaktivierung der Serca 2a zu übersteuern.

5.5.3 Apoptose in isolierten Herzen

Bei der Untersuchung der Apoptose-regulierenden Gene zeigt sich erneut eine Zunahme des Bcl-2/Bax-Verhältnisses in den SHR Herzen, was wiederum für eine Induktion anti-apoptotischer Mechanismen in den perfundierten Herzen spricht. Zudem wird hier nochmals eine erhöhte Ansprechbarkeit des SHR Gewebes auf SHR Überstände deutlich. Die Apoptose spielt auch beim Herzinfarkt und der Herzinsuffizienz eine Rolle und tritt zudem vermehrt in Gefäßen mit hochdruckassoziierten Umbauprozessen auf (Bennett, 2002).

Studien haben bewiesen, dass vermehrte, durch Hypertonie bedingte mechanische Kräfte eine Induktion der Apoptose bewirken (Gonzalez et al., 2003). Nun liegt der Rückschluss nahe, dass zum einen die Überstände durch eine Verminderung der Apoptose in den perfundierten Herzen (Bcl-2/Bax \uparrow) zu einer Verbesserung der ischämischen Vorschädigung geführt haben und zum anderen ein Zusammenhang zwischen der Wirkung auf die Apoptose und der Vorschädigung der Bluthochdruck-belasteten CPC-Donoren (SHR) besteht.

Man könnte postulieren, dass ein chronischer Bluthochdruck in den Tieren nicht nur zu vermehrter Schädigung in Form von apoptotischen Prozessen, sondern auch zur Aktivierung interner Regelmechanismen führt, die diesem Geschehen entgegen wirken. Ein solcher Prozess würde wiederum die unterschiedlichen Effekte und die erhöhte Sezernierung bestimmter Zytokine erklären.

5.6 Untersuchung der konditionierten Überstände auf Zytokine

5.6.1 Zytokine in Progenitorzellen von Ratten

Auf der Suche nach Substanzen und Mechanismen, die für die beobachteten positiven kardialen Effekte verantwortlich sind, werden die konditionierten Überstände auf sezernierte Zytokine untersucht. Die Analysen zeigen zunächst, dass die konditionierten Überstände im Vergleich zum unkonditionierten Medium eine wesentlich größere Anzahl an Zytokinen beinhalten. Zudem wird deutlich, dass Überstände aus verschiedenen Progenitorzellen (Wistar/SHR) ein unterschiedliches Zytokinprofil aufweisen. Dabei wird IL-6 von den SHR Progenitorzellen vermehrt sezerniert, während MIP-3 α und TNF- α im Vergleich zu Wistar Progenitorzellen vermindert sezerniert werden.

Das Makrophagen-Entzündungsprotein 3alpha (MIP-3 α), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) spielen alle bei Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle. Den letzten beiden kommt außerdem noch eine Bedeutung bei der Entstehung der Herzinsuffizienz hinzu. Generell spielen Zytokine in der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz und anderer Erkrankungen eine wichtige Rolle. Bei der chronischen Herzinsuffizienz sind vor allem Interleukin (IL-6) und TNF- α von Bedeutung (Shan et al., 1997; Niebauer et al., 1998).

Beides sind Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, werden von verschiedenen Zelltypen sezerniert und zeigen eine Vielfalt von immunologischen und inflammatorischen Wirkungen. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem bei Patienten mit schwerer chronischer Herzinsuffizienz und somit schlechter linksventrikulärer Funktion und schlechter Prognose in erhöhten Konzentrationen auftritt und daher als ein prognostischer Marker der Herzinsuffizienz gilt (Tsutamoto et al., 1998). Wodurch die schädlichen Effekte von IL-6 hervorgerufen werden ist bislang ungeklärt.

Auch wurde eine erhöhte Expression des TNF- α im Herzgewebe von Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen, weshalb das Herz von einigen Autoren als Quelle für systemisch erhöhte TNF- α -Spiegel und somit als Ursache für die inflammatorische Zytokinaktivierung angesehen wird (Torre-Amione et al., 1996). Die Ursache der erhöhten Zytokinproduktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz bleibt weiterhin unbekannt.

Die verminderte Produktion von TNF- α in den Progenitorzellen der SHR wäre zudem eine mögliche Erklärung für die verminderte Apoptoserate in den Ganzherzen und Kardiomyozyten, da TNF- α als ein Aktivator der Caspasekaskade wirkt und somit eine indirekte pro-apoptotische Wirkung hat. Interessanterweise besteht laut Kao auch ein Zusammenhang zum Calciumhandling, da TNF- α die Expression der Serca 2a vermindert (Kao et al., 2010). Somit könnte der verminderte TNF- α -Spiegel in den Überständen der Progenitorzellen sowohl die Verbesserung des Calciumhandlings der behandelten Zellen als auch die Verminderung der Apoptose erklären.

Die Tatsache, dass diese drei Zytokine in den Überständen der SHR Progenitorzellen, welche einen offensichtlich gesteigerten positiven Effekt auf das Herz ausüben, gegenüber den Wistar Progenitorzellen in veränderten Mengen vorkommen, lässt auf eine Beteiligung dieser Faktoren am Gesamtgeschehen schließen. Auf welche Weise die genaue Beeinflussung und Veränderung der beobachteten Effekte durch diese Zytokine stattfindet, bleibt zunächst dahingestellt. Die Regulationsmechanismen und Wirkungshierarchien dieser Substanzen - so ist zum Beispiel das IL-6 in seiner Wirkung dem TNF- α untergeordnet - lassen keine direkten Rückschlüsse auf den Mechanismus der Effektverstärkung zu.

Deutlich ist allerdings, dass die Überstände der kardialen Progenitorzellen in dieser Studie, vielleicht gerade aufgrund ihres heterogenen Zytokincocktails einen messbaren Einfluss auf die Funktion und das Remodeling des Herzens haben. Zudem können die Überstände ihre Effekte an bereits vorgeschädigtem Gewebe offensichtlich verstärkt entfalten.

Weitere Zytokin-Kandidaten aus den konditionierten Überständen der Progenitorzellen von Ratten (WIS und SHR), die vermehrt sezerniert werden und somit ebenfalls eine Rolle in der Ausprägung und Richtung der Effekte spielen können, sind:

- CINC-3 (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-3): Entzündung
- Fractalkine (CX3CR1): Wachstumsfaktor
- LIX (Lipopolysaccharide-induced CXC chemokine) : Neutrophile Chemotaxis
- MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1): Apoptose, Entzündung
- TIMP-1 (Tissue Metalloproteinase Inhibitor): Zellproliferation und Anti-Apoptose
- VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor): Vaskulogenese und Angiogenese

5.6.2 Zytokine in humanen Progenitorzellen

Wie auch bei den Ratten werden die konditionierten Überstände kardialer humaner Progenitorzellen auf sezernierte Zytokine untersucht. Bei allen untersuchten Proben wird ein breites Spektrum an freigesetzten Faktoren gefunden. All diese sind somit Kandidaten für die Verursachung der beobachteten positiven Effekte. Da die Effekte durch die konditionierten Überstände von Personen mit protokolliertem Hypertonus stärkere Effekte aufweisen als jene von Nichthypertonikern und sich zudem Unterschiede im parakrinen Profil dieser beiden Gruppen feststellen lassen, ist es sinnvoll diese Verschiedenheiten näher zu erörtern.

Die in erhöhter Konzentration freigesetzten Zytokine in Überständen von Hypertonikern sind IL-6, IL-8, MMP-1, MCP-1 und TIMP-1. Die Rolle des Entzündungsmediators IL-6 im chronischen Herzinsuffizienz-Geschehen wurde bereits unter Punkt 5.6.1 erläutert. Das Auftreten des proinflammatorischen IL-8 wird ebenfalls als ein Prädiktor der Herzinsuffizienz gewertet (Dominguez-Rodriguez et al., 2006).

Das monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) wird unter anderem mit Apoptose von Kardiomyozyten und ventrikulärer Dysfunktion in Verbindung gebracht (Zhou et al., 2006). Unter anderem gibt es eine Studie, in welcher MCP-1 überexprimierenden Mäusen ihr veränderter Genotyp nach einem myokardialen Infarkt zum Vorteil gereichte (Morimoto et al., 2006).

Die vermehrte Expression der TIMP-1 und auch der MMP-1 in den Überständen der Hypertoniker geben in mehrfacher Hinsicht Anlass zu Spekulationen. Die proteolytischen Aktivitäten der Matrixmetalloproteasen (MMPs) werden von einer Familie natürlich vorkommender Proteine, genannt TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases), kontrolliert. Diese Inhibitoren tragen folglich zur Bewahrung der Balance zwischen Matrixdestruktion und -formation bei. TIMP-1 ist der am meisten verbreitete Inhibitor und trägt durch die spezifische Proteasenhemmung mit zur Regulation des Umsatzes der Extrazellulärmatrix und der Umgestaltung des Gewebes bei.

In zahlreichen Studien zeigte TIMP-1 außer der Hemmung der MMP weitere interessante Funktionen. Der Inhibitor stimuliert das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zelltypen unabhängig von der Fähigkeit zur Hemmung der MMP-Aktivität. So zeigten Studien, dass TIMP-1 das Wachstum eines breiten Spektrums von humanen Zelllinien stimuliert (Hayakawa et al., 1992).

In Bezug auf die von den Überständen hervorgerufenen Effekte ist es wichtig zu erwähnen, dass TIMP-1 ebenfalls eine vorwiegende Rolle bei der Apoptose spielt. So hemmt TIMP-1 nachweislich die Apoptose in Brustkarzinomen (Lee et al., 2003) und in hepatischen Sternzellen, im letzten Fall erwiesenermaßen durch Hemmung der MMP-1 (Murphy et al., 2002).

Die vermehrte Sezernierung des TIMP-1 in den untersuchten Überständen aus Hypertonikern könnte also durchaus positiven Einfluss auf die behandelten Kardiomyozyten nehmen. Allerdings ist wie bei den Ratten auch eine definitive Aussage hinsichtlich der Wirkungsweise der Überstände angesichts der immensen Anzahl an Zytokinen nicht zu treffen. Offensichtlich ist lediglich, dass der beobachtete Effekt auf parakrine Mechanismen zurückzuführen ist. Einige Studien führen das Signaling und die Therapieeffekte von adulten Stammzellen auf parakrine Mechanismen und freigesetzte Faktoren zurück (Gnecchi et al., 2008).

Andere Arbeitsgruppen konnten überdies in mesenchymalen Stammzellen beobachten, dass hypoxischer Stress zum Produktionsanstieg einiger dieser Faktoren führte (Kinnaird et al., 2004), was in Bezug auf die SHR in dieser Studie einen interessanten Anhaltspunkt darstellt.

Grundsätzlich kommen bei beiden Spezies eine ganze Reihe an zum Teil untereinander agierenden Substanzen für die Verursachung und unterschiedliche Ausprägung der beobachteten positiven Effekte in Frage. Die Überlegungen, welche Zytokine hierbei letztendlich den Ausschlag geben, über welche Mechanismen ihre Wirkungen vermittelt werden, ob diese gezielt beeinflussbar sind und ob die Faktoren sich möglicherweise sogar im Einzelnen als wirksame Substanzen zur Therapie kardialer Erkrankungen eignen könnten, stellen einen Ausgangspunkt zukünftiger Forschungen im Hinblick auf das Management des kranken Herzens dar.

6 Schlussfolgerung

Alle Versuche deuten auf einen parakrinen Mechanismus bei dem beobachteten Effekt der Verbesserung der kardialen Funktionen durch kardiale Progenitorzellen hin. Dabei nehmen sowohl die Konstitution des Gewebe-Spenders als auch die Konstitution des Gewebe-Empfängers einen Einfluss auf die Ausprägung dieser parakrinen Effekte.

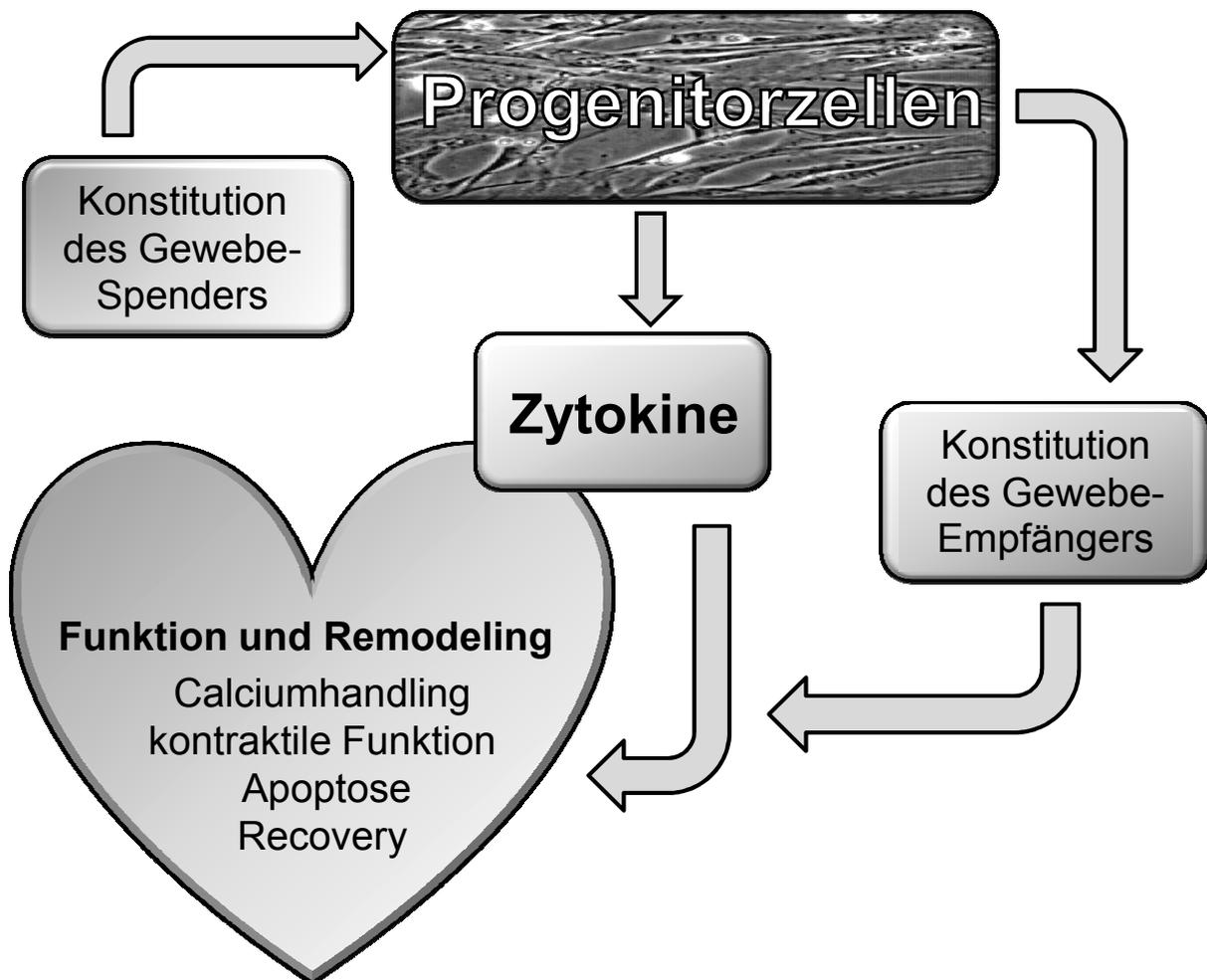


Abb. 6.1: Zusammenhänge zwischen den positiven kardialen Effekten und die Rolle der parakrinen Wirkungen von Überständen ex vivo generierter kardialer Progenitorzellen bei der Beeinflussung der Funktion und des Remodelings des Herzens

7 Zusammenfassung

Viele wissenschaftliche Untersuchungen und klinische Experimente konnten in jüngster Zeit die funktionsverbessernden Wirkungen von kardialen Stammzellen und Progenitorzellen, vorwiegend auf das erkrankte Herz, beweisen. Die exakten Mechanismen dieser positiven Beeinflussung sind bis dato weitestgehend ungeklärt. Diese Studie gab uns die Möglichkeit, die parakrinen Effekte adulter kardialer Progenitorzellen (CPC) in Hinblick auf das Management des kranken Herzens zu untersuchen. Die Progenitorzellen wurden aus Herzgewebe von normotensiven Wistar Ratten (WIS), spontan hypertensiven Ratten (SHR) sowie von Menschen gewonnen, wobei bei Letzteren eine Zuordnung zu Gruppen von Hypertonikern und Nichthypertonikern erfolgte. Dabei wurden im Zuge der Kultivierung die konditionierten Überstände der Progenitorzellen gewonnen und in anschließenden Versuchen auf ihre Einflüsse hinsichtlich des Remodelings und der kardialen Funktion von isolierten Kardiomyozyten und Ganzherzen analysiert. Bei dem Großteil der Untersuchungen standen die kardialen Progenitorzellen und deren Überstände am Ende der sechswöchigen Kultivierungsphase im Fokus. Zu diesem Zeitpunkt gewonnene konditionierte Überstände wurden zusammen mit ihren unkonditionierten Kontrollen in den Experimenten zur Untersuchung der kardialen Funktion und des Remodelings verwendet.

Die Charakterisierung ex vivo generierter Progenitorzellen erfolgte anhand von typischen kardialen Markern und Stammzellmarkern, welche durch Western Blot, RT-PCR und Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnten. Zudem wurde in den Zellen das Auftreten von spontanen Calciumtransienten überprüft. Versuche, in denen konditionierte Überstände kardialer Progenitorzellen für 24 Stunden mit isolierten Kardiomyozyten inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Verbesserung der kontraktile Funktion, was auf zellulärer Ebene auf einen ebenfalls nachgewiesenen Anstieg des Serca 2a/NCX-Verhältnisses (Indikator für verbessertes Calciumhandling) zurückzuführen ist. Auf gleiche Weise behandelte Kardiomyozyten zeigten im Hoechst-Assay eine Verminderung der Apoptoserate, was wiederum durch einen signifikanten Anstieg des Bcl-2/Bax-Verhältnisses (Überwiegen des anti-apoptischen Effekts) verursacht wird. In beiden Versuchen konnte eine Verstärkung des Effekts bei Verwendung von Überständen von SHR im Vergleich zu WIS sowie in Versuchen mit Kardiomyozyten von SHR gezeigt werden.

Zusammenfassung

Generell konnte eine erhöhte Ansprechbarkeit isolierter Kardiomyozyten von SHR auf die konditionierten Überstände von SHR ermittelt werden. Diese Überstände wurden für Ischämie-Reperfusion-Versuche im Langendorff-Modell mit Herzen von WIS und SHR verwendet. Hierbei konnte in beiden Gruppen eine Verbesserung der Postinfarkt-Erholung (Recovery) und in den SHR Herzen eine erhöhte mRNA-Expression des Bcl-2 im Verhältnis zu Bax beobachtet werden.

Die Untersuchungen zur Auswirkung auf die kontraktile Funktion wurden auch mit Überständen von humanen Progenitorzellen durchgeführt, wobei deren Spender vor dem Hintergrund ihres Blutdruck-Status bewertet wurden. Hierbei ergab sich wiederum ein signifikanter Anstieg der kontraktilen Funktion bei der Gruppe der Nihthypertoniker, welcher bei der Gruppe der Hypertoniker sogar hoch signifikant ausfiel. Bei der Zusammenfassung aller Versuche mit humanen Progenitorzellen wird eine deutliche Korrelation zwischen dem Status der Hypertonie und der Verbesserung der kontraktilen Funktion von isolierten Kardiomyozyten ersichtlich.

Bei der Zytokin-Analyse der Überstände konnten in den verschiedenen Gruppen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration der freigesetzten Zytokine beobachtet werden. Besonders auffällig waren hierbei die Zytokine IL-6, welches von den SHR Progenitorzellen im Vergleich zu WIS vermehrt sezerniert wurde, sowie MIP-3 α und TNF- α , welche von SHR vermindert sezerniert wurden. In den humanen Überständen aus Progenitorzellen von Hypertonikern wurden die Zytokine IL-6, IL-8, MCP-1, MMP-1 und TIMP-1 vermehrt sezerniert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kardiale Progenitorzellen in der Lage sind, die kardiale Funktion und das Remodeling des Herzens durch parakrine Mechanismen zu verbessern. Die Ausprägung der Effekte wird hierbei sowohl durch den Donor als auch den Empfänger der konditionierten Überstände beeinflusst. Diese Phänomene sind wiederum sowohl auf das unterschiedliche parakrine Profil (Zytokincocktail) der Progenitorzellen (Donor) als auch die auf die Konstitution des untersuchten Materials (Empfänger) zurück zu führen. In beiden Fällen nimmt also der Status der Vorerkrankung einen ausgeprägten Einfluss auf das Geschehen. Diese Erkenntnisse stellen ein Schlüsselement zukünftiger Forschungen dar und ermöglichen somit eine gezielte Untersuchung von Signaltransduktionswegen und Mechanismen, um das Potenzial der Zytokine in der gezielten Behandlung kardialer Erkrankungen ausnutzen zu können.

8 Summary

A numerousness of scientific investigations and clinical trials in the recent past could prove the function-improving impacts of cardiac stem cells and progenitor cells, predominantly with regard to the diseased heart. The exact mechanisms of these positive influences are as far as possible not yet resolved. This study gave us the possibility to examine the paracrine effects of adult cardiac progenitor cells (CPC) in terms of the management of the failing heart.

The progenitor cells were gained from heart tissue of normotensive Wistar rats (WIS), spontaneous hypertensive rats (SHR) and of humans, whereas at the latter an allocation to groups of hypertonic patients and non-hypertonic patients was carried out. In the course of the cultivation, conditioned supernatants from progenitor cells were gained and used in subsequent experiments for analyses of remodeling and cardiac function of isolated cardiomyocytes and isolated hearts. The bulk of trails focused on the progenitor cells and their supernatants at the end of the six-week culture period. Supernatants that were gained at this point in time were, together with their unconditioned controls, used in analyses of cardiac function and remodeling.

The characterisation of the ex vivo generated progenitor cells took place by means of typical cardiac markers and stem cell markers, which could be detected by western blotting, RT-PCR and immunostaining. Furthermore, the occurrence of spontaneous calcium-transients in these cells was verified.

Trials, in which conditioned supernatants of cardiac progenitor cells were incubated for 24 hours with isolated cardiomyocytes, showed a significant increase in contractile function, which is on cellular rank due to a likewise proved rise of the Serca 2a/NCX-ratio (indicator for improved calciumhandling). Cardiomyocytes that were treated in a similar manner showed a decreased rate of apoptosis in Hoe-assays, which in turn is caused by a significant increase of the bcl-2/bax-ratio (preponderance of the anti-apoptotic effect). In each case by using supernatants from SHR or cardiomyocytes from SHR an amplification of the observed effect in comparison to those from WIS occurred. Generally, a higher receptiveness of isolated cardiomyocytes from SHR to the conditioned supernatants from SHR could be ascertained. These supernatants from SHR were used in Langendorff-ischaemia-reperfusion-tests with isolated hearts from WIS and SHR.

Summary

In this connection in both groups, an amelioration of the post-infarct-recovery and an increased mRNA-expression of Bcl-2/Bax-ratio in SHR-hearts could be noticed.

The impact studies on the contractile function were also carried out with supernatants from human progenitor cells, at which their donors were stated at the background of their hypertension. At this again a significant increase of contractile function in the group of non-hypertonic patients was observed, which increased in the group of hypertonics to a high significant level. Summing up all the results from human progenitor cells, a marked correlation between the status of hypertension and the increase of the contractile function of isolated cardiomyocytes becomes evident.

By performing cytokine-analysis of supernatants remarkable differences in composition and concentration of released cytokines could be observed. In particular noticeable were the cytokines IL-6, which was augmented produced from SHR progenitor cells in comparison to WIS and MIP-3 α and TNF- α , which were diminished in supernatants from SHR. In human supernatants from progenitor cells of hypertonic patients the cytokines IL-6, IL-8, MCP-1, MMP-1 and TIMP-1 were produced in larger quantities.

In summary, cardiac progenitor cells have the ability to ameliorate the cardiac function and remodeling of the heart by acting via paracrine mechanisms. The value of the effects is at this juncture influenced by the donor as well as by the receptor of the conditioned supernatants. These phenomenons are again caused by the variable paracrine profile (cytokine-cocktail) of the progenitor cells (donor) on the one hand and due to the condition of the observed material (recipient) on the other hand. In both cases the status of the pre-existing conditions exerts a distinct influence on the event. These findings pose a main element of prospective researches and therefore enable the selective investigation in mechanisms and paths of signal-transduction to take advantage of the potential of cytokines in the well-directed treatment of cardiac diseases.

9 Literaturverzeichnis

Anwar A, Schlüter KD, Heger J, Piper HM and Euler G (2008) Enhanced SERCA2A expression improves contractile performance of ventricular cardiomyocytes of rat under adrenergic stimulation. *Pflugers Arch*; 457 (2):485-91

Arends MJ, Morris RG and Wyllie AH (1990) Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol*; 136 (3):593-608

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

Bagci EZ, Vodovotz Y, Billiar TR, Ermentrout GB and Bahar I (2006) Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores. *Biophys J*; 90 (5):1546-59

Bell D, Allen AR, Kelso EJ, Balasubramaniam A and McDermott BJ (2002) Induction of hypertrophic responsiveness of cardiomyocytes to neuropeptide Y in response to pressure overload. *J Pharmacol Exp Ther*; 303 (2):581-91

Beltrami AP, 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 and Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*; 114 (6):763-76

Bennett MR (2002) Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart*; 87 (5):480-7

Bers DM, Despa S and Bossuyt J (2006) Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*; 1080 165-77

Brown S, Atkins C, Bagley R, Carr A, Cowgill L, Davidson M, Egnor B, Elliott J, Henik R, Labato M, Littman M, Polzin D, Ross L, Snyder P and Stepien R (2007) Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med*; 21 (3):542-58

Cohen JJ (1993) Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed)*; 28 (12):35-43

Dalton GR, Jones JV, Levi AJ and Levy A (2000) Changes in contractile protein gene expression with ageing and with captopril-induced regression of hypertrophy in the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*; 18 (9):1297-306

Davis DR, Zhang Y, Smith RR, Cheng K, Terrovitis J, Malliaras K, Li TS, White A, Makkar R and Marban E (2009) Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*; 4 (9):e7195

De Coppi P, Bartsch G, Jr., Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S and Atala A (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*; 25 (1):100-6

Deutsche-Hochdruckliga (2008) Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie. *Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL- Deutsche Hypertonie Gesellschaft*; 1-121

Dietz O, Fey K and Verter W (2005) Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems. In: *Dietz, O., Huskamp, B. : Handbuch Pferdepraxis, Enke-Verlag*; 250-272

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

Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, Garcia-Gonzalez M and Ferrer J (2006) Prognostic value of interleukin-8 as a predictor of heart failure in patients with myocardial infarction and percutaneous intervention. *Int J Cardiol*; 111 (1):158-60

Döring HJ and Dehnert H (1985) Das isolierte perfundierte Warmblüter-Herz nach Langendorff, In: Methoden der experimentellen Physiologie und Pharmakologie *Biomeßtechnik Heft V., Biomesstechnik-Verlag March GmbH*

Elmore S (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*; 35 (4):495-516

Evans T, Johnson C and Wernham J (2007) A global study of category prospects. *Cardiovascular Insight*; Wood Mackenzie

Fliss H (1998) Accelerated apoptosis in reperfused myocardium: friend of foe? *Basic Res Cardiol*; 93 (2):90-3

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

Gnecchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J*; 20 (6):661-9

Gnecchi M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*; 103 (11):1204-19

Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, Ravassa S, Lopez B, Lopez N and Diez J (2003) Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*; 59 (3):549-62

Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*; 260 (6):3440-50

Haggstrom J, Kwart C and Pedersen H (2005) Acquired valvular heart disease. *In Ettinger SJ, Feldman EC (Eds) "Textbook of veterinary internal medicine": diseases of the dog and cat. (6. Auflage)*

Hayakawa T, Yamashita K, Tanzawa K, Uchijima E and Iwata K (1992) Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum. *FEBS Lett*; 298 (1):29-32

Himes BT, Neuhuber B, Coleman C, Kushner R, Swanger SA, Kopen GC, Wagner J, Shumsky JS and Fischer I (2006) Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair*; 20 (2):278-96

Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH and Drexler H (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*; 111 (17):2198-202

Kao YH, Chen YC, Cheng CC, Lee TI, Chen YJ and Chen SA (2010) Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. *Crit Care Med*; 38 (1):217-22

Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26 (4):239-57

Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S and Epstein SE (2004) Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*; 94 (5):678-85

Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N and Kobayashi Y (2003) Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol*; 171 (9):4672-9

Kurtz TW and Morris RC, Jr. (1987) Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*; 10 (1):127-31

Kyhse-Andersen J (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*; 10 (3-4):203-9

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 and Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*; 433 (7026):647-53

Lee SJ, Yoo HJ, Bae YS, Kim HJ and Lee ST (2003) TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem Biophys Res Commun*; 312 (4):1196-201

Levitsky D, de la Bastie D, Schwartz K and Lompre AM (1991) Ca²⁺-ATPase and function of sarcoplasmic reticulum during cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*; 261 (4 Suppl):23-6

Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, Nam KI, Cho JG, Kang PM and Park JC (2006) The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res*; 70 (3):530-42

Losordo DW and Dimmeler S (2004) Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease: part II: cell-based therapies. *Circulation*; 109 (22):2692-7

Lyngbaek S, Schneider M, Hansen JL and Sheikh SP (2007) Cardiac regeneration by resident stem and progenitor cells in the adult heart. *Basic Res Cardiol*; 102 (2):101-14

Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS and Dzau VJ (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*; 9 (9):1195-201

Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, Sano M, Toko H, Akazawa H, Sato T, Nakaya H, Kasanuki H and Komuro I (2004) Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*; 279 (12):11384-91

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, Allen PD, Komajda M and Schwartz K (1990) Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest*; 85 (1):305-9

Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G and Giacomello A (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*; 95 (9):911-21

Mishra PK (2008) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*; 9 (2):122-8

Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE and Ikeda U (2006) Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res*; 99 (8):891-9

Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, Spijker R, van den Brink S, Hassink R, van der Heyden M, Opthof T, Pera M, de la Riviere AB, Passier R and Tertoolen L (2003) Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*; 107 (21):2733-40

Mummery C, Ward D, van den Brink CE, Bird SD, Doevendans PA, Opthof T, Brutel de la Riviere A, Tertoolen L, van der Heyden M and Pera M (2002) Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J Anat*; 200 (Pt 3):233-42

Mummery CL (2005) Cardiology: solace for the broken-hearted? *Nature*; 433 (7026):585-7

Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C and Iredale JP (2002) Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem*; 277 (13):11069-76

Naito Y, Tsujino T, Fujioka Y, Ohyanagi M and Iwasaki T (2002) Augmented diurnal variations of the cardiac renin-angiotensin system in hypertensive rats. *Hypertension*; 40 (6):827-33

Niebauer J, Pflaum CD, Clark AL, Strasburger CJ, Hooper J, Poole-Wilson PA, Coats AJ and Anker SD (1998) Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation. *J Am Coll Cardiol*; 32 (2):393-7

Okamoto K (1969) Spontaneous hypertension in rats. *Int Rev Exp Pathol*; 7 227-270

Oltvai ZN, Milliman CL and Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*; 74 (4):609-19

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A and Anversa P (2001) Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 938 221-9; discussion 229-30

Oyama MA, Merola V and Eurell TE (2005) Cardiac cellular transplantation: transarterial myoblast transplantation in dogs. *Intern J Appl Res Vet Med*; (3):102-115

Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S and Komuro I (2007) Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol*; 176 (3):329-41

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*; 29 (9):e45

Piper HM, Probst I, Schwartz P, Hutter FJ and Spieckermann PG (1982) Culturing of calcium stable adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*; 14 (7):397-412

Pschyrembel (2002) Klinisches Wörterbuch - 259. Auflage. Walter de Gruyter, Berlin, New York

Riede UN, Schaefer HE and Werner M (1993) Arterielle Hypertonie. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme Verlag Stuttgart, 3.Auflage*; S.396

Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H and Alt E (2007) The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*; 363 (3):674-9

Sampaolesi M, Blot S, D'Antona G, Granger N, Tonlorenzi R, Innocenzi A, Mognol P, Thibaud JL, Galvez BG, Barthelemy I, Perani L, Mantero S, Guttinger M, Pansarasa O, Rinaldi C, Cusella De Angelis MG, Torrente Y, Bordignon C, Bottinelli R and Cossu G (2006) Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*; 444 (7119):574-9

Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S and 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

Schächinger V, Dimmeler S and Zeiher AM (2006) Stem cells after myocardial infarction. *Herz*; 31 (2):127-36; quiz 142-3

Schild D (1996) Laser scanning microscopy and calcium imaging. *Cell Calcium*; 19 (4):281-96

Schlüter KD and Schreiber D (2005) Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol*; 290 305-14

Schmidt D and Hoerstrup SP (2006) Tissue engineered heart valves based on human cells. *Swiss Med Wkly*; 136 (39-40):618-23

Shan K, Kurrelmeyer K, Seta Y, Wang F, Dibbs Z, Deswal A, Lee-Jackson D and Mann DL (1997) The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Curr Opin Cardiol*; 12 (3):218-23

Smith RK (2008) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil*; 30 (20-22):1752-8

Statistisches-Bundesamt (2008) Deutschland. *Todesursachen*;
<http://www.destatis.de>

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G and Wernet P (2002) Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*; 106 (15):1913-8

Suter PF and Kohn B (2006) Erkrankungen der peripheren Blut- und Lymphgefäße. *Praktikum der Hundeklinik (10. Auflage)*

Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, Matsuzaki M and Hamano K (2006) Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 291 (2):H886-93

Tobias R, Skrodzki M and Schneider M (2008) Kleintierkardiologie kompakt. *Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG*; XIII

Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB and Mann DL (1996) Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation*; 93 (4):704-11

Trippodo NC and Frohlich ED (1981) Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*; 48 (3):309-19

Tsutamoto T, Hisanaga T, Wada A, Maeda K, Ohnishi M, Fukai D, Mabuchi N, Sawaki M and Kinoshita M (1998) Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*; 31 (2):391-8

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

van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, Crijns HJ, Doevendans PA and De Windt LJ (2005) Myocyte apoptosis in heart failure. *Cardiovasc Res*; 67 (1):21-9

von Engelhardt W and Breves G (2000) Physiologie der Haustiere. *Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart*; 172-174

Weil J and Schunkert H (2006) Pathophysiology of chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*; 95 Suppl 4 1-15; quiz 16-7

Wexler BC, McMurtry JP and Iams SG (1981) Histopathologic changes in aging male vs female spontaneously hypertensive rats. *J Gerontol*; 36 (5):514-9

WHO (2003) 2003 World Health Organisation (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* 21; 1983-1992

Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z and Ashraf M (2007) In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol*; 42 (2):441-8

Yamori Y (1984) Animal models for hypertension. *Nippon Rinsho*; 42 (2):258-70

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB and Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; 80 (2):285-91

Yeh YH, Wakili R, Qi XY, Chartier D, Boknik P, Kaab S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D and Nattel S (2008) Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*; 1 (2):93-102

Yen TT, Yu PL, Roeder H and Willard PW (1974) A genetic study of hypertension in Okamoto-Aoki spontaneously hypertensive rats. *Heredity*; 33 (3):309-16

Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM, Younce C, Binkley PF and Kolattukudy PE (2006) Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res*; 98 (9):1177-85

10 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen im Juli 2010,

Nina-Kristin Krehbiehl

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas, die stets hilfreichen Anregungen und geduldigen Erläuterungen bei der Ausarbeitung und Versuchsplanung, sowie die finanzielle Unterstützung zur Erstellung meiner Promotionsarbeit. In gleicher Form möchte ich mich herzlich bei Sibylle Wenzel bedanken, die mir als Mentorin und Supervisor im Bereich Progenitorzellen im Allgemeinen sowie bei der Betreuung und Ausarbeitung meiner Doktorarbeit und allen Laborversuchen immer mit Wissen, Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso danke ich Hagen Maxeiner, welcher mir durch eine Kooperation mit der Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie und der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikums Gießen sowohl intensive Forschung auf dem humanen Stammzellsektor, als auch finanzielle Unterstützung ermöglichte. Das gleiche gilt für Sibylle Wenzel, die sich in diesem Projekt stark engagiert und mir somit den Weg für weiterführende Forschungen geebnet hat. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Prof. Dr. M. A. Weigand, dem Leiter der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie in Gießen bedanken, welcher mir weitreichende Forschungen durch Erhalt der humanen Proben und finanzielle Unterstützung gewährleistet hat.

Herrn Prof. J. Roth danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und die schnelle Korrektur. Ich bedanke mich herzlichst bei allen Mitarbeitern und Freunden am physiologischen Institut Gießen, insbesondere bei Nadine Woitasky, Daniela Schreiber und Rolf Schreckenber für ihre hilfsbereite Betreuung durch stets geduldige und freundschaftliche Unterstützung in allen labortechnischen Fragen. Des Weiteren danke ich Peter Volk für die Durchführung und methodische Erläuterung der Kardiomyozyten-Präparation und der Langendorff-Perfusion. Für die zusätzliche Korrektur meiner Dissertation bedanke ich mich ganz herzlich bei Nadine Woitasky, Daniela Schreiber, Hagen Maxeiner und meinem Freund Oliver Nohe.

Meiner Freundin Anna Schilp und meiner Schwägerin Mirijam Krehbiehl danke ich für ihre Unterstützung durch motivierenden Zuspruch und ihr EDV-technisches Wissen. Zu guter Letzt möchte ich meinen lieben Eltern und Großeltern von ganzem Herzen für ihre mannigfaltige Unterstützung und ihren Rückhalt in allen Lebenslagen danken.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599898 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5636-0



9 783835 195636 0