

Untersuchungen zur Charakterisierung
humaner Mesoangioblasten
von Kindern und Erwachsenen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Janina Trauth
aus Speyer

Gießen 2013

Aus dem Kinderherzzentrum
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. D. Schranz

1. Gutachter: Prof. Dr. K.D. Schlüter
2. Gutachter: Prof. Dr. D. Schranz

Tag der Disputation: 08.10.2013

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Stammzellen	1
1.1.1	Embryonale Stammzellen	1
1.1.2	Adulte Stamm- und Progenitorzellen	3
1.1.3	Mesoangioblasten	5
1.2	Zellalterung und -regeneration	6
1.2.1	DNA-Schädigung	6
1.2.2	Dysregulation zellulärer Stoffwechselprozesse	9
1.2.3	Dysregulation der Stammzellnische	13
1.3	Fragestellung	15
2	Patienten, Material und Methoden	16
2.1	Patienten	16
2.1.1	Pädiatrisch-kardiologische Patienten	16
2.1.2	Internistisch-kardiochirurgische Patienten	19
2.1.3	Pädiatrische HTx- und KMTx-Patienten	20
2.1.4	Ethikkommission	20
2.2	Material	21
2.2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	21
2.2.2	Zellkulturmedium	21
2.2.3	Cytokine	22
2.2.4	Immunhistochemische Materialien	22
2.2.5	Kits	22

INHALTSVERZEICHNIS

2.3	Methoden	23
2.3.1	Isolation und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen . . .	23
2.3.2	Isolation und Kultivierung zirkulierender Mesoangioblasten . .	24
2.3.3	Ermittlung von Population doubling und Population doubling time	24
2.3.4	Migrationsassay (Boyden-Kammer)	25
2.3.5	Survivalassay	27
2.3.6	Proliferationsassay (BrdU-Uptake Assay)	27
2.3.7	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	28
2.3.8	Cytokine Array	30
2.3.9	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	31
2.3.10	Statistische Auswertung	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Zahl und proliferative Kapazität zirkulierender Mesoangioblasten sin- ken mit zunehmendem Donoralter	34
3.1.1	Altersabhängige Zahl zirkulierender MAB	34
3.1.2	Altersabhängige proliferative Kapazität	37
3.1.3	Patientencharakteristika beeinflussen proliferative Kapazität .	38
3.2	Mobilisation von Mesoangioblasten durch kardiopulmonalen Bypass .	40
3.2.1	Plasmatischer HGF-Anstieg nach kardiopulmonalem Bypass .	40
3.2.2	Kardiopulmonaler Bypass und HGF induzieren Migration von MAB in vitro	41
3.2.3	Verminderte migratorische Aktivität bei aMAB	42
3.3	Mikromilieu beeinflusst Zellüberleben von Mesoangioblasten	43
3.3.1	Höheres Überleben und Proliferation von MAB in kindlichem Plasma	43
3.4	Mesoangioblastennische außerhalb von Knochenmark und Herz	46
3.4.1	Charakterisierung des Herkunftsgewebes der MAB mittels FISH	46
3.5	Endotheliale Progenitorzellen in verändertem Mikromilieu	47

INHALTSVERZEICHNIS

3.5.1	Plasmatischer SDF-1 α -Anstieg nach kardiopulmonalem Bypass bei Kindern	47
3.5.2	Verminderte EPC-Migrationsrate in adultem Plasma und nach kardiopulmonalen Bypass	48
3.5.3	Vermindertes EPC-Überleben nach kardiopulmonalen Bypass	49
4	Diskussion	51
4.1	Stammzellnische humaner Mesoangioblasten	52
4.2	Mobilisation humaner Mesoangioblasten	53
4.3	Abhängigkeit der Proliferation von Mesoangioblasten von Donoralter und -komorbidität	55
4.4	Bedeutung des Mikromilieus für Mesoangioblasten	58
4.5	Bedeutung des Mikromilieus für Endotheliale Progenitorzellen	59
5	Zusammenfassung	61
	Appendices	65
	Abkürzungsverzeichnis	65
	Abbildungsverzeichnis	67
	Literaturverzeichnis	71
	Publikationsliste	86
	Eidesstattliche Erklärung	87

Kapitel 1

Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen zählen trotz verbesserter medikamentöser und invasiver Therapieansätze seit Jahrzehnten zu den Volkskrankheiten und häufigsten Todesursachen in westlichen Industrienationen. Die immer älter werdende Gesellschaft hofft nun auf die Entwicklung neuer Therapieformen zur Reduzierung von Morbidität und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen. Fortschritte in der Stammzelltechnologie bergen hierfür ein beispielloses Potential. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von Stammzellen aus dem Knochenmark oder Gewebe die Bildung neuer Gefäße und eine Verbesserung der Herzfunktion bewirkt. Allerdings sind die molekularen Mechanismen von zellulärer Pluripotenz und Differenzierung sowie die Wirkung der Stammzelltherapie noch kaum verstanden. Untersuchungen zu deren besseren Verständnis stellen einen wichtigen Schritt zur sicheren und effizienten klinischen Nutzung von Stammzellen dar.

1.1 Stammzellen

1.1.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC), die aus dem Embryoblast von Blastozysten gewonnen werden [1], besitzen einzigartige Eigenschaften. In vivo gehen Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) sowie Keimbahnzellen aus ihnen hervor. Diese Eigenschaft wird als Pluripotenz bezeichnet. Bekannte

pluripotenz-kodierende Gene sind unter anderem der „Octamer transcription factor 3/4“ (Oct3/4), das „SRY-box containing gene 2“ (Sox2) und der Homeobox-Transkriptionsfaktor Nanog. Mit dem Stammzellpotential ist zudem Telomeraseaktivität und Expression spezifischer Oberflächenmarker assoziiert. Im sich entwickelnden Embryo sind ESC nur kurze Zeit pluripotent. Werden sie jedoch in vitro auf „Feeder“- oder Ammenzellen (murine embryonale Fibroblasten, MEF) [2] unter Zugabe von LIF (Leukemia Inhibitory Factor) [3] kultiviert, behalten sie ihren undifferenzierten Status, unendliche Teilungsfähigkeit und die Fähigkeit der Selbsterneuerung. Werden embryonale Stammzellen in suspendierter Form kultiviert, formen sie spontan Zellaggregate, sogenannte embryoid bodies, die Zellen aller Keimblätter enthalten. Embryoid bodies bestehen aus unstrukturiertem Gewebe mit spontan schlagenden Kardiomyozyten, Skelettmuskelzellen, Neuronen und Blutinseln. Durch symmetrische Teilung von ESC werden zwei Tochterzellen generiert, welche die gleichen Eigenschaften haben wie die Zelle aus der sie hervorgegangen sind. Durch asymmetrische Teilung entsteht eine Zelle, die der Mutterzelle gleicht und eine weitere, linien-determinierte Progenitorzelle. Diese Progenitorzellen differenzieren während der Organogenese eines Embryos schließlich in terminale, reife Zellen. Im adulten Organismus persistierende Progenitorzellen tragen zur Blut- und Organerneuerung bei. In Kultur kann die gerichtete Differenzierung von ESC durch Zugabe von spezifischen Zytokinen erzeugt werden, so bewirkt zum Beispiel Retinsäure die Differenzierung in Kardiomyozyten [4]. Die Therapie mit ESC befindet sich noch im experimentellen Stadium und wird unter anderem durch Formation von Neoplasien nach Stammzellapplikation limitiert. Mit der Absicht, die ethisch strittige Gewinnung (humaner) embryonaler Stammzellen aus Blastocysten zu umgehen und dennoch Zellen mit ähnlich potenten Eigenschaften wie ESC zu erhalten, wurden adulte, ausdifferenzierte Körperzellen in vitro in einen embryonalen Status „umprogrammiert“. Indem murine [5] und humane [6] Fibroblasten mit viralen Vektoren für vier ausgesuchte Transkriptionsfaktoren (Oct-3/4, Sox2, C-Myc und Klf4) transfigiert wurden, gelang die Herstellung von sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS). Pluripotenz wurde im Weiteren auch mittels anderer Gene (Klf2, Lin28) und anderer Methoden (Retroviren, Adenoviren, Transposons [7]) induziert,

zuletzt sogar ohne die Verwendung von Genmaterial (protein induced pluripotent stem cells, piPSC) [8]. Debatten über den therapeutischen Nutzen von ESC und iPS werden leidenschaftlich geführt, aber der breite klinische Einsatz dieser Zellen liegt noch Jahre entfernt. Hingegen stellen adulte Stamm- und Progenitorzellen schon heute eine verfügbare Form der Zelltherapie zur myokardialen Regeneration dar.

1.1.2 Adulte Stamm- und Progenitorzellen

Dass es im adulten Organismus regenerative Gewebe gibt, ahnte man seit über 2000 Jahren -davon zeugen unter anderem die Prometheus-Sage und das Wissen antiker Ärzte über die Erneuerung des Blutes. Doch erst vor 50 Jahren konnten im Knochenmark erstmals adulte Stammzellen nachgewiesen werden [9]. Im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen haben adulte Progenitorzellen ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung bereits verloren, leisten jedoch einen Beitrag zur lokalen Gewebekomöostase. Anschauliche Beispiele von Geweben mit hohem Zellverschleiß und -umsatz sind Blut, Dünndarmepithel und Haut. Die Vielzahl der mittlerweile beschriebenen adulten Stammzellen wird eingeteilt in hämatopoetische Stammzellen (HSC), mesenchymale Stammzellen (MSC), sogenannte „side population“ (SP)-Zellen sowie gewebeständige Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen sind wohl die am besten charakterisierten adulten Stammzellen und stellen in der Hämatologie und Onkologie einen fest etablierten Bestandteil moderner Therapie dar. HSC zeichnen sich abhängig von ihrer Reife und Zellreihe durch Expression bestimmter Oberflächenmarker aus. $CD34^+$, $CD38^-$, $CD133^+$ und Lin^- sind charakteristisch für unreife Zellen, $CD38^+$, $CD45^+$ und Lin^+ für reife HSC, B-Zellen tragen $CD19$. Interessante Abkömmlinge der HSC sind die von Asahara et al. zuerst beschriebenen endothelialen Progenitorzellen (EPC) [10]. Diese aus dem Knochenmark stammenden, VEGFR2 (KDR)-tragenden zirkulierenden Progenitorzellen können in reife Endothelzellen ausdifferenzieren und zur postnatalen Angiogenese und Vaskulogenese beitragen. Adulte Mesenchymale Stammzellen (MSC) tragen zur Aufrechterhaltung und Regeneration des Stütz- und Bindegewebes, wie Knochen, Knorpel, Muskel, Bändern, Sehnen und Fettgewebe bei. Für mesenchymale Stammzellen sind Kombinationen

mit CD73, CD 90, CD106 (VCAM-1) oder CD29 (β 1-Integrin) sowie negative hämatopoetische Marker charakteristisch. Gewebeständige Stammzellen tragen durch ihr regeneratives Potential zur physiologischen Gewebeerneuerung des Organs, in dem sie residieren, bei. Nach der Entdeckung kardialer Stammzellen durch Beltrami et al. [11] musste das Bild des Herzens als postmitotisches Organ, welches nur durch Hypertrophie anpassungsfähig und dessen einziger Reperaturmechanismus fibrotischer Umbau ist, revidiert werden. Das endogene regenerative Potential kardialer Stammzellen ist allerdings zu niedrig um ausgedehnte Gewebenekrosen, wie sie bei Myokardinfarkt auftreten, funktionserhaltend zu reparieren [12]. Die Therapie der myokardialen Ischämie und Kardiomyopathien durch adulte Stammzellen befindet sich im Stadium experimenteller klinischer Anwendung. Studien über die Verwendung stammzellmobilisierender Faktoren (FIRSTLINE-AMI (Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony Stimulating Factor) [13]), Fallberichte von autologer Stammzelltransplantation bei DCM [14] und insbesondere große Vorreiterstudien wie die TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) [15], BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) [16] und BALANCE (Clinical Benefit and Long-Term Outcome After Intracoronary Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Patients With Acute Myocardial Infarction) [17] zeigen nach Intervention kardiale Funktionsverbesserung und erniedrigte Mortalität ohne erhöhte Komplikationsrate. Wahrscheinlich tragen transplantierte Stammzellen durch Inkorporation in Gefäßwände [18], parakrine Stimulation und Mobilisation weiterer Progenitorzellen [19] zur Neovaskularisierung und Erhaltung der Herzfunktion bei. Neue Beobachtungen fordern das bisherige Konzept der linien-beschränkten Differenzierung von Progenitorzellen heraus: Neben gewebeständigen kardialen Stammzellen wurde Differenzierung in Kardiomyozyten auch bei anderen Zelltypen nachgewiesen, unter anderem bei endothelialen Progenitorzellen [20]. Auch wenn dies ein seltenes Phänomen ist, scheinen Progenitorzellen Potential zur direkten Transdifferenzierung zu haben [21]. Möglicherweise sind dabei ontogenetische Verwandtschaft und Mikroumgebung wichtige Faktoren. Der Fund der linienüberschreitenden Plastizität könnte

darauf hinweisen, dass die Stammzellpools des Knochenmarks und der einzelnen Organe miteinander in Austausch stehen. Der Erfolg der Stammzelltherapie ist noch durch zahlreiche Faktoren limitiert, sodass die Regeneration ausgedehnter Gewebeschäden wie transmuraler Ischämien längst noch nicht möglich ist.

1.1.3 Mesoangioblasten

In den letzten Jahren wurden verschiedene mesodermale Stammzellen entdeckt und mehr oder weniger ausführlich charakterisiert, unter ihnen multipotente adulte Progenitorzellen (MAPC), muscle derived stem cells (MDSC), side population cells, Ac133⁺-Zellen, Progenitorzellen aus Muskelendothel, Synovia, Dermis und Fettgewebe [22]. Minasi et. al identifizierten 2002 die sogenannten Mesoangioblasten [23]. Murine Mesoangioblasten exprimieren sowohl frühe hämatopoetische Oberflächenantigene (Sca-1, CD34) als auch Rezeptoren und Signalmoleküle der mesodermalen Induktion (BMP, Wnt, Notch) sowie endotheliale Marker (VEGFR/KDR/Flk1), was zu ihrer Namensgebung führte. Späte endotheliale Marker wie den von-Willebrand-Faktor (vWF) tragen sie nicht [24]. Sie sind in der Lage, in nahezu alle mesodermalen Gewebe -Blut, Knorpel, Knochen, glatter Muskel, Skelettmuskel und Herzmuskel- zu differenzieren. Durch ihre Telomerase-Aktivität sind sie klonal bis zu 50 Passagen expandierbar. Aus ihren Versuchen schließen Minasi et al., dass Mesoangioblasten

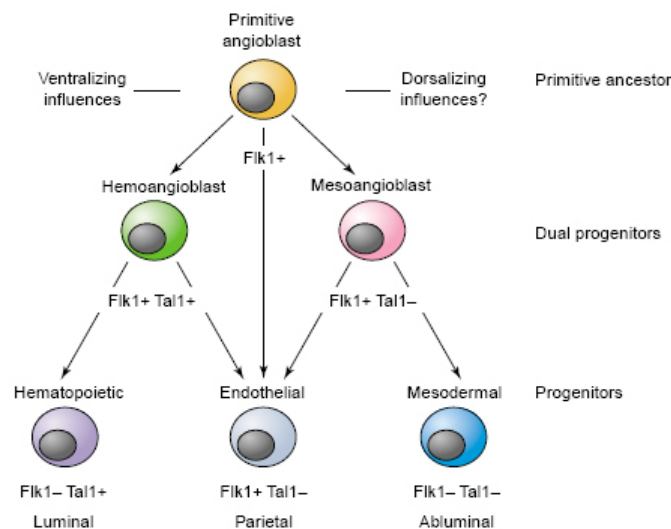


Abbildung 1.1: Abstammung von Mesoangioblasten. (Abbildung Cossu et al. 2003 [24])

(MAB) von primitiven Angioblasten der embryonalen dorsalen Aorta abstammen (Abb. 1.1). Während der embryonalen Histogenese sprossen Gefäße in neu entstehendes Gewebe ein und mit ihnen gefäß-assoziierte Progenitorzellen (Mesoangioblasten). Diese Progenitorzellen verbleiben in abluminaler Position und nehmen Eigenschaften des sie umgebenden Gewebes an. Mesoangioblasten können in Gefäßwänden von Skelettmuskel von Erwachsenen gefunden werden [22]. In vivo können sie Muskelgewebe reparieren und bei Muskeldystrophie die motorischen Fähigkeiten verbessern [25]. Koyanagi et al. isolierten zirkulierende Mesoangioblasten-ähnliche Zellen mit vergleichbarem o.g. Markerprofil aus peripherem Blut von Kindern nach Operation mit Herz-Lungen-Maschine. Diese Zellen unterscheiden sich aufgrund ihres Markerprofils (CD73+, KDR+, CD45-) von bisher isolierten endothelialen, hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen, das Markerprofil ist aber überlappend mit dem aus der embryonalen Aorta isolierten Mesoangioblasten. Humane zirkulierende Mesoangioblasten exprimieren die Stammzellmarker Oct3/4, Klf4, c-Myc und Telomerase und können in vitro und in vivo in Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten differenzieren [26]. Ihr hohes Potential für Proliferation und Differenzierung macht Mesoangioblasten zu einem interessanten Zelltyp für die Forschung zur autologen Stammzelltherapie von kardiovaskulären Erkrankungen. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zellen weiter charakterisiert.

1.2 Zellalterung und -regeneration

1.2.1 DNA-Schädigung

Im Alter steigt die Inzidenz vieler Krankheiten exponentiell an: kardiovaskuläre, neurodegenerative und Tumorerkrankungen haben ihren Gipfel jenseits von 65 Jahren [27]. Ältere Patienten haben signifikante Einschränkungen in Verfügbarkeit und Funktion von Stamm- und Progenitorzellen [28–30]. Die verminderte regenerative Kapazität von alternden Geweben wurde ausführlich beschrieben [31] und ihre Gründe in zahlreichen Arbeiten teilweise geklärt: Vielen dieser Erkrankungen liegen erworbene DNA-Schädigungen, chronische Inflammation oder autoimmunologische

Geschehen zu Grunde. Bei kardiovaskulären Erkrankungen spielen daneben insbesondere Endothelprozesse und Vaskularisierung eine entscheidende Rolle. Durch verminderte Endothelzellproliferation und -migration, gestörte extrazelluläre Matrix, rückläufige lokale und systemische Wachstumsfaktoren und verminderte inflammatorische Antwort ist die Angiogenese im Alter beeinträchtigt [30].

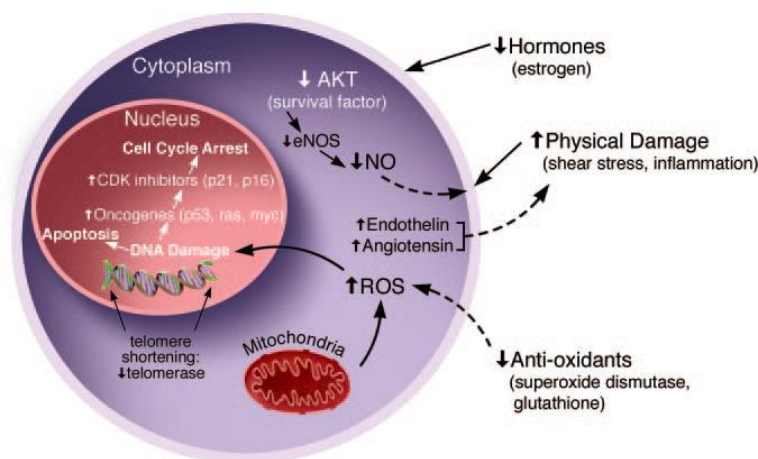


Abbildung 1.2: Einflüsse auf Zellseneszenz. (Abbildung Ballard et al. [32])

Stammzellen tragen im ausgewachsenen Organismus mit ihrem hohen Wachstums- und Differenzierungspotential zur Gewebemöostase und -regeneration bei, dennoch können sie durch DNA-Schädigung und -Erosion Teilungsstillstand oder Apoptose erleiden. Im Rahmen einer physiologischen Zellteilung verbraucht die DNA-Polymerase bei der Genomverdopplung ein freies 3'-Hydroxylende der Chromosomen. Die aus replikativen TTAGGG-Sequenzen bestehenden Chromosomenenden (Telomere) werden deshalb bei jeder Teilung um einige Basenpaare kürzer. Embryonale Stammzellen schützen ihre Telomere vor dieser Erosion, indem sie mittels des Enzyms Telomerase Telomere de-novo synthetisieren und Telomere durch Rekombination verlängern (alternative lengthening of telomeres). Adulte Stammzellen verlieren langsam diese Enzymaktivität. Unterschreitet die Telomerlänge eine kritische Länge, so führt dies zu replikativer Seneszenz: genomische Instabilität und DNA-Schäden aktivieren die Tumorsuppressor-Proteine p53 oder p16^{Ink4a} [33], was zum permanenten Stillstand des Zellzyklus oder zur Elimination der Zelle führt. Telomerlänge spiegelt somit die replikative Kapazität von Zellen dar. Überexpres-

sion von Telomerase kann replikative Seneszenz aufhalten [34], während Abwesenheit oder Dysfunktion strukturerhaltender Proteine der Telomere (TRF2) vorzeitige Seneszenz und Apoptose einleitet [35, 36]. Mutationen in Proteinen der Telomer-Regulation spielen bei vielen pathologischen Prozessen eine Rolle. Überexpression von Telomerase und Telomer-bindender Proteine durch epigenetische Modifikation findet sich häufig in Tumorzellen, was deren erworbene unbeschränkte Replikationsfähigkeit bedingt und ein Baustein der Tumorigenität einer dysregulierten Zelle ist [37]. Tumorzellen waren durch ihre unbeschränkte Replikationsfähigkeit die ersten humanen Zellen, die unter Kulturbedingungen im Labor unbegrenzt gezüchtet werden konnten (George und Martha Gey, 1951, HeLa-Zellen). Telomerinstabilität, kurze Telomere und Mutationen in Telomerasekomponenten resultieren in vorzeitiger Zellalterung [36]. So scheint bei chronischen Krankheiten die Telomerlänge relevant zu sein: Bei koronarer Herzkrankheit und chronischer Herzinsuffizienz nimmt die Telomerlänge mononukleärer Zellen im Blut und Knochenmark abhängig von der Krankheitsausprägung ab und geht zudem mit verminderter Migrationsfähigkeit der MNC einher [38, 39].

In den 50er Jahren artikulierte Denham Harman die Theorie der freien Radikale zur Erklärung von Alter und Lebenserwartung [40]. Hierbei nahm er an, daß freie Sauerstoffradikale im Laufe der Zeit kumulativen DNA-Schaden verursachen und zu Seneszenz und Zelltod führen. Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen sowohl endogen an Mitochondrien, Peroxisomen, Lipoxygenasen, NADPH-Oxidase und Cytochrom P450 als auch durch exogene Faktoren wie UV-Licht, ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika, Entzündungs-Zytokine und Umweltgifte. Zytoplasmatische Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase und nicht-enzymatische Antioxidanten (Glutathion, Vitamine A,C,E) reduzieren organische Peroxide, Wasserstoffperoxid und andere ROS durch Übertragung eines ihrer freien Elektronen und machen sie dadurch unschädlich. Die Balance zwischen ROS-Produktion und ROS-Abwehr bestimmt den Grad des zellulären oxidativen Stress. Stammzellen erleiden weniger oxidativen Stress als reife Zellen, da sie mit einem besseren enzymatischen Abwehrsystem ausgestattet sind [41–43]. Mitochondriale und nukleäre DNA kann auf

verschiedene Weisen von ROS attackiert werden. Einige ROS reagieren dabei nicht direkt mit der DNA, sondern lösen Metallionen (Eisen oder Kupfer) aus den reaktiven Zentren von Enzymen, die dann ihrerseits an die DNA binden oder DNA-Phosphorylierung behindern. Direkte Schäden beinhalten Modifizierungen der vier Basen mit Änderung der Wasserstoffbrücken-Bindungen. Durch die darauffolgende Konformationsänderung entstehen Mutationen: Verlust einzelner Basen, Austausch von Basen und Strangbrüche. Auf Grund der räumlichen Nähe mitochondrialer DNA zum Hauptentstehungsort von ROS und wenig ausgeprägten DNA-Reperaturmechanismen mitochondrialer DNA ist diese anfällig für oxidative Schäden, die zur Dysfunktion der Mitochondrien führen. Die Atmungskette dysfunktionaler Mitochondrien arbeitet weniger effektiv und produziert mehr ROS als in intakten Mitochondrien, was einen Teufelskreis von weiteren DNA-Schäden und mehr ROS-Entstehung in Gang setzt. Die Integrität der DNA ist grundlegend für Funktion und Überleben von Organismen. Sie wird durch zelluläre Kontrollsysteme überwacht und nach Möglichkeit durch Reparaturproteine wiederhergestellt. Bei irreparablen Schäden wird der kontrollierte Zelltod (Apoptose) ausgelöst. Diese Reparatur- und Apoptosesignalwege werden unter dem Begriff DNA Damage Response zusammengefasst. Die meisten Erkenntnisse zu DNA Damage Response und Onkogene wie p53, ras und myc kommen aus der Tumorforschung. Kommt es zu einer Dysregulation der Damage Response, tritt die Zelle nicht kontrolliert in die Apoptose ein, sondern entartet und proliferiert weiter. In der Zellforschung macht man sich dieses Wissen zu Nutze: die Immortalisierung von Zelllinien wird neben Expression der Pluripotenzgene Oct3/4 und c-Myc auch durch Knockdown der CDK-Inhibitoren p21 und p16 künstlich erzeugt [37, 44].

1.2.2 Dysregulation zellulärer Stoffwechselprozesse

Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien und anderen Organellen ist abhängig von der ATP-Produktion und dem Stoffwechselumsatz einer Zelle [45]. Studien zeigten den direkten Zusammenhang zwischen mitochondrialem Stoffwechsel, ROS-Produktion und Lebenserwartung. Die Stoffwechselaktivität von

Mitochondrien wird durch eine Vielzahl von Kinasen reguliert, unter ihnen mTOR (mitochondrial Target of Rapamycin). Abhängig von der Verfügbarkeit von Nährstoffen findet die zelluläre Energiegewinnung durch mitochondriale Aktivität, bei der ROS entstehen, oder durch nicht-mitochondriale Pfade statt. Durch verminderten Sauerstoffverbrauch bei alternativer Energieproduktion wird wahrscheinlich der oxidative Stress der Zelle vermindert. mTOR ist ein zentraler Modulator des Regelkreises von Nährstoffangebot, mitochondrialer und alternativer Energieproduktion. Der lebensverlängernde Effekt von Kalorienrestriktion wird unter anderem auf verminderten oxidativen Stress durch mTOR-vermittelte Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels und Förderung alternativer Energiegewinnung zurückgeführt. Fadenwürmer der Art *Caenorhabditis elegans*, die wegen Mutationen von Proteinen der Atmungskette auf alternative Energieproduktion angewiesen sind, haben eine längere Lebenszeit als ihre Artverwandten mit intakten Mitochondrien [46]. Der deutsche Arzt Otto Warburg beschrieb bereits 1942, dass eine Dysfunktion der Mitochondrien ausschlaggebend sei für Tumorentstehung. Tumorzellen sind oft wegen mitochondrialer Mutationen und defekter Atmungskette auf Energiegewinnung aus der anaeroben Vergärung (Glykolyse) angewiesen [47], jedoch ist noch nicht geklärt, ob dies Ursache oder Folge der Tumorentstehung ist. Unabhängig von ihrem Entstehungsort haben intrazelluläre Oxidantien zwei Effekte: einerseits ungerichteter Schaden an Zellkomponenten, andererseits Aktivierung spezifischer Pfade. Beide Effekte spielen eine Schlüsselrolle bei Alterungsprozessen, degenerativen und Tumorerkrankungen und hängen eng mit der Lebenserwartung zusammen [37]. Ungerichtete Schäden können alle Zellkomponenten betreffen: Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) oxidieren Proteine unter Abspaltung der NH_2 -Gruppe zu Carbonylderivaten [48], was zu Fehlfaltungen des Proteins und einer modifizierten Tertiärkonformation führt. Fehlfaltete Proteine verlieren ihre Fähigkeit, an Signaltransduktion teilzunehmen oder formen Aggregate, welche der Ausgangspunkt verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen sein können. Lipidoxidation scheint bei der Entstehung von kardiovaskulären und metabolischen Erkrankungen mitzuwirken. Oxidierte Lipide können durch Aktivierung unbekannter Signalwege die vermehrte Produktion von ROS fördern, was wiederum zu weiteren oxidativen Schäden führt [49]. Man nimmt an, dass

arteriosklerotische Plaques ausgelöst werden durch in die Gefäßwand eingelager-tes oxidiertes low-density lipoprotein (oxLDL) und oxidiertes Lysophosphatidylcho-
lin [50]. Durch Inhibition der eNOS-Aktivierung können sie endotheliales Signalling
stören. oxLDL initiiert außerdem eine inflammatorische Kaskade, die mit der Akti-
vierung von Makrophagen beginnt und in der Formation eines arteriosklerotischen
Plaques resultiert [27]. Trotz ihrer schädigenden Eigenschaft sind ROS auch wich-
tige Signalmoleküle. Eines der bestuntersuchten freien Radikale mit Signalfunktion
ist Stickstoffmonoxid (NO). Unter physiologischen Bedingungen übernimmt NO S-
Nitrosilierung an Proteinen. Diese posttranslationale Modifizierung schützt Prote-
ine vor Degradation durch andere freie Radikale. In Endothelzellen wird NO von
der endothelialen Stickstoff-Synthase (eNOS) produziert und bewirkt durch Erhö-
hung des cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) die Relaxation der glatten Ge-
fäßmuskulatur (Vasodilatation). Der Zusammenhang zwischen Scherkräften, eNOS-
Dysfunktion und Arteriosklerose ist in der Literatur oft beschrieben worden [51–53].
Sinkt durch altersbedingte Downregulation von eNOS die NO-Produktion, verlie-
ren insbesondere Kaspasen ihren Schutz durch Nitrosilierung und leiten bei oxi-
dativem Stress Apoptose ein. H_2O_2 kann durch die Verdrängung einer inhibieren-
den Untereinheit des nuclear faktor (NF)- κ B Transkription von stressinduzierten
Genen auslösen. Andere ROS entfalten ihre Wirkung durch Phosphorylierung von
Wachstumsfaktor-Rezeptoren, unter ihnen die extrazelluläre Signal-regulierte Kina-
se (ERK), c-Jun aminoterminal Kinase (JNK) und p38-mitogenaktivierte Prote-
inkinase (MAPK), der Phosphoinositid-3-Kinase (PI(3)K)/ Akt-Signalweg, das NF-
 κ B-Signalsystem, p53-Aktivierung und die Hitzeschock-Antwort (heat shock tran-
scription factor (HSF)1) (Abb. 1.3) [45]. Diese Pfadwege können auch durch an-
dere Signale gesteuert werden und spielen bei der Regulation von Zellwachstum
und -metabolismus eine Rolle. Verschiedene intrazelluläre Signalwege sind im Alter
fehlreguliert. In alten Individuen ist die basale Expressionsrate einiger Hitzeschock-
proteine höher als in jungen Individuen. Proteine der Hitzeschockfamilie sind an
Proteinfaltung, -transport und -degradation beteiligt. Bei akutem oxidativen Stress
steigen Hitzeschockproteine (HSP) in jungen, aber nicht in alten Mäusen an. Die
gesteigerte basale Expression wird deshalb als Anpassung an chronischen oxidativen

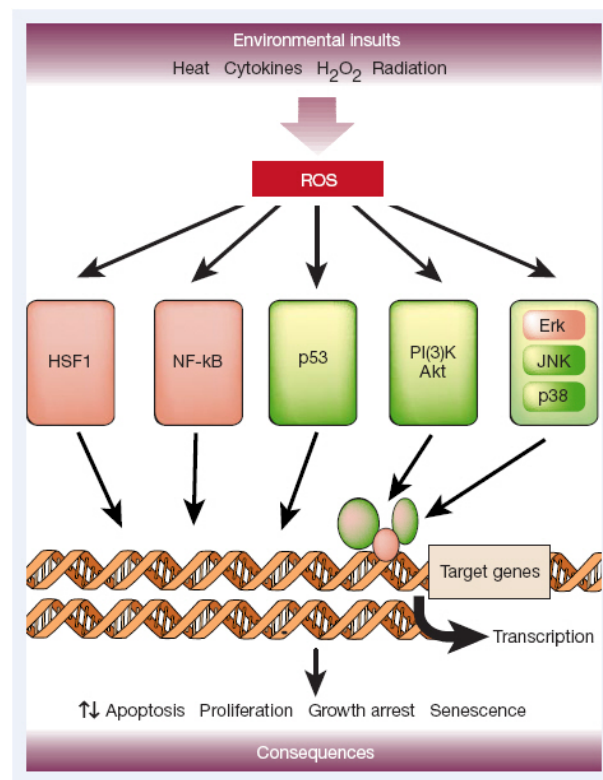


Abbildung 1.3: Durch oxidativen Stress aktivierte Signalkaskaden. (Abbildung Finkel et al. [45])

Stress und Ansammlung von beschädigten Proteinen gesehen. Das Ausbleiben der HSP-Expression bei akutem oxidativen Stress bedeutet eine Einbuße der zellulären Schutzreaktion auf akuten Stress im Alter [45]. Einige Studien legen nahe, dass altersbedingte Dysregulation diverser Signalwege durch externe Stimuli reversibel ist und der Funktionsverlust gealterter Stammzellen mittels Zytokingabe aufgewogen werden kann. In vitro wird die altersbeeinträchtigte Sprossung von Mikrogefäßen durch Applikation der Wachstumsfaktoren TGF- β 1, VEGF, IGF-1 und bFGF wiederhergestellt [54]. Systemische VEGF-Gabe erhöht Mobilisation, Migration und Inkorporation von EPC und stellt möglicherweise in Zukunft eine zellfreie Therapieoption für kardiale Regeneration dar [32].

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Alter, männliches Geschlecht, Hyperlipidämie, Hypertonie, Rauchen, Diabetes und positive Familienanamnese sind der Stammzellfunktion [55] und dem Erfolg einer Stammzelltherapie abträglich [56]. Diabetische Patienten haben weniger zirkulierende EPC und deren Fähigkeit zu Migrati-

on, Proliferation in Inkorporation in Gefäße ist deutlich vermindert. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme-A (HMG-CoA)-Reduktase-Hemmer (Statine) können die eingeschränkte EPC-Funktion bei Patienten mit Hypercholesterinämie verbessern [57], indem sie den Akt/PKB-Signalweg aktivieren [58]. Akt reguliert die Expression von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche dann zu diversen Zellaufgaben wie Überleben, Wachstum, Proliferation, Migration und Angiogenese beitragen [59]. Bei hypertensiven Patienten wurde eine Dysbalance des Vasokonstriktors Endothelin und des Vasodilatators eNOS beschrieben. Neben der oben beschriebenen vasodilatatorischen Funktion induziert eNOS durch NO-Produktion die Expression von SDF und VEGF, welche eine wichtige Rolle beim Homing von EPC in ihr Zielgewebe spielen. Sinkt die eNOS-Expression, kommt es vermehrt zu Endothelschäden und gleichzeitig zur Verschlechterung der endothelialen Reparaturmechanismen.

1.2.3 Dysregulation der Stammzellnische

Neben erlittenem oxidativen Stress und DNA-Schäden sind auch Dysregulation im Mikromilieu der Stammzellnische und des Zielgewebes von Progenitorzellen entscheidend für die ihre eingeschränkte Zahl und Funktion und weniger effektive Reparaturmechanismen bei fortschreitendem Alter [60]. Der Turnover der extrazellulären Matrix unterliegt in gealterten Gewebes einer Dysregulation. Zum einen verändert sich die Expression gewebedegradierender Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (tissue inhibitors of MMPs, TIMP), zum anderen auch die Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix selbst -z.B. Kollagen, Fibronectin und Tenascin-C [61]. Die veränderte extrazelluläre Matrix hat negative Auswirkungen auf EPC-Homing und folglich für Angiogenese und Remodeling [30]. Chang et al. stellten an einem Wundheilungsmodell dar, dass verminderte Neovaskularisierung bei alten Mäusen von Defekten der Hypoxieantwort des gealterten Gewebes und nicht von intrinsischen Defekten der EPC herrührt [62]. In ischämischem Gewebe wurde bei alten Mäusen HIF1 α , ein Transkriptionsfaktor von VEGF und SDF-1 α , vermehrt degradiert. Durch die niedrigen SDF- und VEGF-Konzentrationen im Zielgewebe wurden weniger EPC rekrutiert und dadurch die Neovaskularisierung ver-

mindert. Pharmakologische Stabilisierung von HIF1 α oder Administration von SDF und VEGF konnten die Neovaskularisierung wiederherstellen. Weiterhin demonstriert Edelberg et. al, dass infundierte junge EPC die Angiogenese im Herz alter Mäuse wiederherstellen können, indem sie parakrin den in gealterten Epithelzellen beeinträchtigten PDGF-B-Pfadweg wieder aktivieren [63]. Conboy et al. nutze ein Modell heterochromer Parabiose bei Mäusen. Bei heterochromer Parabiose entwickeln jeweils ein altes und ein junges Tier vaskuläre Anastomosen und teilen sich somit einen einzigen, gemeinsamen Blutkreislauf. Progenitorzellen im Skelettmus-

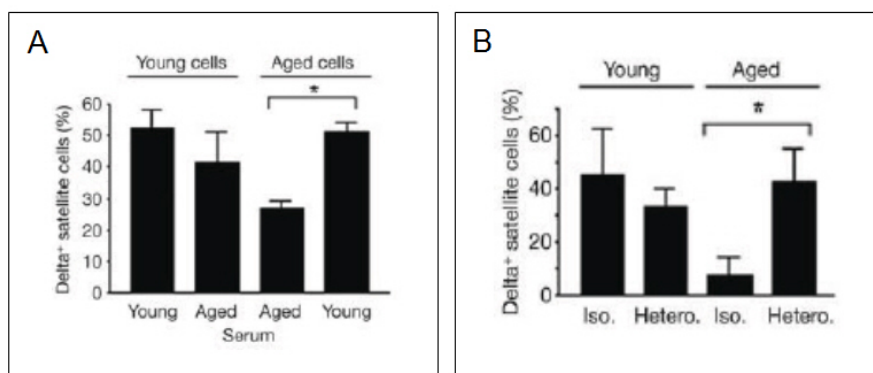


Abbildung 1.4: Einwirkung einer jungen systemischen Umgebung verjüngt alte Satellitenzellen. A: aktivierte murine Satellitenzellen nach 24-stündiger Kultur mit altem oder jungem Serum in vitro. B: Satellitenzellen nach fünftägiger heterochromer Parabiose. (Abbildung Conboy et al. [64])

kel alter Mäuse nahmen nach fünftägiger Parabiose wieder einen jungen Phänotyp an, nachdem Serumfaktoren des jungen Tieres zur Reaktivierung des Delta-Notch-Signalwegs geführt hatten [64]. Vor dem Hintergrund des bei Patienten mit chronisch kardiovaskulären Erkrankungen sicherlich relevant verbrauchten und erschöpften Pools von Stammzellen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass zur erfolgreichen Stammzelltherapie die intensive Auseinandersetzung nicht nur mit der Zellfunktion an sich, sondern insbesondere mit lokalen und systemischen Einflussfaktoren der Stammzellfunktion nötig ist.

1.3 Fragestellung

Studien zu Stammzellen in vitro und im Tiermodell repräsentieren Alter, Stoffwechselstörungen und Komorbiditäten oft nur ungenügend. Dennoch ist bekannt, dass nicht nur zellintrinsische Faktoren, sondern auch das Mikromilieu der Zelle ihre Funktionalität beeinflusst. Bei der Charakterisierung zirkulierender Mesoangioblasten wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss Veränderungen des Mikromilieus -hier Alter und kardiopulmonaler Bypass- auf Mesoangioblasten nehmen. Die vorliegende Arbeit untersucht die

- Stammzellnische und Mobilisation von Mesoangioblasten
- Anzahl und Funktion von Mesoangioblasten bei Kindern und Erwachsenen
- Verbesserung der Funktion von Mesoangioblasten durch Veränderung des Mikromilieus.

Kapitel 2

Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Im Zeitraum von Mai 2006 bis August 2008 wurden folgende Patienten rekrutiert:

2.1.1 Pädiatrisch-kardiologische Patienten

85 Kinder, die wegen eines kongenitalen Herzfehlers im Kinderherzzentrum Gießen eine Herzoperation unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) erhielten, nahmen an der Studie teil. Neun dieser Patienten wiesen genetische Abberationen auf, die häufig mit angeborenen kardialen Vitien vergesellschaftet sind (Trisomie 21 (n=3), DiGeorge-Syndrom (n=3), Cat-Eye-Syndrom (n=1), Rubinstein-Taybi-Syndrom (n=1), TnT-Mutation (n=1)). Altersstufen wurden unterschieden wie in der Pädiatrie üblich und präoperative Krankheitsausprägung gemäß der modifizierten Ross-Skala [65], dem pädiatrischen Äquivalent der NYHA-Skala, eingeteilt. Altersklassen, Ross-Stadium, führendes Vitium und Operationsverfahren sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt.

Altersstufen		n=85
< 1 Monat	Neugeborenes	n=10
1-12 Monate	Säugling	n=30
13-72 Monate	Kleinkind	n=29
73-216 Monate	Schulkind/ Jugendlicher	n=16

Führendes Vitium		n=85
Transposition der großen Arterien (TGA)		n=7
Double Outlet Right Ventricle (DORV)		n=9
Double Inlet Left Ventricle (DILV)		n=4
Hypoplastisches Linksherzsyndrom (HLHS)		n=8
Hypoplastisches Rechtsherzsyndrom (HRHS)		n=1
Fallot'sche Tetralogie (ToF)		n=4
Partielle Lungenvenenfehlmündung (PAPVR)		n=4
Ventrikelseptumdefekt (VSD)		n=8
Atriumseptumdefekt (ASD)		n=8
Atrio-ventrikulärer Septumdefekt (AVSD)		n=4
Aortenklappeninsuffizienz		n=6
Aortenklappenstenose		n=3
Aortenisthmusstenose (Istha)		n=3
Pulmonalklappeninsuffizienz		n=4
Pulmonalklappenatresie + VSD/IVS		n=3
Trikuspidalklappeninsuffizienz		n=2
Truncus arteriosus communis		n=1
Ebstein-Anomalie		n=2
Bland-White-Garland-Syndrom		n=1
Shone-Komplex		n=1
Benigner Herztumor		n=1
Dilatative Kardiomyopathie (DCM)		n=1

Operationsverfahren	n=85
ASD-/VSD-/AVSD-Verschluss	n=24
Klappenersatz	n=15
Totale cavo-pulmonale Anastomose (TCPC)	n=12
Glenn-OP / Step II Hybrid-Prozedur	n=11
Arterielle Switch-OP	n=7
Istha-Resektion	n=4
Klappenrekonstruktion	n=3
Lungenvenen-Reimplantation	n=4
Koronarien-Reimplantation	n=1
TAC-Korrektur	n=1
Tumorsektion	n=1
Left Ventricular Assist Device (LVAD)-Implantation	n=1

Ross-Klassifikation	n=85	
Ross 1	keine körperliche Beeinträchtigung	n=24
Ross 2	frühzeitige Erschöpfung bei körperlicher Anstrengung (Spielen, Laufen)	n=30
Ross 3	Schwitzen, Zyanose, Erschöpfung bei leichter Anstrengung (z.B. Saugen an der Mutterbrust)	n=24
Ross 4	Schwitzen, Zyanose, Erschöpfung in Ruhe, intensiv-medizinische Überwachung nötig	n=7

2.1.2 Internistisch-kardiochirurgische Patienten

25 Erwachsene, die sich in der Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg oder des Universitätsklinikums Frankfurt a.M. einer Operation mit kardiopulmonalem Bypass unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterzogen, bildeten dieses Kollektiv. Grund zur Operation waren koronare Herzkrankheit (n=19), Klappeninsuffizienz/ -stenose (n=5), LVOT-Obstruktion durch Myxom (n=1), angeborener Herzfehler (n=1) und Chronisch Thrombembolische Pulmonale Hypertonie (CTEPH, n=1). Die durchgeführten Operationen waren Arteriocoronarer Bypass (ACB) (n=19), Klappenersatz (n=6), Myxomentfernung (n=1) und Thrombektomie (n=1). Die Einteilung des Krankheitsstadiums erfolgte gemäß NYHA-Kriterien [66].

NYHA-Klassifikation		n=26
NYHA 1	Herzerkrankung ohne körperliche Limitation. Alltägliche körperliche Belastung verursacht keine inadäquate Erschöpfung, keine Rhythmusstörungen, keine Luftnot oder Angina pectoris.	n=0
NYHA 2	Herzerkrankung mit leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Alltägliche körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.	n=6
NYHA 3	Herzerkrankung mit höhergradiger Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bei gewohnter Tätigkeit. Keine Beschwerden in Ruhe. Geringe körperliche Belastung verursacht Erschöpfung, Rhythmusstörungen, Luftnot oder Angina pectoris.	n=17
NYHA 4	Herzerkrankung mit Beschwerden bei allen körperlichen Aktivitäten und in Ruhe. Bettlägerigkeit.	n=1

2.1.3 Pädiatrische HTx- und KMTx-Patienten

18 knochenmarkstransplantierte Patienten wurden in den kinderonkologischen Ambulanzen des Universitätsklinikums Gießen und Marburg und des Universitätsklinikums Frankfurt a.M. rekrutiert. Voraussetzung zur Studienteilnahme war eine gender-mismatch-Knochenmarktransplantation (KMTx) bei onkologischer Grunderkrankung. Gender-mismatch-Transplantation beschreibt die Situation, wenn ein Patient ein Spenderorgan eines nicht gleichgeschlechtlichen Spenders erhält. Bei allen Patienten lag ein kompletter Chimärismus in der letzten onkologischen Routineuntersuchung vor Studienteilnahme vor, d.h. das Empfänger-Knochenmark bildete keine Zellen mehr; alle Blutzellen wurden vom Spenderknochenmark produziert. Inkompletter Chimärismus galt als Ausschlusskriterium.

Außerdem wurden drei männliche herztransplantierte (HTx) Patienten, die jeweils ein weibliches Spenderherz erhalten hatten, aus der kinderkardiologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Gießen und Marburg rekrutiert.

Diagnose, Verlauf und Medikation wurden den Patientenakten entnommen. Perioperative Parameter entstammen dem Narkoseprotokoll. Der Behandlungsverlauf wurde durch die Studienteilnahme nicht beeinflusst.

2.1.4 Ethikkommission

Die Studien wurden genehmigt von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH bzw. des Universitätsklinikums Frankfurt a.M.. Schriftliche Zustimmung der Patienten bzw. deren gesetzlicher Vertreter wurde vor Studienteilnahme eingeholt.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml, Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
T 75 Kulturflasche 75 cm ² , Stripetten, 6-well Zellkulturschale, 15 ml Zentrifugenröhrchen, 50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Lab-Tek® Chamber Slide	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA
6,5mm Transwell 8µm Pore Polycarbonate Membrane Insert	Corning Life Science, Lowell, MA, USA
Fetales Bovines Serum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Endothelzell Basal Medium (EBM), EGM Singlequots	Lonza, Walkersville, MD, USA
Biocoll Separating Solution 1,077g/ml isoton	Biochrom AG, Berlin Deutschland
Dulbeccos PBS (1x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fibronektin (pure) 1mg	Roche, Mannheim, Deutschland
Trypsin EDTA 0,25%	Invitrogen, Carlsbad, Kanada
Ethanol, Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande

2.2.2 Zellkulturmedium

Name	Zusammensetzung
EBM-Vollmedium zur Kultivierung von Mesoangioblasten (MAB) und endothelialen Progenitorzellen (EPC)	EBM, 20% FCS (v/v), Penicillin 50.000 U, 50 mg Streptomycin, Hydrocortison (1 µg/ml), Gentamicin Sulfat (50 µg/ml), Amphotericin-B (50 µg/ml), 2 ml "Bovine Brain Extract" (3 µg/ml), rhEGF (10µg/ml)

2.2.3 Cytokine

Produkt	Hersteller
rhHGF	Peprotech, Umkirch, Deutschland
rhSDF-1 α	Peprotech, Umkirch, Deutschland
rhTNF α	Peprotech, Umkirch, Deutschland

2.2.4 Immunhistochemische Materialien

Produkt	Hersteller
Chromosome Enumeration DNA FISH Probes X SpectrumGreen	Abbott Wiesbaden Deutschland
Chromosome Enumeration DNA FISH Probes Y SpectrumOrange	Abbott Wiesbaden Deutschland
Nonidet P40 (NP-40)	Biovision, Mountain View, CA, USA
Standard Saline Citrate (SSC)	Cellgro, Manassas, VA, USA
Proteinase K	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glycerin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
DAPI (w/v)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Dithiothreitol(DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.2.5 Kits

Produkt	Hersteller
APC BrdU Flow Kit	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ USA
RayBio® Human Cytokine Antibody Array	RayBiotech, Inc., Norcross GA, USA
Human CXCL12/SDF-1 α Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Isolation und Kultivierung endothelialer Progenitorzellen

Die Isolation endothelialer Progenitorzellen (EPC) erfolgt mittels Ficoll-Dichte-zentrifugation aus Blutproben. In mit einem Gerinnungshemmer versetzten Blut bilden sich durch Sedimentation bzw. Zentrifugation drei Schichten: Blutplasma (obere Phase), mononukleären Zellen (MNC, engl. Buffy Coat, Interphase) und Erythrozyten (untere Phase). Blutspenden werden so zu Plasmaprodukten, Thrombozytenkonzentraten bzw. Buffy-Coats und Erythrozytenkonzentraten verarbeitet. Der Buffy Coat macht etwa 1% der Blutprobe aus. Zur Isolation von EPC werden Blutproben zur Aufreinigung im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und in einen zur Hälfte mit Ficoll gefüllten Falcon pipettiert. Ficoll dient zur saubereren Trennung verschiedener Phasen. Während 20minütiger Zentrifugation bei 800g entstehen ähnlich wie oben beschrieben Plasma (obere Phase), Interphase (grau-weiße Schicht aus MNC), eine Phase des trennenden Ficolls, und Erythrozyten (untere Phase). EPC stellen ca. 1% der MNC dar. Die MNC-Zellfraktion wird abgesaugt und mehrmals mit PBS gewaschen, indem die Zellen in PBS aufgenommen und 10 Minuten bei 800g zentrifugiert werden. Wenn der Überstand nach Zentrifugation klar ist, wird die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen mit einer Dichte von $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium (EBM) resuspendiert. Jeweils 10-12ml Zellsuspension werden in Fibronectin-beschichtete T75-Zellkulturflaschen ausgebracht. Fibronectin ist ein Glykoprotein, welches die Anhaftung bestimmter Zellen an die Kulturschale fördert. Die Fibronectin-Beschichtung wird vor dem Ausbringen der Zellen durch halbstündige Inkubation der Zellkulturflaschen mit bodenbenetzender Fibronectin-Lösung erzielt (10µl 0,1% Fibronectin/ml PBS). Die Zellinkubation erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Am Tag 3 nach Isolation werden flottierende MNC verworfen und adhärente Zellen (mehrheitlich EPC) für nachfolgende Experimente verwendet.

2.3.2 Isolation und Kultivierung zirkulierender Mesoangioblasten

Die Isolation der Mesoangioblasten (MAB) verläuft ähnlich wie die der EPC. Aus einer Blutprobe werden mit Hilfe der Ficoll-Dichtezentrifugation MNC isoliert und in einer Dichte von $8 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Fibronectin-beschichteten Zellkulturflaschen ausgebracht. Nun werden die Zellen nicht wie im Protokoll zur Isolation von EPC an Tag 3 nach Isolation verwendet, sondern erst an Tag 7 werden nicht adhären-te Zellen verworfen und adhären-te Zellen in frischem EBM-Vollmedium bis Tag 14 kultiviert. Von Tag 7 bis 17 nach Isolation kann die Entstehung von MAB-Kolonien beobachtet werden, die Mehrzahl der Kolonien tritt jedoch bis Tag 10 auf. Die Pas-sagierung der MAB erfolgt ab Tag 14 alle 3-4 Tage. Die Zellkonfluenz beträgt dabei 70-90%. Zuerst wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen anschließend trypsiniert. Trypsin baut proteolytisch Oberflächenproteine der Zelle ab, welche die Adhäsion zur Kulturschale vermitteln. Da das im verbliebenen Medium enthaltene FCS die Behandlung mit 0,25% Trypsin-EDTA inhibieren kann, werden Zellen zu-erst mit PBS gewaschen, um verbliebene Mediumreste zu entfernen. Dann werden 2ml Trypsin in die Flasche gegeben und der Ablösungsprozess durch Schwenken der Flasche unterstützt. Nach einer Einwirkzeit von 3-5 Minuten wird Trypsin durch Zugabe von 2ml Medium inaktiviert. Die Zellen zur weiteren Passagierung in einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml EBM ausgebracht oder direkt für Experimente benutzt. Auf Grund des identischen Isolationsprotokolls von MAB und EPC befinden sich in den ersten Passagen der MAB-Kultivierung noch EPC. Der Anteil der MAB er-höhrt sich durch ihr Wachstum und Verdrängung der EPC stetig, bis er in Passage 3 100% erreicht. Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden deshalb mit MAB aus Passage 3-5 durchgeführt.

2.3.3 Ermittlung von Population doubling und Population doubling time

Population doubling (PD) ist eine rechnerische Schätzung der Anzahl der Zellver-dopplungen einer Zellpopulation im beobachteten Zeitraum (hier eine Passage).

Hierzu wird bei MAB in der jeweiligen Zelllinie ab Tag 14 nach Zellisolation (Passage 1) alle 3-4 Tage die Zellzahl einer Kulturflasche bestimmt und daraus das PD errechnet:

$$\text{Anzahl der population doublings} = \frac{\log\left(\frac{N}{N_0}\right)}{\log(2)}$$

mit N = Zellzahl bei Passagenbeginn, N_0 = Zellzahl bei Passagenende

Danach werden die Zellen zur weiteren Passagierung in einer Dichte von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml neu ausgebracht. Nach 3-4 Tagen (einer Passage) wird wiederum Zellzahl und PD bestimmt und die Passagierung fortgeführt. Die Kultivierung einer Zelllinie wird beendet, wenn die Zellzahl nach einer Passage stagniert. Abb. 3.1 stellt die kumulierten PDs dar.

Die Population doubling time (PDT) beschreibt die Zeit zur Verdopplung der Zellzahl während der exponentiellen Phase des Wachstums. Ihre Bestimmung ist weniger zeit- und materialintensiv als die des PD. Für die ersten zwei bzw. drei Passagen wird die exponentielle Wachstumskurve durch Logarithmierung annähernd mit einer linearen Geradengleichung $y = mx + b$ beschrieben. In Microsoft Excel wird diese Geradengleichung für jeden Donor ermittelt. Die für eine Verdopplung der Zellzahl benötigte Zeit (PDT) entspricht dabei dem x-Wert der Geraden bei $y = \log(2)$.

$$\text{Population doubling time} = \frac{\log(2) + b}{m}$$

mit b = y -Achsenabschnitt, m = Steigung der Geraden

2.3.4 Migrationsassay (Boyden-Kammer)

Die einfachste Methode zur Messung der Migration ist der Scratch-Assay. Hierbei werden in einem definierten Areal eines Zellmonolayers die Zellen abgeschabt (engl. scratch) und später die Migration an den Monolayergrenzen fotografisch dokumentiert und ausgewertet. Im Scratch-Assay bleiben Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte erhalten, es ist jedoch keine Messung der Migration entlang

eines chemischen Konzentrationsgradienten möglich [67]. Chemotaxisversuche werden deshalb mit einer modifizierten Boyden-Kammer durchgeführt. Hierbei wird durch Diffusion ein Konzentrationsgradient erzeugt. Suspendierte Zellen wandern entlang diesem Gradienten durch eine Membran mit definierter Porengröße [68] (Abb. 2.3A).

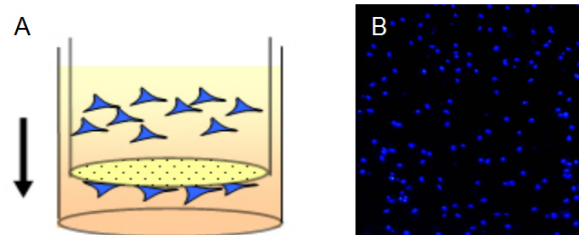


Abbildung 2.1: Modifizierte Boyden-Kammer. A: Schematische Darstellung einer Transwell-Kammer. B: Membran einer Transwell-Kammer mit DAPI-gefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop, 10x Vergrößerung

Die verwendeten Zellen werden zu Beginn des Versuchs mit EBM + 0% FCS gewaschen und in EBM + 0% FCS zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dies dient der „Aushungerung“ der Zellen. Die Sensibilität auf chemische Lockstoffe soll dadurch erhöht werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen trypsinisiert. Die Zellsuspension wird 10 Minuten bei 800g zentrifugiert und einmal mit EBM + 0% FCS gewaschen. Mit EBM + 0% FCS wird eine Zellsuspension von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml hergestellt. In das fibronektin-beschichtete untere Kompartiment einer Transwell-Kammer werden 600µl Kontroll- oder Testsubstanz eingebracht. Das obere Kompartiment wird mit 200µl der vorbereiteten Zellsuspension (entspricht 50.000 Zellen) befüllt und sofort in das untere Kompartiment eingesetzt. Die befüllten Kammern werden vier Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen, die die Membran durchwandert haben, ausgezählt. Hierzu wird Oberseite der Membran vorsichtig mit einem Wattepad abgewischt und die Membran der Kammer entnommen. Die Zellkerne der Zellen, die durch die Membran gewandert sind und an ihrer Unterseite haften, werden dann mit DAPI Mounting Medium angefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop (Fa. Zeiss, Axiovert 100, AxioCam, Axiovision Software) werden bei Durchlicht zuerst die Poren der Membran eingestellt, dann

die blau gefärbten Zellkerne im Licht von 461nm in jeweils drei repräsentativen Gesichtsfeldern gezählt (Abb. 2.1B). Alternativ zur DAPI-Färbung können die Zellen vor dem Versuch mit Cell Tracker Green markiert werden.

2.3.5 Survivalassay

Im Survivalassay wird das Überleben von Zellen in verschiedenen Kulturmedien untersucht. Fibronektin-beschichtete Wells einer 6-well-Platte werden mit 2ml Kontroll- oder Test-Medium befüllt. MAB werden in einer Dichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen/ml Medium ausgebracht und die Zellen wie üblich kultiviert. An Tag 3 wird ein Mediumwechsel durchgeführt und an Tag 5 die Zahl der adhärennten Zellen nach Trypsinierung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

EPC werden einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml Medium ausgebracht. Die Zellzahl wird wie beschrieben an Tag 7 bestimmt. Gelegentlich werden die Ergebnisse als 'Surviving Fraction' angegeben:

$$\text{Surviving Fraction (SF)} = \frac{\text{Zellzahl(Experiment)}}{\text{Zellzahl(Kontrolle)}}$$

2.3.6 Proliferationsassay (BrdU-Uptake Assay)

Das Immunfluoreszenzstaining mit durchflusszytometrischer Analyse von inkorporiertem Bromodeoxyuridin (BrdU) bietet eine hochauflösende Technik um Vorkommen und Charakteristika DNA-synthetisierender Zellen zu untersuchen. Bei dieser Methode wird BrdU, ein Thymidin-Analogon, in proliferierenden Zellen während der S-Phase (DNA-Synthese-Phase) des Zellzyklus in neusynthetisierte DNA eingebaut (Abb. 2.2). Das aufgenommene BrdU wird mittels eines fluoreszierenden BrdU-Antikörpers markiert und BrdU-positive Zellen durch Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt.

Das Protokoll folgt den allgemeinen Herstellerangaben. MAB in zweiter oder dritter Passage werden an Tag 3 nach der letzten Passagierung eine Stunde mit $10 \mu\text{l}$ 1mM BrdU/ml Medium inkubiert. Dann wird die Zellzahl bestimmt und durch Zentrifugation ein Zellpellet mit $1 \cdot 10^6$ Zellen hergestellt. Das Zellpellet wird in $50 \mu\text{l}$ Staining Puffer (1x DPBS, 3% Fetal Bovine Serum und 0,09% Sodiumazid) resuspendiert

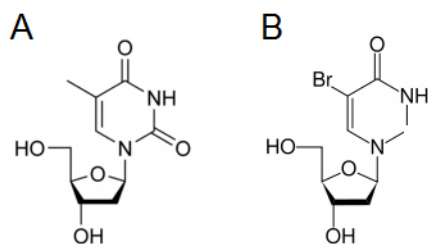


Abbildung 2.2: Analogie der Molekülstruktur von BrdU und Thymidin. A: Bromodeoxyuridin (BrdU). B: Thymidin. Die Moleküle unterscheiden sich nur durch Methyl- bzw. Bromgruppe am Phenol-Ring.

und in ein FACS-Röhrchen überführt. Damit DNase und BrdU-Antikörper später bis in den Zellkern vordringen können, wird die Zellmembran fixiert und permeabilisiert. Dies wird erreicht, indem man das Zellpellet mit 100µl BD Cytofix/Cytoperm Puffer suspendiert und 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden danach mit 1ml Staining Puffer gewaschen, für 5 Minuten bei 400xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 100µl BD Cytoperm Plus Buffer resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Waschen, Zentrifugieren und Überstand verwerfen wie zuvor. Nochmals werden die Zellen in 100µl BD Cytofix/Cytoperm Buffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Waschen, Zentrifugieren und Überstand verwerfen. Um das in die DNA eingebaute BrdU für dessen Antikörper zugänglich zu machen, werden die Zellen eine Stunde bei 37°C mit 100µl DNase (Konzentration 300µg/ml DPBS) behandelt. Waschen, Zentrifugieren und Überstand verwerfen. Der BrdU-Antikörper wird mit 50µl BD Perm/Wash Buffer verdünnt und die Zellen damit 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Waschen, Zentrifugieren und Überstand verwerfen. 1ml Staining Puffer wird zugefügt und die gefärbten Zellen im Durchflusszytometer bei einer Geschwindigkeit unter 400 Ereignissen pro Sekunde analysiert.

2.3.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Prinzip des ELISA wurde 1971 von Engvall et al. entwickelt [69]. Es werden zwei für das zu untersuchende Antigen spezifische Antikörper benutzt. Sie binden an unterschiedlichen Stellen des zu untersuchenden Antigens und behindern ihre

Reaktionen nicht gegenseitig. Der erste Antikörper (coating-Antikörper) ist auf der vom Hersteller vorbereiteten Mikroplatte gebunden. Das Substrat bindet aus der untersuchten Flüssigkeit heraus an diesen immobilisierten Antikörper. Der zweite, polyklonale Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase), Alkalischer Phosphatase (AP) oder Glucoseoxidase (GOX) verlinkt. Er bindet an einer anderen Bindungsstelle des Substrats und sorgt durch enzymatische Reaktion für einen messbaren Farbumschlag, der proportional zur Konzentration des gebundenen Substrats ist (Abb. 2.3). Um Schwankungen, denen der ELISA-Assay unterliegt, auszugleichen, werden die Ergebnisse mehrerer Versuche gemittelt.

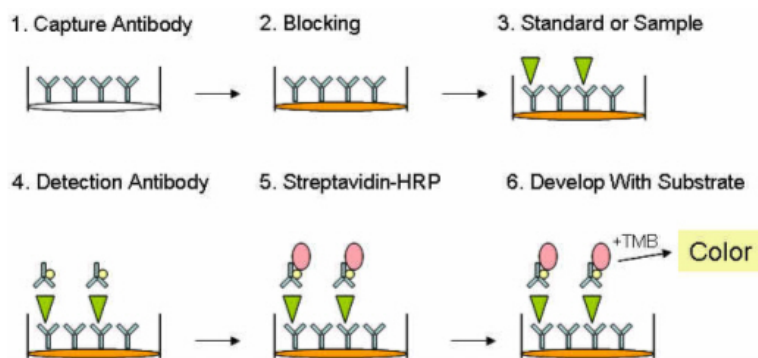


Abbildung 2.3: Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (Abbildung RayBio® Human SDF-1alpha ELISA Kit Manual [70])

Die Wells der ELISA-Platte werden mit je 100µl der Standardreihe oder Probenmaterials befüllt und mit Folie bedeckt 2,5 Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert. Danach gießt man die Flüssigkeit ab und wäscht die Wells dreimal mit je 300µl 1x Wash Solution. Die Wells werden eine Stunde lang unter leichtem Schwenken mit 100µl biotinylierten Antikörper (Detection Antibody) inkubiert und anschliessend gewaschen. Danach erfolgt die Inkubation mit 100µl Streptavidin-Lösung (Streptavidin-HRP) für 45 Minuten. Ungebundene Antikörper-Enzym-Komplexe werden durch erneutes Waschen mit Wasch Solution entfernt. Als letztes Reagenz werden je 100µl TMB One-Step Substrate Reagent in die Wells pipettiert. TMB One-Step Substrate Reagent setzt sich aus gleichen Volumina Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Tetramethylbenzidin ($TMBH_2$) zusammen. Unter Einwirkung von Wasserstoffperoxid und Katalysation durch Streptavidin-HRP entsteht

aus der farblosen Leukoform TMBH₂ der blaugrüne Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB). Die Intensität des Farbumschlags ist proportional zur Konzentration des im ersten Schritt gebundenen Antigens. Die Farbreaktion muss lichtgeschützt unter leichtem Schwenken ablaufen und wird nach 30 Minuten durch Zugabe von 50µl Stop-Puffer (Schwefelsäure, H₂SO₄) unterbunden, was einen zweiten Farbumschlag von blau nach gelb hervorruft. Die Farbintensität wird sofort im ELISA-Reader bei 450nm gemessen und die Konzentration des Antigens anhand der Standardkurve errechnet.

2.3.8 Cytokine Array

Der Cytokine Array beruht auf dem gleichen Sandwich-Prinzip wie der ELISA (Abb. 2.3), untersucht aber zahlreiche verschiedene Antigene einer Testsubstanz. Hierzu ist die Cytokine-Array-Membran an vordefinierten Punkten mit jeweils verschiedenen Erst-Antikörpern beschichtet.

Zu Beginn des Versuchs wird die Membran in die dafür vorgesehene Schale gesetzt. Man bereitet die Membran vor, indem man sie 30 Minuten mit 2ml Blocking Puffer inkubiert. Dann wird der Blocking Puffer entfernt und die Membran mit 1ml Test-Substanz eine Stunde inkubiert. Die Membran jeweils zweimal mit 2ml 1x Waschpuffer I bzw. II waschen, indem die Platte für fünf Minuten pro Waschschrift leicht geschwenkt wird. Der erste, Biotin-konjugierte Antikörper (Detection Antibody) wird mit 100µl 1x Blocking-Puffer und 2ml 1x Blocking-Puffer verdünnt und die Membran für eine Stunde mit 1ml dieser Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Wie zuvor mit Waschpuffer I und II waschen. 2ml 1000fach mit 1x Blocking Buffer verdünntes HRP-konjugiertes Streptavidin wird auf die Membran gegeben, zwei Stunden inkubiert und gewaschen. Der folgende Schritt wird zügig binnen 40 Minuten ausgeführt, um ein Austrocknen der Membran zu vermeiden. 250µl 1x Detection Buffer C und 250µl 1x Detection Buffer D werden zusammen auf die Membran gegeben und 2 Minuten inkubiert. Luftblasen werden durch Klopfen an den Rand der Membran entfernt. Überschüssige Dektektionsflüssigkeit saugt man von der schräggehaltenen Membran mit einem Papiertuch auf. Nun wird die Membran

unter Vermeidung von Druck und Entstehung von Luftblasen zwischen zwei Plastikplatten gelegt. Nach 40-sekündiger Belichtungszeit auf einem Röntgenfilm kann die Membran bei -20°C aufbewahrt werden. Die Filmplatte wird entwickelt und ausgewertet. Die semiquantitative Analyse der Intensität der Antigenbindung wird mit einem Bildverarbeitungsprogramm (TINA; version 2.09g) durchgeführt.

2.3.9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode zum Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen. Das zu Grunde liegende Konzept wurde 1969 von Gall und Pardue beschrieben [71]. Es beruht auf der Paarung komplementärer Basen zweier Nukleinsäure-Einzelstränge (Abb. 2.4). DNA liegt im Zellkern doppelsträngig vor. Durch Hitze oder pH-Wert-Verschiebung wird sie zu Einzelsträngen denaturiert. Eine in vitro hergestellte, für den gesuchten Genabschnitt spezifische einzelsträngige DNA-Sequenz (Sonde) mit Fluoreszenz-Marker bindet in ihre komplementäre Sequenz der DNA im Zellkern. Anschließend liegen in der DNA Hybridmoleküle aus den zelleigenen Nukleinsäuren und der Sonde vor. Diese Hybridmoleküle können anhand des konjugierten Fluoreszenzfarbstoffes detektiert werden. Bis zu sieben verschiedene Sonden können in einer Färbung benutzt werden.

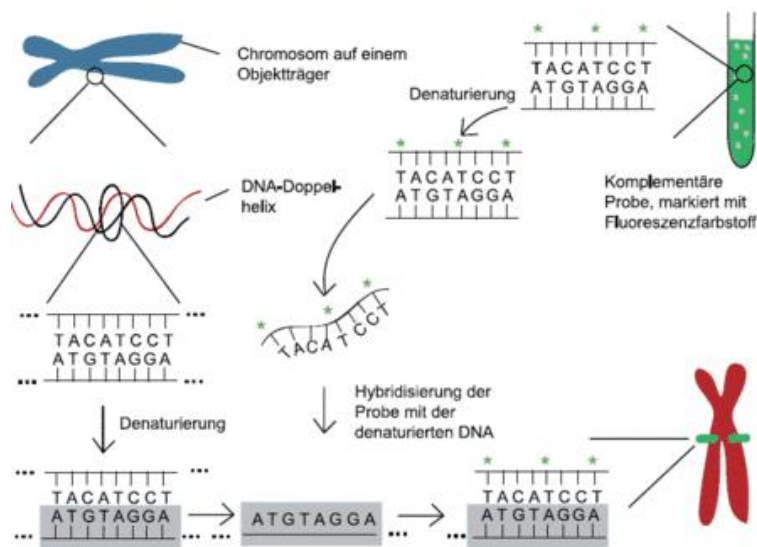


Abbildung 2.4: Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten. (Abbildung Klein et al. [72])

MAB werden 24 Stunden vor dem Staining in üblicher Zelldichte auf einen Fibronectin-beschichteten, gläsernen Objektträger ausgebracht und inkubiert. Danach werden die Zellen für 10 Minuten mit einer Mischung aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 4:1 auf dem Objektträger fixiert und die Zellmembranen permeabilisiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS und 2xSSC werden nicht adhärente Zellen, Zelldebris und die Fixierlösung entfernt. Darauf folgt für zwei Minuten eine Behandlung mit 5mg/ml Proteinase K. Diese Serinprotease besitzt durch endo- und exoproteolytische Aktivität eine breite Spezifität und verdaut DNAsen, welche zur unerwünschten Degradation der DNA führen könnten. Nach dem Proteinverdau wird das Präparat dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Das Präparat wird hierfür je zwei Minuten in einer 70%-, 95%- und 100%-igen Ethanollösung gebadet. Bevor die eigentliche Färbung der Chromosomen vorgenommen wird, trocknet das Präparat für 30 Minuten an der Luft. In der Zwischenzeit werden die Chromosome Enumeration DNA FISH Probes (CEP) lichtgeschützt vorbereitet. Pro Objektträger werden je 2µl Aqua dest., 7µl Hybridisierungspuffer, 1µl Sonde für X-Chromosomen und 1µl Sonde für Y-Chromosomen in ein Reaktionsgefäß pipettiert und durch kurzes Vortexen und Zentrifugation gemischt. Auf dem Heizblock wird die noch doppelsträngige DNA-Sonde bei 71°C für 4 Minuten zu Einzelsträngen denaturiert, sofort 10µl auf das getrocknete Präparat gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Präparat wird nun lichtgeschützt für vier Minuten bei 80°C auf dem Heizblock denaturiert. Nach zweistündiger Hybridisierung im 37°C warmen Wasserbad wird die überschüssige Sonde in verschiedenen 42° warmen Puffern gewaschen. Die Waschpuffer und -zeiten sind wie folgt: 5 Minuten 2xSSC, 10 Minuten 50% Formamid/ 2xSSC, 10 Minuten 50% Formamid/ 2xSSC, 5 Minuten 2xSSC, 5 Minuten 2xSSC mit 0,1% NP-40, 5 Minuten 2xSSC, 5 Minuten PBS. Nach dem ersten Waschen in 2xSSC wird das Deckgläschen vom Objektträger entfernt, sodass die darauffolgenden Reagenzien in Kontakt mit dem Zellpräparat kommen. Nach dem Waschen wird durch Schräghalten vorsichtig die Flüssigkeit vom Objektträger entfernt. Das Präparat wird mit 10µl DAPI Mounting Medium (5 ml Glycerin, 4 ml PBS, 1 ml DTT (1M), DAPI 1 mg (w/v)) bedeckt und am konfokalen Mikroskop ausgewertet (Zeiss LSM 510 Confocal Microscope, Zeiss

LSM Imagebrowser). Das Präparat kann bei 4°C lichtgeschützt bis zum Verblässen der Fluoreszenz nach einigen Wochen gelagert werden.

2.3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde wo nicht anders angegeben mittels Kruskal-Wallis-Test oder Spearmans Rangkorrelationskoeffizient in SPSS 17.0 für Windows durchgeführt. Normalverteilung wurde mittels Q-Q-Plot getestet. Die Daten sind graphisch als Mittelwert+Standardabweichung dargestellt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Zahl und proliferative Kapazität zirkulierender Mesoangioblasten sinken mit zunehmendem Donoralter

3.1.1 Altersabhängige Zahl zirkulierender MAB

Mesoangioblasten (MAB) sind multipotente Zellen mit Ursprung in der embryonalen dorsalen Aorta und der Fähigkeit, in mehrere mesodermale Zelltypen zu differenzieren. Differenzierung muriner und caniner ortsständiger MAB in mesodermale Gewebe -Blut, Knorpel, Knochen, glatter Muskel, Skelettmuskel und Herzmuskel-

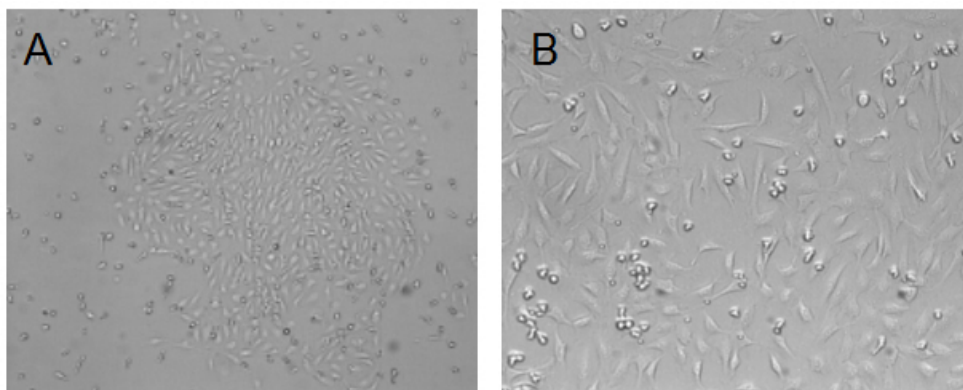


Abbildung 3.1: Mesoangioblasten in vitro. A: MAB-Kolonie an Tag 10, am Bildrand vereinzelt EPC (10fache Vergrößerung). B: Mesoangioblasten, 1. Passage, Tag 15.

sowie die erfolgreiche experimentelle Anwendung bei Miskeldystrophie wurde bereits beschrieben. Im Gegensatz zu HSC tragen MAB keine hämatopoetischen Oberflächenmarker (CD45-, CD133-), jedoch mesenchymale Marker wie CD73, sowie frühe endotheliale Marker (VEGF+/KDR+). Koyanagi et al. berichteten kürzlich über zirkulierende humane Mesoangioblasten mit sehr ähnlichem Markerprofil, die neben den genannten Oberflächenmarkern c-Met exprimieren. Die Charakterisierung dieser Zellen war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Von vielen Stammzelllinien ist bekannt, dass Zahl und Funktion der Zellen erheblich von Alter und Komorbidität des Spenders abhängen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Zusammenhänge mit Patientencharakteristika auch bei zirkulierenden MAB bestehen. Hierzu wurden MAB von Kindern mit angeborenem Herzfehler und Erwachsenen mit erworbener Herzerkrankung vor und nach einer Herzoperation mit kardiopulmonalem Bypass (CPB) gewonnen. Die präoperative Blutprobe wurde aus einem zentralen Venenkatheter gewonnen, als postoperative Blutprobe diente in der Herzlungenmaschine verbliebenes Blut. Die Patientencharakteristika sind in Kapitel 2.1 und Tabelle 3.1 dargestellt.

Patientencharakteristika	Kinder n=85 (%)	Erwachsene n=26 (%)
Alter	3,5 [+/- 4,5]	68,7 [+/- 11,0]
Männlich	47 (55,3)	19 (73,1)
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	-	3,3 [+/- 1,1]
Aktuelle Medikation		
ASS	7 (10,3)	18 (78,3)
Betablocker	21 (30,9)	14 (60,9)
Statine	0 (0)	15 (65,2)
ACE-Hemmer/ AT1-Blocker	16 (23,5)	14 (60,9)
Diuretika	19 (27,9)	11 (47,8)
Ross-/ NYHA-Stadium		
1	24 (28,2)	0 (0)
2	30 (35,3)	6 (26,1)
3	24 (28,2)	16 (69,6)
4	7 (8,2)	1 (4,3)
Erkrankte Herzkranzgefäße		
0	-	4 (17,4)
1	-	1 (4,5)
2	-	6 (26,1)
3	-	12 (52,2)

Im Blutstrom zirkulierende humane Mesoangioblasten werden wie EPC mittels Ficoll-Gradient aus einer Vollblutprobe isoliert. Im Gegensatz zu EPC, die zeitnah nach der Isolation verwendet werden, werden zur Gewinnung von MAB die ab Tag 10 auftretenden CFU (MAB-Kolonien, Abb. 3.1A) neu ausgesät und nicht adhärente Zellen verworfen. Die zwei- bis dreitägige Passagierung kann bis zu 100 Tagen fortgesetzt werden, sie sind somit klonal bis zu 50 Passagen expandierbar (Abb. 3.1B). Zirkulierende MAB sind sehr seltene Zellen. Bei 25% der untersuchten Kinder konnten vor einer Herzoperation vereinzelte MAB-Kolonien (0,2 CFU/ml Blut) gewonnen werden, bei Erwachsenen vor Operation jedoch nie (Abb. 3.2). Aus Leukozytenkonzentraten (Buffy coats) von Blutspendern im Alter von 18-65 Jahren konnten ebenfalls keine MAB gewonnen werden. Nach einer Herzoperation mit kardiopu-

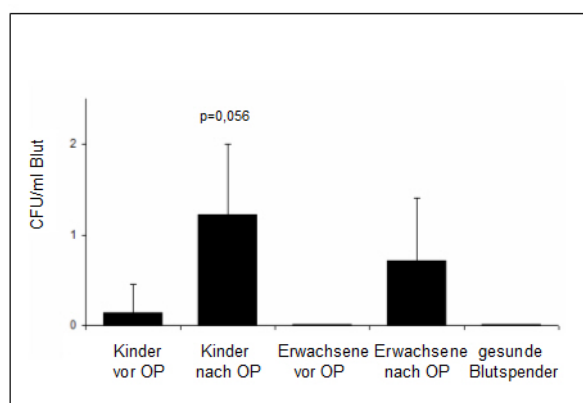


Abbildung 3.2: Zahl zirkulierender MAB. Kinder vor CPB (n=20) und nach CPB (n=60), Erwachsene vor OP (n=7), Erwachsene nach OP (n=12), Buffycoats (n=15).

monalem Bypass (CPB) konnten MAB deutlich häufiger isoliert werden: bei allen Kindern wurden durchschnittlich 1,2 CFU/ml Blut isoliert, und auch bei Erwachsenen traten nun stets CFU auf, allerdings in deutlich geringerer Anzahl (0,3 CFU/ml Blut) als bei Kindern. Die Isolation der MAB erfolgte binnen 3 bis 24 Stunden nach Blutentnahme. Die Zahl der CFU nahm bei längerer Lagerung und niedriger Temperatur etwas ab, jedoch nicht signifikant. Die Population doubling time, ein Maß für proliferative Kapazität der gewonnenen Mesoangioblasten, war unabhängig davon, ob die Zellen direkt nach Gewinnung der Blutprobe isoliert wurden oder ob die Blutprobe bis zur Isolation 24 Stunden gelagert wurde (n=7, ohne Abbildung).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Mesoangioblasten während CPB mobilisiert werden und dass die Zahl mobilisierter MAB bei Erwachsenen tendenziell niedriger ist als bei Kindern.

3.1.2 Altersabhängige proliferative Kapazität

Im Folgenden wurde untersucht, ob neben der Zahl auch die proliferative Kapazität der MAB bei Erwachsenen abnimmt. Zur Messung der proliferativen Kapazität wurde das Population doubling (PD, Zahl der Zellverdopplungen bis zum Wachstumsstillstand) und die Population doubling time (PDT, Zeit bis zur Verdopplung der Zellzahl) von MAB verschiedener Donoren bestimmt. Hierbei wurde beobachtet, dass es bei MAB von Erwachsenen viel eher zum Wachstumsstillstand kam als bei MAB von Kindern (Abb. 3.3A, n=12). In der Messung der PDT an einer größeren

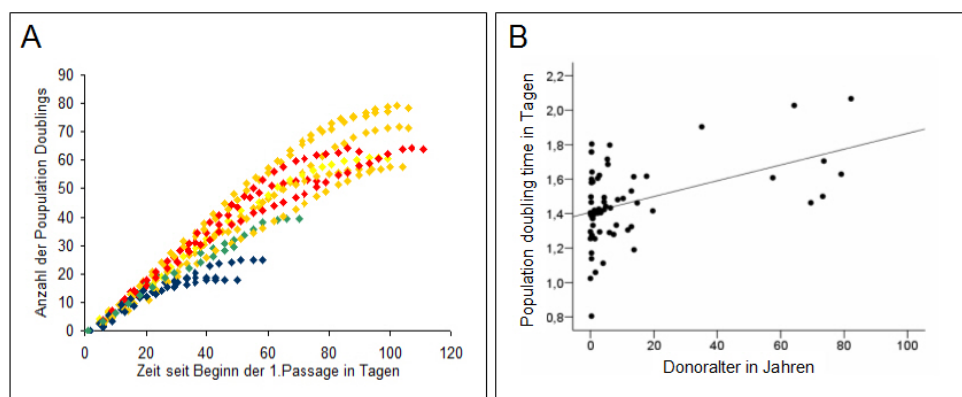


Abbildung 3.3: Proliferative Kapazität cMAB (child-derived mesoangioblasts) und aMAB (adult-derived mesoangioblasts). A: Population Doubling (n=12). gelb: Alter < 1 Monat, orange: < 1 Jahr, rot: < 6 Jahre, grün: < 18 Jahre, blau: > 18 Jahre. B: Population Doubling Time in Abhängigkeit vom Donoralter (n=68).

Zahl von Donoren (n=68) wurde eine signifikante Zunahme der PDT und damit ein signifikant langsames Zellwachstum bei Erwachsenen im Vergleich zu Kindern gezeigt (Abb. 3.3B, Kruskal-Wallis-Test $p=0,001$). Innerhalb des kinder-kardiologischen Kollektivs lag ebenfalls eine signifikante Korrelation von Alter und PDT vor ($r=0,327$, $p=0,006$).

3.1.3 Patientencharakteristika beeinflussen proliferative Kapazität

Durch Analyse der Patientencharakteristika wurden neben dem Alter weitere patientenbezogene Faktoren, welche die proliferative Kapazität der MAB beeinflussen, gefunden: Im kinder-kardiologischen Kollektiv sank die proliferative Kapazität (gemessen als PDT) der MAB bei niedriger präoperativer Sauerstoffsättigung (Abb. 3.4A). Des Weiteren boten neun der 61 pädiatrischen Patienten Gendefekte, welche

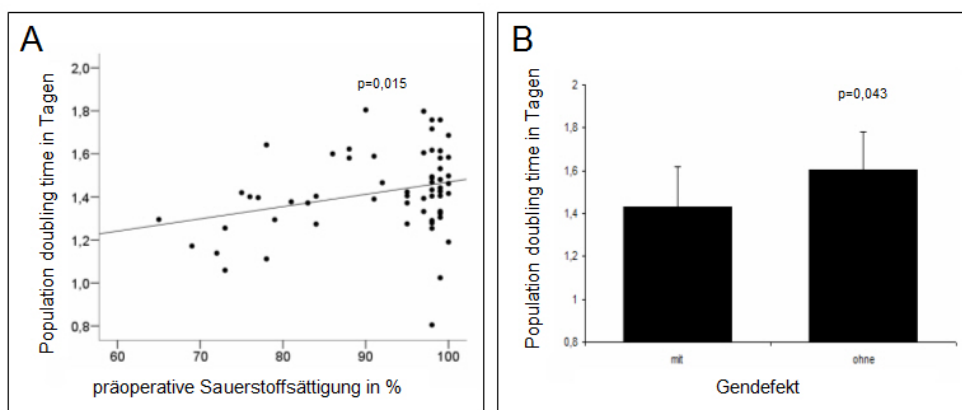


Abbildung 3.4: Einfluss von Patientencharakteristika auf PDT. A: Präoperative Sauerstoffsättigung. B: Gendefekte (n=60).

mit konnatalen Herzvitien vergesellschaftet sind (Trisomie 21, DiGeorge-Syndrom, Cat-Eye-Syndrom, Rubinstein-Taybi-Syndrom und TnT-Mutation). Die PDT der MAB dieser Kinder war signifikant verlängert (Abb. 3.4B), das Wachstum der MAB war folglich bei Kindern mit Gendefekten verlangsamt. Statistisch unabhängig war die PDT von Pulmonaler Hypertonie ($p=0,588$) und operationsbezogenen Parametern wie Aortenabklemmzeit ($p=0,853$), Zeit an der Herzlungenmaschine ($p=0,290$) und perioperativer Volumengabe pro Kilogramm Körpergewicht ($p=0,400$). In der klinischen Routineserologie wurden perioperativ zwei herzspezifische biochemische Marker bestimmt: Brain Natriuretic Peptide (BNP) als Marker für Herzinsuffizienz und Troponin T als Marker für Myokarduntergang. Präoperativ überstieg das BNP erwartungsgemäß die altersadaptierten Normwerte ($320\text{pg/ml} \pm 816,5\text{pg/ml}$), aber korrelierte nicht mit der PDT. Die Troponin-Werte aller Patienten waren präoperativ mit $\leq 0,3\text{ng/ml}$ im Normbereich. Postoperativ korrelierte das Troponin nicht

mit der PDT. Die Anzahl isolierter MAB je Milliliter Blut korrelierte mit keinem der genannten Patientencharakteristika außer wie in Abb. 3.2 gezeigt mit dem Donoralter.

Im Kollektiv der erwachsenen Patienten zeigte sich keine Korrelation der PDT von MAB mit der Zahl erkrankter Koronarien oder Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren (n=7). Auffällig waren die Beobachtungen bei einer 32jährigen Patientin mit schwerer chronisch thrombembolischer pulmonaler Hypertonie (CTEPH), die sich einer Thrombektomie unterzog. Hier stellten wir bereits in Passage 1 eine Wachstumsstagnation der MAB fest. Die MAB der anderen erwachsenen Donoren, die zumeist an KHK litten, konnten sehr einfach mehrere Passagen expandiert werden. Ob das massiv verminderte Wachstumspotential der MAB der CTEPH-Patientin in Zusammenhang mit der Grunderkrankung steht bleibt offen.

Zusammenfassend konnten wir folgende Risikofaktoren für eingeschränkte Zahl und proliferative Kapazität von MAB zeigen:

- Alter
- Gendefekte mit Assoziation zu konnatalen Herzvitien
- chronisch thrombembolische pulmonale Hypertonie (Fallbericht).

Präoperative Hypoxämie führte zu einem schnelleren Zellwachstum *in vitro*.

3.2 Mobilisation von Mesoangioblasten durch kardiopulmonalen Bypass

3.2.1 Plasmatischer HGF-Anstieg nach kardiopulmonalem Bypass

Operationen am offenen Herzen mit extrakorporaler Zirkulation (kardiopulmonaler Bypass (CPB)) führen zu ausgeprägten systemischen Reaktionen wie Aktivierung des Gerinnungssystems, inflammatorischer Antwort und Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen. Für die Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen sind systemische und lokale Zytokinfreisetzung unabdingbar. Während des kardiopulmonalen Bypasses kommt es zur komplexen Ausschüttung solcher Zytokine. Da MAB bei Kindern und Erwachsenen nach CPB signifikant häufiger auftreten als vor CPB (Abb. 3.2), wurde eine semiquantitative Bestimmung verschiedener Zytokine mittels Zytokinarray in Blutplasma von Kindern vor und nach CPB durchgeführt. Dieses Screening sollte Aufschluss über mögliche Mesoangioblasten-mobilisierende Faktoren geben. Von den 30 analysierten Angiogenese-vermittelnden Proteinen war im

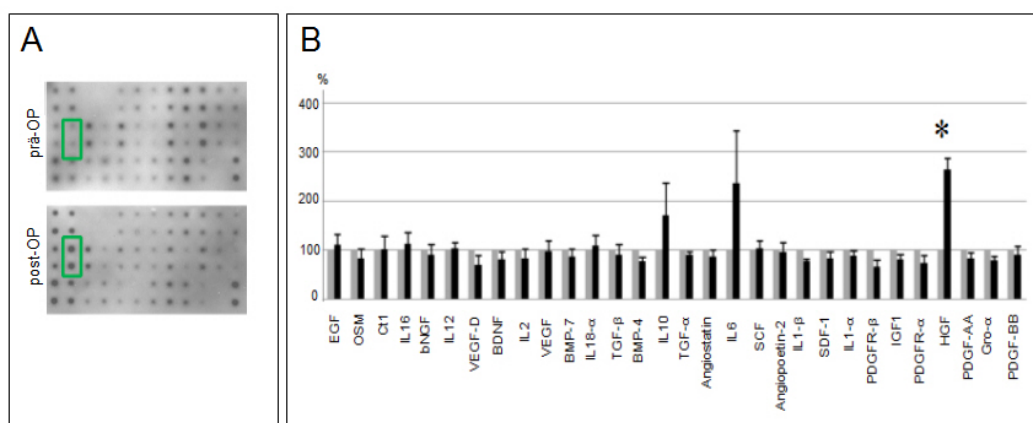


Abbildung 3.5: Zytokinlevel im Blutplasma vor und nach kardiopulmonalen Bypass. A: Cytokine Array Membran. HGF grün eingerahmt. B: semiquantitative Auswertung; hellgrau: vor OP; dunkelgrau: nach OP (n=4). Mit freundlicher Genehmigung von M. Iwasaki aus [73].

Plasma von Kindern nach CPB allein HGF (Hepatocyte Growth Factor) signifikant erhöht (Abb. 3.5A+B). Da Iwasaki et al. die Expression HGF-Rezeptors c-met bei

MAB beschrieben hatten, wurde eine wichtige Funktion von HGF bei der Mobilisierung von MAB während CPB angenommen.

3.2.2 Kardiopulmonaler Bypass und HGF induzieren Migration von MAB in vitro

Um zu untersuchen, ob nach kardiopulmonalem Bypass gewonnenes Plasma MAB auch in vitro zur Migration anregt und ob HGF ein chemischer Lockstoff für MAB ist, wurde ein Migrationsassay für zirkulierende humane MAB etabliert. Transwell-Kammern von 8µm Porengröße und eine Inkubationszeit von 4 Stunden sind für MAB geeignete Bedingungen. MAB von Kindern (cMAB, child-derived mesoangioblasts, MAB pädiatrisch-kardiologischer Patienten) wurden Plasma ausgesetzt, welches von Kindern vor bzw. nach CPB gewonnen wurde. Hierbei zeigte sich eine signifikant stärkere Migration in den Kammern mit Plasma nach CPB (Abb. 3.6A). Wurden cMAB in vitro HGF ausgesetzt, so stimulierte dies die Migration hochsi-

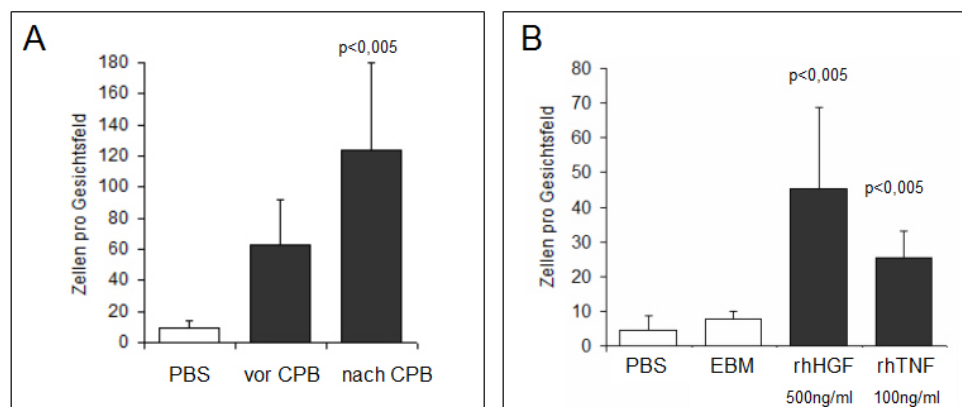


Abbildung 3.6: Migration von cMAB in vitro nach 4h. A: Plasma vor und nach CPB (n=6). B: HGF und TNF α (n=3). PBS: Phosphate Buffered Saline, EBM: Endothelial Basal Medium.

gnifikant (Abb. 3.6B). Auch TNF α , der murine und canine MAB mobilisiert, führte zu ausgeprägter Migration humaner MAB.

3.2.3 Verminderte migratorische Aktivität bei aMAB

In den vorherigen Versuchen wurde die altersabhängige Abnahme von Zahl und proliferativer Kapazität humaner zirkulierender Mesoangioblasten beschrieben. In der Boyden-Kammer wurde nun die migratorische Aktivität von cMAB und aMAB (adult-derived mesoangioblasts, MAB internistisch-kardiochirurgischer Patienten) untersucht. Desweiteren wurde untersucht, ob die migratorische Kapazität der aMAB in jungen Plasma verbessert werden kann, so wie es Conboy et al. durch die Exposition alter Zellen an eine junge Umgebung erreicht hatte.

Es zeigte sich, dass die Migrationsrate von aMAB gegenüber cMAB hochsignifikant ($p < 0,005$) eingeschränkt ist (Abb. 3.7A+B). Die migratorische Aktivität von cMAB wurde durch Plasma nach CPB signifikant gesteigert, wohingegen aMAB geringer auf die Stimulation mit Plasma nach CPB ansprachen ($p = 0,055$). cMAB und aMAB

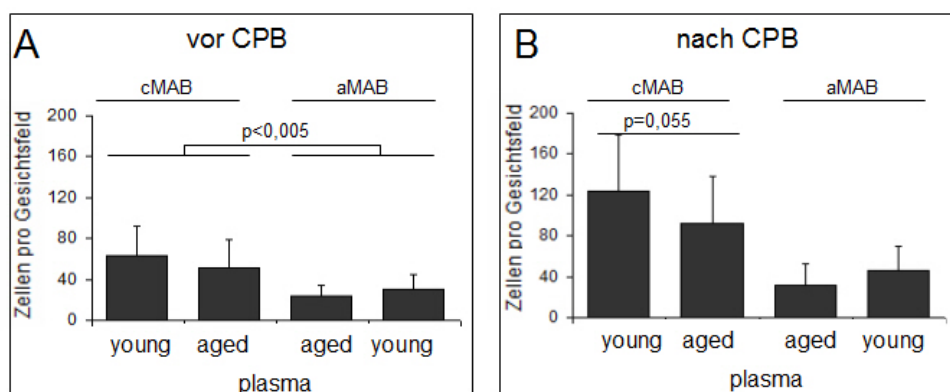


Abbildung 3.7: Migratorische Aktivität von cMAB und aMAB nach 4h. A: Plasma vor CPB (n=6). B: Plasma nach CPB (n=6).

migrierten durch Plasma von Kindern (young) tendenziell (vor CPB $p = 0,090$, nach CPB $p = 0,097$) mehr als durch Plasma von Erwachsenen (aged).

Zusammenfassend können Mesoangioblasten in vitro durch Plasma nach CPB zur Migration angeregt werden. Das nach CPB signifikant erhöhte HGF allein induziert ebenfalls Migration von MAB. Die migratorische Aktivität von aMAB ist signifikant vermindert. Zudem reagieren aMAB nicht wie cMAB auf den chemotaktischen Reiz des Plasmas nach CPB. Ihre migratorische Aktivität ist in junger Umgebung (Plasma von Kindern) nicht signifikant gesteigert.

3.3 Mikromilieu beeinflusst Zellüberleben von Mesangioblasten

3.3.1 Höheres Überleben und Proliferation von MAB in kindlichem Plasma

In den vorherigen Versuchen wurde dargestellt, dass Zahl, proliferative Kapazität und migratorische Aktivität von MAB bei Erwachsenen abnehmen. Zudem scheinen MAB durch Veränderungen plasmatischer Zytokinlevel nach CPB aktiviert zu werden. Um zu untersuchen, ob Alter und CPB auch in-vitro das Überleben von MAB beeinflusst, und ob das Überleben der aMAB in jungen Plasma verbessert werden kann, wurden MAB mit Plasma von Kindern bzw. Erwachsenen vor CPB bzw. nach CPB kultiviert. Für die Messung des Überlebens (Survivalassay) wurden MAB in EBM + 10% FCS + 10% Testplasma gezüchtet und die Zahl der adhären-ten Zellen am fünften Tag mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Als Kontrolle dienten cMAB in Standard-Medium (EBM + 20% FCS). In Plasma vor CPB war

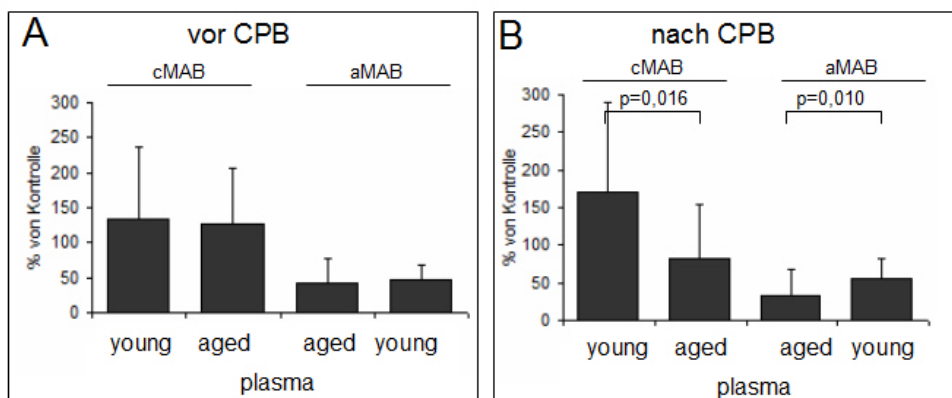


Abbildung 3.8: Überleben von cMAB und aMAB. A: Überleben nach fünf Tagen mit Plasma vor CPB (n=6). B: Überleben mit Plasma nach CPB (n=6). Kontrolle (=100%): cMAB in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).

das Überleben von MAB unabhängig davon, ob kindliches oder adultes Plasma im Zellkulturmedium benutzt wurde (Abb. 3.8A). Im Plasma nach CPB überlebten jedoch signifikant mehr cMAB und aMAB, wenn das Plasma von Kindern stammte (Abb. 3.8B).

Um festzustellen, ob die Unterschiede im Zellüberleben durch unterschiedliche Raten von Proliferation oder vielmehr durch Apoptose zu Stande kommen, wurden die Proliferationsraten der MAB in einem BrdU-Uptake-Assay untersucht. In diesem Versuch werden proliferierende Zellen durch Fluoreszenzmarkierung neu synthetisierter DNA dargestellt. Die wie im Survivalassay kultivierten Zellen wurden nach drei Tagen für eine Stunde mit dem Thymidin-Analogen BrdU inkubiert und das Staining nach Herstellerangaben ausgeführt. Im Anschluss wurde mittels FACS der Anteil BrdU-positiver Zellen gemessen. Die Anzahl proliferierender Zellen in

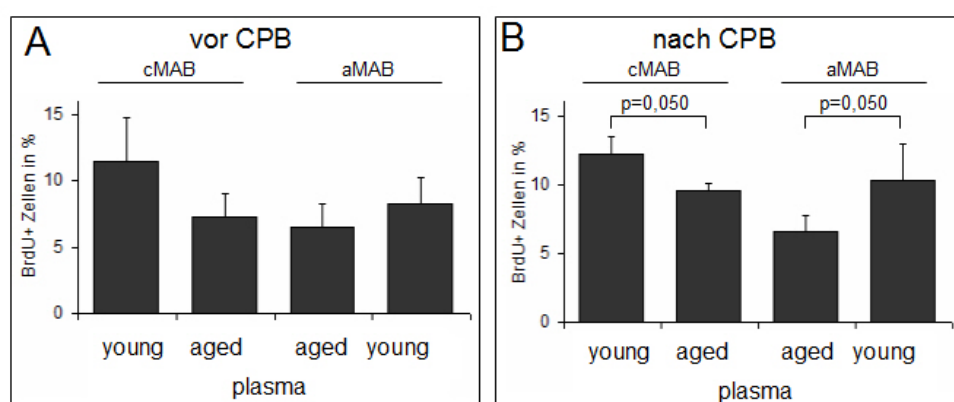


Abbildung 3.9: Proliferation von cMAB und aMAB nach drei Tagen. A: BrdU+ Zellen mit Plasma vor CPB (n=3). B: BrdU+ Zellen mit Plasma nach CPB (n=3).

der Kontrollkultur (8,1% +/-1,3, ohne Abbildung) war kohärent mit der zu Beginn gemessenen Population doubling time von 1,5-2 Tagen. Generell war die Proliferationsrate bei cMAB etwas höher als bei aMAB (p=0,083). Nach CPB war der Anteil proliferierender cMAB und aMAB in altem Plasma knapp signifikant vermindert (Abb. 3.9B), was die zuvor beschriebenen Überlebensraten teilweise erklären kann.

In einem weiteren Versuch wurde das Zellkulturmedium der MAB modifiziert. Es wurde ausschließlich Plasma nach CPB verwendet, da die Gewinnung des hierzu benötigten großen Plasmavolumens (über 20 Milliliter pro Patient) bei Kindern vor CPB nicht vertretbar war. In den bisherigen Versuchen waren in den Zellkulturen EBM + 10%FCS + 10% Testplasma benutzt worden. Wie Abbildung 3.10 zeigt, ist das Überleben der Zellen abhängig vom Anteil des zugesetzten FCS oder Plas-

ma im Zellkulturmedium (EBM + 2%, 5%, 10% oder 20%). Wurden MAB in EBM

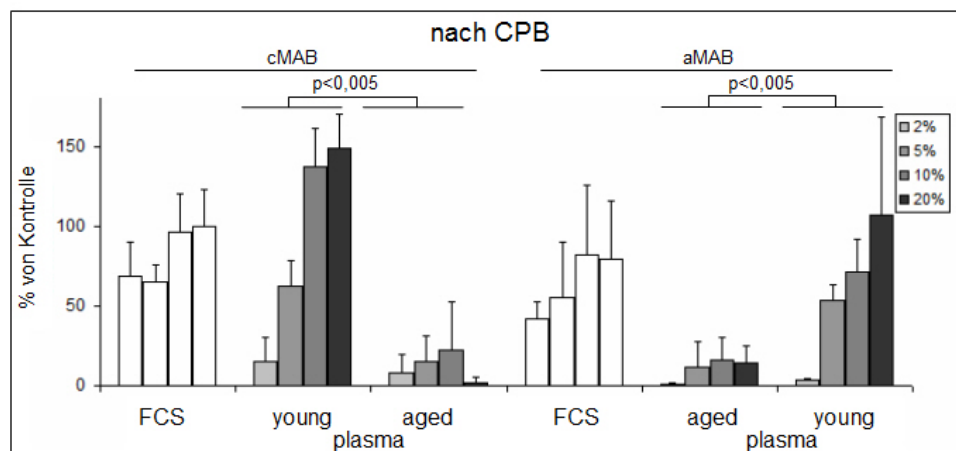


Abbildung 3.10: Dosisabhängiges Survival von cMAB und aMAB. Survival an Tag 5 mit Plasma nach CPB (n=3). Kontrolle (=100%): cMAB in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).

mit 20% Plasma (ohne FCS) kultiviert, zeigte sich eindrucksvoll, dass das Überleben von aMAB in Plasma von Kindern signifikant zunimmt, während das Überleben von cMAB in Plasma von Erwachsenen signifikant abnimmt. Dies war in den vorherigen Versuchen mit einem geringeren Anteil von Testplasma und Zusatz von FCS (Abb. 3.8B) nicht in dieser Deutlichkeit zur Abbildung gekommen.

Diese Versuche konnten in vitro nachweisen, welche Rolle die Umgebung einer Zelle für ihr Überleben haben kann: das Überleben junger Mesoangioblasten wurde in altem Plasma signifikant reduziert, während das Überleben von alten Mesoangioblasten in jungen Plasma signifikant gesteigert wurde. Nach der vorliegenden Versuchsanordnung ist dies teilweise auf unterschiedliche Proliferationsraten zurückzuführen.

3.4 Mesoangioblastennische außerhalb von Knochenmark und Herz

3.4.1 Charakterisierung des Herkunftsgewebes der MAB mittels FISH

Murine und canine Mesoangioblasten werden von anderen Arbeitsgruppen als gefäßständige Zellen beschrieben und wurden unter anderem aus Muskelbiopsien isoliert. Um das Herkunftsgewebe zirkulierender humaner Mesoangioblasten zu charakterisieren, verwendeten wir eine Gonosomenfärbung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) an MAB von gender-mismatch knochenmark- und herztransplantierten Kindern. Sind Spender und Empfänger eines Organtransplantats verschiedenen Geschlechts, lassen sich Zellabkömmlinge des Spenderorgans und des Empfängers zeitlebens durch Markierung der Geschlechtschromosomen unterscheiden. Bei zwei männlichen von 18 knochenmarktransplantierten Patienten konnten

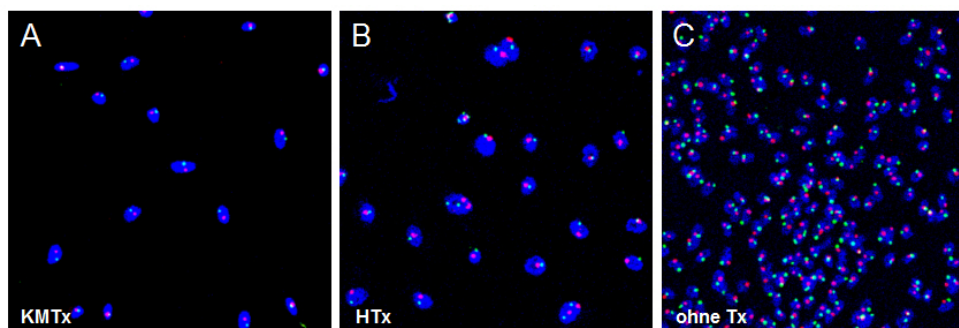


Abbildung 3.11: Gonosomenfärbung in MAB mittels FISH. blau: Zellkern, grün: X-Chromosom, rot: Y-Chromosom. A: MAB eines männlichen Patienten nach gender-mismatch Knochenmark-Tx. B: MAB eines männlichen Patienten nach gender-mismatch Herz-Tx (40fache Vergrößerung). C: MAB eines männlichen Patienten ohne gender-mismatch-Tx (Kontrolle, 10fache Vergrößerung).

MAB isoliert und jeweils eine CFU expandiert werden. In der FISH stellten sich bei MAB beider Patienten X- und Y-Chromosom dar (Abb. 3.11A). Die MAB stammten somit von einem Gewebe des Empfängers und nicht vom weiblichen Spenderknochenmark ab. Bei einem männlichen von drei herztransplantierten Patienten konn-

ten MAB gewonnen und eine CFU expandiert werden. Bei dem Patienten trugen die MAB X- und Y-Chromosom und stammten somit von einem Empfängergewebe und nicht vom weiblichen Spenderherz ab (Abb. 3.11B). Die Mesoangioblastennische befindet sich diesen Versuchen zufolge außerhalb von Knochenmark und Herz, was gut mit ihrem zuvor beschriebenen Oberflächenmarkerprofil vereinbar ist.

3.5 Endotheliale Progenitorzellen in verändertem Mikromilieu

3.5.1 Plasmatischer SDF-1 α -Anstieg nach kardiopulmonalem Bypass bei Kindern

Endotheliale Progenitorzellen (EPC) sind dem Knochenmark stammende, VEGFR2-tragende zirkulierende Progenitorzellen, die in reife Endothelzellen ausdifferenzieren und zur postnatalen Angiogenese und Vaskulogenese beitragen können. An den vergangenen 15 Jahren wurden diese Zellen intensiv beforscht und bereits zur klinischen Anwendung bei Kardiomyopathien gebracht. Verschiedene Mechanismen zu EPC-Mobilisation und Migration wurden beschrieben, so spielt insbesondere das chemotaktische Zytokin SDF-1 α (stromal cell-derived factor-1 α) eine wichtige Rolle in Mobilisation und Homing von EPC. Die Ergebnisse unserer Versuche mit den noch wenig bekannten MAB sollten nun denen eines etablierten Zelltyps gegenübergestellt werden. Die zuvor mit MAB durchgeführten Versuche zu Migration und Überleben wurden deshalb in modifizierter Form auch mit aus Buffy coats von gesunden Blutspendern gewonnenen EPC durchgeführt.

Da SDF-1 α eine wichtige Rolle in der Mobilisation von EPC spielt, bestimmten wir die absoluten plasmatischen SDF-1 α -Level bei Kindern und Erwachsenen vor und nach kardiopulmonalem Bypass (CPB). Bei Kindern, jedoch nicht bei Erwachsenen war SDF-1 α nach CPB signifikant erhöht (Abb. 3.12). In der semiquantitativen Bestimmung (Abb. 3.5) war allerdings keine relevante Veränderung des SDF-1 α aufgetreten. Ausgehend von den ELISA-Werten wäre eine verstärkte Migration von

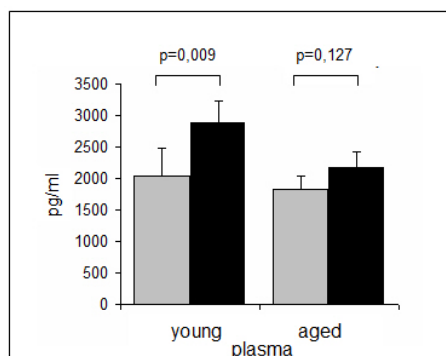


Abbildung 3.12: Absolute plasmatische SDF-1 α -Level bei Kindern und Erwachsenen, gemessen mittels ELISA. hellgrau: Plasma vor CPB, dunkelgrau: Plasma nach CPB (n=3).

EPC in Plasma von Kindern nach CPB zu erwarten.

3.5.2 Verminderte EPC-Migrationsrate in adultem Plasma und nach kardiopulmonalen Bypass

Die migratorische Aktivität von EPC wurde nach 24stündiger Inkubation in der Boyden-Kammer bestimmt. EPC migrierten in Plasma von Erwachsenen signifikant weniger als in kindlichem Plasma (Abb. 3.13). Anders als die Messung des plasmatischen SDF erwarten ließ, induzierte Plasma nach CPB keine vermehrte Migration, sondern es migrierten tendenziell weniger EPC als in Plasma vor CPB. Andere Faktoren scheinen hierbei eine höhere Relevanz als SDF-1 α zu haben.

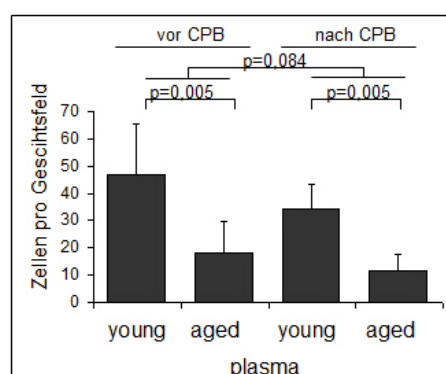


Abbildung 3.13: Migration endothelialer Progenitorzellen. Plasma von Kindern und Erwachsenen vor und nach CPB (n=6).

3.5.3 Vermindert es EPC-Überleben nach kardiopulmonalen Bypass

Das Überleben der EPC unterschied sich nach siebentägiger Inkubation (EBM + 10% FCS + 10% Testplasma) mit Plasma von Kindern und Erwachsenen vor und nach CPB nicht signifikant (Abb. 3.14).

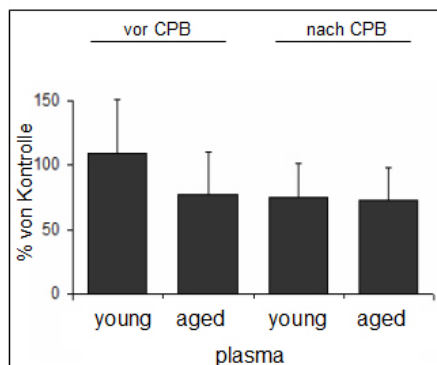


Abbildung 3.14: Überleben endothelialer Progenitorzellen. Survival an Tag 7 (n=6). Kontrolle (=100%): EPC in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).

Da bereits bei MAB durch Erhöhung des prozentualen Anteils von Testplasma im Zellkulturmedium der Einfluss des Testplasmas stärker ausgeprägt war, wurde diese Änderung der Veruchsanordnung auch bei EPC durchgeführt. EPC wurden statt mit

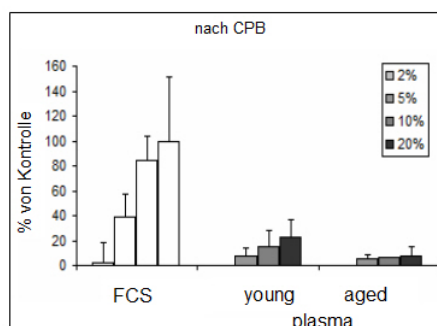


Abbildung 3.15: Dosisabhängiges Überleben endothelialer Progenitorzellen. Survival an Tag 7 (n=6). Kontrolle (=100%): EPC in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).

EBM + 10% FCS + 10% Testplasma mit EBM + 20% Testplasma inkubiert. Als Kontrolle dienten EPC im Standardmedium EBM + 20% FCS. Die Dosisabhängigkeit des Zellüberlebens vom Anteil des zugesetzten Serums (FCS) bzw. Plasmas

wurde auch hier gesehen. Während das Überleben der EPC in EBM + 10% FCS + 10% Testplasma ähnlich dem der Kontrollkultur war (Abb. 3.14), zeigte sich bei der Kultivierung von EPC mit Testplasma ohne FCS nun Plasma nach CPB ein deutlich verringertes Zellüberleben (Abb. 3.15).

Bei EPC war im Gegensatz zu MAB die Migration durch Plasma nach CPB trotz teils erhöhter SDF-1 α -Level signifikant vermindert. EPC migrierten in Plasma von jungen Spendern als in Plasma von alten Spendern, in Plasma nach CPB scheint zudem ihr Überleben eingeschränkt zu sein. Somit weisen sie nach CPB ein von MAB unterschiedliches Verhalten auf.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Alter, Gendefekte, präoperative Sauerstoffsättigung und CTEPH die Zahl und proliferative Kapazität von Mesoangioblasten beeinflussen. Nach kardiopulmonalen Bypass steigt die plasmatische HGF-Konzentration, was in vitro zur gesteigerten Migration von MAB führt. Die migratorische Kapazität von MAB nimmt im Alter ab. Vermindertes Überleben von aMAB kann durch Exposition an Plasma von Kindern verbessert werden, während Plasma von Erwachsenen das Überleben von cMAB vermindert. Dies ist teil durch erhöhte bzw. verminderte Proliferation bedingt. Migration und Überleben von EPC werden durch Plasma nach CPB signifikant eingeschränkt. Diese Ergebnisse demonstrieren die funktionelle Relevanz des Mikromilieus für Migration und Überleben von MAB und EPC.

Kapitel 4

Diskussion

Klinische Studien zur Stammzelltherapie bei Myokardinfarkt und chronischer Herzinsuffizienz zeigten moderate positive Effekte auf Herzmuskelkontraktilität und die Sicherheit der Therapie. Erwachsene kardiologische Patienten sind heute die wichtige Zielgruppe für Stammzelltherapie, aber auch die pädiatrische Kardiologie könnte von Stammzelltherapien profitieren [74]. Der Erfolg autologer Stammzelltherapie wird bislang unter anderem durch erschöpften Stammzellpool, geringes Engraftment und fehlende Differenzierung der applizierten Zellen gemindert. Auch wurde man sich in den letzten Jahren mehr und mehr bewusst, dass nicht nur altersbedingte zellintrinsische Veränderungen, sondern auch Veränderungen im Mikromilieu die regenerative Kapazität von Stammzellen beeinflussen. Diese Erkenntnis stellt ein Hindernis, aber auch eine neue Chance für den Erfolg von Stammzelltherapien dar. Humane Mesoangioblasten weisen ein hohes Proliferations- und Differenzierungspotential auf und könnten sich für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eignen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass MAB in Zahl und proliferativer Kapazität mit dem Donoralter korrelieren. Zusätzlich wird gezeigt, wie das Mikromilieu die Funktion von MAB positiv und negativ beeinflussen kann.

4.1 Stammzellnische humaner Mesoangioblasten

Die Suche nach einem geeigneten Zelltyp für Stammzelltherapie verschiedener Erkrankungen spiegelt sich in der Beschreibung einer Vielzahl neuer Stammzellentypen aus verschiedensten Geweben wider [75–81]. Bisher wurden für Stammzelltherapien kardiovaskulärer Erkrankungen meist Stammzellen des Knochenmarks herangezogen [13, 15, 82]. Eine Vielzahl hämatopoetischer und mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen ist im Knochenmarks angesiedelt. Sie sind auf Grund ihrer einfachen Gewinnung durch Blutentnahme oder Knochenmarkspunktion gut untersucht, haben jedoch nur ein begrenztes Potential zu Neovaskularisierung und Differenzierung in reife Epithelzellen und Kardiomyozyten. Koyanagi et al. haben zirkulierende mesenchymale Progenitorzellen von Kindern und Erwachsenen nach kardiopulmonalem Bypass isoliert, deren Markerprofil mit dem muriner Mesoangioblasten [24] sowie humaner von Perizyten abstammender Zellen [22] überlappt. Diese drei Zelltypen scheinen ontogenetisch in einer Reihe zu stehen. Mit Oct3/4, c-myc und Klf-1 exprimieren sie drei der vier wichtigsten Pluripotenzgene. In vitro differenzieren Mesoangioblasten in nahezu alle mesodermalen Gewebe. In vivo können sie bei Mäusen und Hunden mit Muskeldystrophie die Muskelfunktion verbessern bzw. gänzlich wiederherstellen [25, 83]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass zirkulierende humane MAB mit einem einfachen Protokoll aus peripherem Blut gewonnen werden können. Ihr Vorkommen beträgt bis zu 2 Zellen pro Milliliter Blut. Die Zellen können bei einer Verdopplungszeit von 1-2 Tagen bis zu 50 Passagen lang expandiert werden. Durch Chromosomenfärbung wurde beispielhaft gezeigt, dass zirkulierende humane Mesoangioblasten von außerhalb des Knochenmarks und des Herzens stammen. Andere Arbeitsgruppen haben Mesoangioblasten aus Gefäßen oder gefäßassoziiertem Gewebe isoliert, ebenso wurden auch kardiale Mesoangioblasten beschrieben [84]. Die genaue Lokalisation der Stammzellnische humaner Mesoangioblasten steht noch aus. Dennoch bieten zirkulierende humane Mesoangioblasten möglicherweise eine neue Quelle einfach zu gewinnender und potenter Stammzellen zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen.

4.2 Mobilisation humaner Mesoangioblasten

Operationen am offenen Herzen mit extrakorporaler Zirkulation (kardiopulmonaler Bypass (CPB)) führen zu ausgeprägten systemischen Reaktionen wie Aktivierung des Gerinnungssystems, inflammatorischer Antwort und Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen. Für die Mobilisation von Stamm- und Progenitorzellen sind systemische und lokale Zytokinfreisetzung unabdingbar. Während des kardiopulmonalen Bypasses kommt es zur komplexen Ausschüttung solcher Zytokine und die Mobilisation verschiedener Stammzellen nach CPB wurde bereits beschrieben [85, 86]. Zytokine können durch Aktivierung von Proteasen und andere Mechanismen die Freisetzung von Stammzellen aus ihren Nischen induzieren. 24 Stunden bis 7 Tage nach einem Ischämie-Ereignis kommt es durch ischämie-induzierte Zytokine zum Release von EPC [87]. Desweiteren macht man sich die stammzellmobilisierende Wirkung von G-CSF bei onkologischen Patienten und auch in der Stammzelltherapie kardiovaskulärer Erkrankungen bereits therapeutisch zu Nutze. Nach der Freisetzung aus ihrer Stammzellnische erreichen Zellen ihr Zielgewebe durch Chemotaxis (sog. Homing). Die von Galvez et al. isolierten Mesoangioblasten-ähnlichen Zellen aus Gefäßen im Skelettmuskel tragen nicht die für Rolling und Adhäsion benötigten Oberflächenmoleküle L-selectin, $\alpha 4$ -Integrin und $\alpha 2$ -Integrin. Das Fehlen von Rolling- und Adhäsionsmolekülen ist wohl dadurch zu erklären, dass es sich um im Gewebe ruhende Zellen handelt. Dementsprechend sind sie nicht fähig, in vitro spontan eine Endothelbarriere zu durchwandern. Erst nach Transfektion mit L-selectin oder $\alpha 4$ -Integrin, vorheriger Behandlung mit TNF- α oder SDF-1 oder durch einen Chemogradienten von TNF- α oder SDF-1 ist ihnen Transmigration möglich. Murine Mesoangioblasten, die mit TNF- α oder SDF-1 transfiziert oder vorbehandelt wurden, migrieren nach Injektion in die Femoralarterie effizienter in Skelettmuskel von muskeldystrophen Mäusen als unbehandelte Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass TNF- α auch in zirkulierenden humanen Mesoangioblasten Migration induziert. TNF- α und SDF-1 induzieren die Expression vieler bei Adhäsion, Rolling und Transmigration beteiligter Proteine. Erst die Expression dieser Adhäsionsmoleküle befähigt Mesoangioblasten zu (Trans)Migration. In diesem Zusammenhang

zeigten Galvez et al., dass MAdCAM-1, E- und P-Selektin in Muskelgewebe von alten Mäusen schwächer exprimiert wird als in jungen, sodass das Fehlen von Adhäsionsmolekülen im Zielgewebe das Homing regenerierender Stammzellen in alten Tieren vermindert [83]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei Kindern, aber nicht bei Erwachsenen postoperativ die plasmatische SDF-1 α -Konzentration ansteigt. Möglicherweise trägt dies zur verminderten Mobilisation und Migration von MAB bei alten Individuen bei. Neben TNF- α und SDF-1 wurde in dieser Arbeit HGF als ein weiterer wichtiger Faktor in der Mobilisation von MAB beschrieben. Hepatocyte growth factor (HGF), der zuerst aus Leberzellen extrahiert wurde, moduliert in verschiedenen Zelltypen Wachstum und Bewegung [88]. HGF spielt eine wichtige Rolle in der Embryo- und Organogenese. HGF-defiziente und c-Met (HGF-Rezeptor)-defiziente Mäuse erleiden intrauterinen Fruchttod wegen Defiziten bei Plazenta- und Leberentwicklung [89]. Im adulten Organismus vermittelt HGF Angiogenese durch Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen [90–92] und verhindert fibrotisches Remodeling bei Kardiomyopathie [93]. Nach Heparinjektion wird HGF binnen Minuten von der extrazellulären Matrix, an der es gebunden gespeichert wird, losgebunden und in die systemische Zirkulation freigesetzt [94]. Heparin wird im Körper nur in Mastzellen produziert [95] und bei deren Degranulation ausgeschüttet. In mehreren Studien wurde ein plasmatischer HGF-Anstieg nach thrombotischen Ereignissen beobachtet [91, 92]. Endogene kardiale c-kit⁺ CD45-Progenitorzellen werden durch HGF-Injektion aktiviert und fördern Regeneration an infarzierten Schweineherzen [96]. HGF fördert in c-met⁺ neuronalen Stammzellen Wachstum und Selbsterneuerung durch Aktivierung der mitogen-activated protein kinase (MAPK) [97]. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das plasmatische HGF nach kardiopulmonalem Bypass stark erhöht ist und in vitro MAB zur Migration stimuliert. Iwasaki et al. beschrieben jüngst die Expression des HGF-Rezeptors c-Met bei MAB und die Mobilisation von murinen MAB in vivo nach peritonealer HGF-Injektion [73]. Die Ursache des HGF-Peaks nach kardiopulmonalem Bypass wurde noch nicht untersucht. Ein HGF-Anstieg und die folgende MAB-Mobilisation durch das zur Antikoagulation während des Bypasses verabreichte Heparin ist denkbar. Vorläufige Untersuchungen von Koyanagi et al. beschreiben eine Abnahme der Zahl

zirkulierender MAB nach kardiopulmonalem Bypass bereits kurz nach Antagonisierung von Heparin durch Protaminapplikation. Dieser Zusammenhang sollte weiter untersucht werden um die Mechanismen der Mobilisation von MAB besser zu verstehen. Durch die mobilisierende Wirkung zusammen mit den bekannten pleiotropen Effekten eröffnet HGF einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. Dieser muss aber vor den Hintergrund der zunehmend bekannt werdenden Rolle des HGF-Rezeptors c-met in der Kanzerogenese kritisch betrachtet werden.

4.3 Abhängigkeit der Proliferation von Mesoangioblasten von Donoralter und -komorbidität

Zahlreiche Arbeiten beschreiben den Einfluss von Alter und Patientencharakteristika auf Stammzellzahl und -funktion [60]. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Zahl und proliferative Kapazität zirkulierender Mesoangioblasten invers mit dem Donoralter korrelieren. Koyanagi et al. konnten nachweisen, dass die hohe proliferative Kapazität von Mesoangioblasten assoziiert ist mit Telomerase-Aktivität bis mindestens zur 15. Passage. Den Beginn der Zellseneszenz bestimmten sie durch saure β -Galaktosidase-Staining und dedektierten in der 20. Passage 0,25% und in der 29. Passage 10% β -Galaktosidase-positive und somit seneszente Zellen. Neben dem Alter stellten sich in der vorliegenden Arbeit auch präoperative Hypoxämie und genetische Abberationen als ausschlaggebend für die proliferative Kapazität von MAB dar. Hypoxische Bedingungen induzieren intrazelluläre Signalwege, die zu Überleben und Proliferation führen: unter anderem findet eine Stabilisierung des hypoxia-inducible factor-1 α (HIF1 α) statt, der bei Normoxie schnell degradiert wird. HIF1 α induziert Expression von angiogenetischen Rezeptoren und VEGF. Im Alter wird HIF1 α während Ischämie nicht mehr ausreichend stabilisiert, wodurch die Rekrutierung von endothelialen Progenitorzellen vermindert wird [62]. Auch hämatopoetische Stammzellen sind sensibel für Änderungen des Sauerstoffangebots: im Knochenmark befinden sich ruhende HSC im sauerstoffärmsten Kompartiment,

proliferierende HSC in gut oxigenierten Bereichen [41], und in vitro lassen sie sich unter moderaten hypoxischen Bedingungen schneller expandieren als bei Normoxie [98]. Bei Mesoangioblasten nimmt mit abnehmender präoperativer Sauerstoffsättigung die PDT ab, Mesoangioblasten hypoxämischer Patienten zeigen also schnelleres Wachstum. Weitere Versuche sollten das Verhalten von MAB unter Hypox(äm)ie genauer untersuchen. Die Induktion von zellulärem Wachstum und Überleben durch Hypoxie in vitro stellt eine interessante Option zur Verbesserung der Zellfunktion vor Stammzellapplikation dar.

Die in unserem kinder-kardiologischen Kollektiv vorkommenden Gendefekte wie Trisomie 21, Cat-Eye-Syndrom, DiGeorge-Syndrom, Rubinstein-Taybi-Syndrom und TnT-Mutation gehen häufig mit kardialen Fehlbildungen einher [99–103]. In der Literatur wurden verschiedene Auswirkungen von Gendefekten auf Stammzellaktivität beschrieben. Die Veränderung des Erbguts führt zum Verlust bestimmter Zellfunktionen und begründet somit das Erscheinungsbild und assoziierte Symptome der Gendefekte: bei Trisomie 21 sind eingeschränkte Zahl und Telomerverkürzung in hämatopoietischen Progenitorzellen beschrieben, wodurch diese Kinder prädisponiert sind für leukämische Erkrankungen [104]. Bei DiGeorge-Syndrom wird das Fehlen der VEGF164-Isoform als ursächlich für die Gefäßfehlbildung angenommen [105]. Die Rolle genetischer Variationen von VEGF wird auch bei einigen Fällen von Fallot-scher Tetralogie und anderen kongenitalen kardiovaskulären Malformationen diskutiert [106]. Unsere Analyse zeigt verlangsamtes Wachstum der MAB bei Patienten mit Gendefekten. Durch welche Mechanismen dies zustande kommt und sogar klinische Relevanz hat, bleibt zu eruieren.

Endotheliale Dysfunktion spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Pulmonaler Hypertonie (PH) bei Erwachsenen. Endotheliale Progenitorzellen scheinen an diesem Prozess beteiligt zu sein: Bei idiopathischer pulmonalerarterieller Hypertonie sind Zahl und Funktion endothelialer Progenitorzellen vermindert [107]. Bei vier von uns untersuchten Kindern mit PH zeigte sich das MAB-Wachstum nicht signifikant eingeschränkt. Bei einer erwachsenen Patientin mit chronisch thrombolischer pulmonaler Hypertonie war die proliferative Kapazität der MAB jedoch massiv limitiert. Dass MAB von Kindern mit PH nicht nachweisbar affiziert sind,

kann möglicherweise durch die unterschiedliche Pathogenese und Dauer von PH im Kindes- und Erwachsenenalter erklärt werden. Ausgehend von diesem Fallbericht könnten Untersuchungen zu Mesoangioblasten bei Patienten mit Pulmonaler Hypertonie möglicherweise zum weiteren Verständnis der Krankheitsentstehung von PH beitragen.

Biomarker sind wichtige Instrumente für Diagnose und Verlauf kardialer Erkrankungen. Zwei etablierte herzspezifische Marker sind Brain Natriuretic Peptide (BNP) und Troponin T (TNT). BNP ist ein Marker für Herzinsuffizienz und wird bei Volumenbelastung der Ventrikel in diesen sezerniert. Es senkt Vor- und Nachlast des Herzens durch Natriuresis und Verminderung des peripheren Gefäßwiderstands. Bei Herzinsuffizienz korreliert die Höhe des alters- und geschlechtsadaptierten BNP [108] mit der Schwere der Herzschwäche. Nach kardiochirurgischen Eingriffen sinkt der BNP-Wert normalerweise, da die Herzfunktion operativ verbessert wird. Dennoch ist BNP perioperativ prognostisch nicht aussagekräftig und besser geeignet zur ambulanten oder stationären Überwachung [109]. TNT ist ein spezifischer Biomarker für Untergang von Kardiomyozyten. Sein Anstieg lässt sich bei Myokardschäden im Rahmen von Myokardinfarkt, Myokarditis und Herzoperationen messen. Er korreliert mit dem Ausmaß des Gewebeschadens und bei Herzoperationen mit CPB mit der Aortenabklemmzeit [110]. Ein TNT-Anstieg nach Beendigung einer Herzoperation ist prognostisch ungünstig [111]. Wie durch andere Gruppen schon beschrieben wurde, stieg auch bei unseren Patienten TNT mit zunehmender Aortenabklemmzeit an. TNT und BNP korrelierten jedoch nicht mit der Zahl und proliferativen Kapazität von MAB.

Bei den hier untersuchten erwachsenen Patienten konnte eine altersabhängige Abnahme von Zahl und proliferativer Kapazität von MAB nachgewiesen werden. Alter und weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren erschöpfen den Pool endothelialer Progenitorzellen [55, 112] und auch die Zahl anderer Stammzellen nimmt mit der Schwere der Erkrankung ab [113]. Bei den hier untersuchten MAB war die Zahl der erkrankten Koronarien und Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren nicht von signifikantem Einfluss. Es wurden jedoch nur Patienten mit ausgeprägter, operationspflichtiger koronarer Herzerkrankung untersucht. Möglicherweise kann in weiteren Untersu-

chungen mit gesunden und leichter erkrankten Personen ein krankheitsassoziierter Funktionsverlust auch bei MAB festgestellt werden.

4.4 Bedeutung des Mikromilieus für Mesoangioblasten

Die verminderte regenerative Kapazität von alternden Geweben wurde ausführlich beschrieben [31]. Sie kann die Effektivität von Stammzelltherapie gefährden [56,114]. Dysregulation im Mikromilieu der Stammzellnische und des Zielgewebes von Progenitorzellen sind ebenso entscheidend für ihre eingeschränkte Zahl und Funktion wie weniger effektive Reperaturmechanismen bei fortschreitendem Alter [60]. Altersbedingte Dysregulation der Stammzellfunktion kann jedoch teilweise durch externe Stimuli wie Zytokingabe [54] oder Exposition an eine junge Umgebung [64] aufgehoben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde *in vitro* der Einfluss junger Umgebung auf gealterte Mesoangioblasten untersucht. MAB alter Patienten (aMAB) waren vermindert in Anzahl, proliferativer Kapazität und migratorischer Aktivität. Während die Migration von cMAB (child-derived mesoangioblast) durch Plasma nach CPB stark angeregt wurde, reagierten aMAB nicht auf diesen Stimulus. Möglicherweise liegt dem eine Downregulation des HGF-Rezeptors c-Met oder nachfolgender Signalwege zu Grunde. Neben migratorischer Kapazität wurde auch Überleben und Proliferation von MAB in junger und alter Umgebung untersucht. Wurden aMAB mit jungen Plasma nach CPB kultiviert, verbesserte sich ihr Überleben signifikant. Im Gegenzug verminderte eine alte Umgebung signifikant das Überleben von cMAB. Die von Conboy et al. beschriebene Verjüngung von alten Zellen durch Einwirkung einer jungen systemischen Umgebung *in vivo* [64] konnte somit bei Mesoangioblasten *in vitro* gezeigt werden. Welche molekularen Mechanismen hinter diesen Ergebnissen stehen, bleibt noch zu beforschen. Hier konnte eine leicht erhöhte Proliferationsrate in jungem Plasma gemessen werden.

Durch weitere Analysen von plasmatischen Wachstumsfaktoren und Expression von Oberflächenmarkern bei Kindern und Erwachsenen könnten sicherlich Hinweise auf

entscheidende Signalmoleküle bei der Zellalterung und -verjüngung von MAB gefunden werden.

4.5 Bedeutung des Mikromilieus für Endotheliale Progenitorzellen

Unter adulten Stamm- und Progenitorzellen stehen EPC wegen ihrer Schlüsselrolle in endothelialer Regeneration und ihrer erfolgreichen Anwendung in der Stammzelltherapie bei kardiovaskulären Erkrankungen im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Zahl und Funktion zirkulierender EPC korrelieren mit kardiovaskulären Risikofaktoren [55, 112]. Bei der Mobilisierung von EPC sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. In der Stammzellnische der EPC im Knochenmark sezernieren Stromazellen SDF-1. EPC sind über den SDF-1-Rezeptor CXCR4 an diese Stromazellen gekoppelt. Bei einem plasmatischen SDF-1-Anstieg induziert SDF-1 direkt das proteolytische Enzym Matrixmetalloprotease-9 (MMP-9), welches durch Spaltung von SDF die Kopplung von Stamm- und Stromazellen auflöst und dadurch Stammzellen mobilisiert. Stammzellmobilisation kann therapeutisch durch G-CSF-Injektionen ausgelöst werden, wobei G-CSF SDF-1-Freisetzung induziert und dies durch die beschriebene Signalkaskade zur Mobilisation führt. VEGF und HGF wird ebenfalls eine Rolle in Migration und Proliferation von EPC zugesprochen [4, 90], zudem korreliert die Mobilisation von EPC nach CPB mit Alter sowie mit plasmatischer VEGF- [85] und G-CSF-Konzentration [86]. EPC aus dem Knochenmark junger Mäuse können die beeinträchtigte Angiogenese in alten Tieren kompensieren [63]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Plasma von Kindern EPC-Migration stärker induziert als Plasma von Erwachsenen. Das Überleben von EPC in jungem und altem Plasma unterschied sich jedoch nicht signifikant. Hierbei ist anzumerken, dass EPC von gesunden Spendern zwischen 18 und 65 Jahren verwendet wurden. Bei diesen EPC sind erst wenige funktionelle Einschränkungen zu erwarten. EPC von alten Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren zeigen deutliche funktionelle Defizite. Möglicherweise hat junge Umgebung einen ausgeprägteren verjüngenden

Einfluss auf diese Zellen, die schon einen großen Teil ihrer Funktion verloren haben. Klinische Studien, die Mobilisation und Rekrutierung von EPC in Stresssituationen beschreiben, hatten gesteigerte Migration und Überleben durch Exposition von EPC an Plasma nach CPB erwarten lassen. 24 Stunden bis 7 Tage nach einem Ischämie-Ereignis kommt es zur Freisetzung von EPC durch ischämie-induzierte Zytokine [87]. In der vorliegenden Arbeit wurden EPC durch Plasma nach CPB *in vitro* trotz erhöhtem SDF1 α und HGF nicht zur Migration stimuliert. Auch wurde eine signifikante Abnahme des Zellüberlebens in Plasma nach CPB beobachtet. Möglicherweise führen ischämie-induzierte Zytokine im Knochenmark zur vermehrten Freisetzung von EPC aus der Stammzellnische, während gleichzeitig systemische inflammatorische Zytokine, die durch kardiopulmonalem Bypass entstehen, die Zellfunktion vermindern. So zeigen verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien, dass Inflammation über verschiedene Mechanismen zu dysfunktionalen EPC führen kann [115].

Das Verhalten von EPC und MAB in jungem und altem Plasma sowie vor und nach kardiopulmonalem Bypass unterscheidet sich nachweislich deutlich. MAB erfahren in jungem Plasma und nach CPB einen Funktionszuwachs, der bei EPC nicht zu verzeichnen ist. Welche Signalwege dies bedingen und ob man therapeutischen Nutzen aus dieser Eigenschaft ziehen vermag, ist noch offen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Mesoangioblasten sind kürzlich entdeckte mesodermale Stammzellen mit hohem Potential zu Teilung und Differenzierung. Sie tragen frühe hämatopoetische Oberflächenantigene, Rezeptoren und Signalmoleküle der mesodermalen Induktion, sowie endotheliale Marker. Zirkulierende humane Mesoangioblasten bieten möglicherweise eine neue Quelle einfach zu gewinnender und potenter Stammzellen zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen. Diese Arbeit untersuchte die (i) Stammzellnische und Mobilisation von Mesoangioblasten, (ii) Anzahl und Funktion von Mesoangioblasten bei Kindern und Erwachsenen und (iii) Verbesserung der Funktion von Mesoangioblasten durch Veränderung des Mikromilieus.

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass zirkulierende Mesoangioblasten seltene Zellen sind, die vermehrt bei Kindern und nach kardiopulmonalem Bypass auftreten. Sie stammen diesen Versuchen zufolge von außerhalb des Knochenmarks und des Herzens. Mesoangioblasten werden *in vitro* durch Plasma nach kardiopulmonalem Bypass zu Migration und Überleben angeregt. HGF wurde als wichtiger Faktor bei der Mobilisation und Migration von Mesoangioblasten beschrieben.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten folgende Risikofaktoren für eingeschränkte Zahl und proliferative Kapazität von Mesoangioblasten ausgemacht werden: Alter, Gendefekte mit Assoziation zu konnatalen Herzvitien, und chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (Fallbericht). Präoperative Hypoxämie führte hingegen zu einem schnelleren Zellwachstum *in vitro*. Zudem zeigten Versuche *in vitro* den Ein-

fluss des Mikromilieus auf Zellüberleben: das Überleben junger Mesoangioblasten (cMAB) wurde in altem Plasma signifikant reduziert, während das Überleben von alten Mesoangioblasten (aMAB) in jungen Plasma signifikant gesteigert wurde. Die migratorische Aktivität von cMAB konnte durch externe Stimuli weiter gesteigert werden konnte, jedoch war die migratorische Aktivität von aMAB signifikant vermindert und wurde durch eine junge Umgebung oder externe Stimuli nur tendenziell verbessert.

Im dritten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass bei Endothelialen Progenitorzellen im Gegensatz zu Mesoangioblasten durch Plasma nach kardiopulmonalem Bypass sowohl Migration als auch Survival signifikant vermindert werden. Hierbei spielt es keine Rolle, ob Plasma von jungen oder alten Donoren verwendet wurde.

Zusammenfassend demonstriert die vorliegende Arbeit (i) HGF als möglichen mobilisierenden Faktor der außerhalb von Knochenmark und Herz residierenden Mesoangioblasten, (ii) dass Anzahl und Funktion zirkulierender Mesoangioblasten von Donoralter und -komorbidität abhängen, sowie (iii) die funktionelle Relevanz des Mikromilieus für Migration und Überleben von Mesoangioblasten und Endothelialen Progenitorzellen. Die Identifikation von Faktoren, die endogene Progenitorzellen mobilisieren, bietet neue therapeutische Möglichkeiten die Reparaturmechanismen in erkranktem und gealtertem Gewebe zu verbessern. Desweiteren könnte die Vorbehandlung von Zellen mit mRNA, Wachstumsfaktoren oder anderen Substanzen sowie die Optimierung des zellulären Mikromilieus einen sinnvollen Ansatz zur Verbesserung der Stammzelltherapie bei kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. Weitere Untersuchungen zum Verständnis dieser Prozesse können den Weg zur Optimierung von Stammzelltherapie oder zur zellfreien Therapie ebnen.

Mesoangioblasts are recently discovered mesodermal stem cells with high proliferation and differentiation capacity. They possess early haematopoietic surface markers, receptors and signalling molecules of mesodermal induction as well as endothelial markers. Circulating human mesoangioblasts possibly offer a new source of easy accessible and potent stem cells for therapy of cardiovascular diseases. In this study, we investigated (i) stem cell niche and mobilisation of mesoangioblasts, (ii) number and function of child- and adult-derived mesoangioblasts and (iii) improvement of mesoangioblast function by changing microenvironment.

In the first part of the study it was shown that circulating mesoangioblasts are rare cells with increased occurrence in children and after cardiopulmonary bypass. According to this study, they are neither derived from bone marrow nor from heart. In vitro mesoangioblast migration and survival is stimulated by plasma obtained after cardiopulmonary bypass. HGF was found to be an important factor in mobilisation and migration of mesoangioblasts.

In the second part of the study the following risk factors were found to be associated with reduced number and proliferative capacity of mesoangioblasts: age, genetic defects associated with congenital cardiac malformation, and chronic thromboembolic pulmonary hypertension (case report). However, preoperative hypoxaemia led to increased cell survival in vitro. Furthermore, the influence of microenvironment was shown in vitro: survival of young mesoangioblasts (cMAB) was significantly reduced

in aged plasma, whereas survival of aged mesoangioblasts (aMAB) was significantly improved in young plasma. The migratory activity of cMAB could be significantly improved by exposure to external stimuli, but migratory activity of aMAB was significantly reduced and could hardly be improved by exposure to a young environment or external stimuli.

In the third part of the study we showed that in contrast to the findings in mesoangioblasts, migration as well as survival of endothelial progenitor cells was significantly reduced in plasma obtained after cardiopulmonary bypass, no matter if plasma from young or old donors was used.

In sum, this study demonstrates (i) HGF as a possibly factor mobilising mesoangioblasts from their niche outside of bone marrow and heart, (ii) that number and function of circulating mesoangioblasts depend from donor age and comorbidity, and (iii) the influence of microenvironment on migration and survival of mesoangioblasts and endothelial progenitor cells. The identification of factors that mobilize endogenous progenitor cells offer new therapeutic possibilities to improve repair mechanisms in diseased and aged tissues. The pretreatment of cells with mRNA, growth factors or other substances, as well as optimising of cellular microenvironment could provide a new approach to improve stem cell therapy in cardiovascular diseases. Further investigations concerning these processes could give way to improve stem cell therapy or even cell free therapy.

Appendices

Abkürzungsverzeichnis

aMAB	adult-derived Mesoangioblast
APC	Allophycocyanin
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BrdU	Bromodeoxyuridin
CEP	Chromosome Enumeration Probes
cMAB	child-derived Mesoangioblast
CO ₂	Kohlendioxid
CPB	kardiopulmonaler Bypass (engl. cardiopulmonary bypass)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DNA	Deoxyribonucleic acid
EBM	Endothelzell Basal Medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EPC	endotheliale Progenitorzelle
et al.	und andere
Fa	Firma
FACS	Fluorecence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	9,81 m · s ⁻²
HLM	Herz-Lungen-Maschine
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

Appendices

MAB	Mesoangioblast
mM	Millimolar
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40 (Octylphenoxypolyethoxyethanol)
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate Buffered Saline
rhHGF	recombinant human hepatocyte growth factor
rhTGF	recombinant human transforming growth factor
SDF-1α	stromal cell-derived factor 1α
SSC	Standard Saline Citrate
TNT	Troponin T
Tx	Transplantation
U	Unit
v/v	volume to volume
v/w	volume to weight
w/o	without

Abbildungsverzeichnis

1.1	Abstammung von Mesoangioblasten. (Abbildung Cossu et al. 2003 [24]) . . .	5
1.2	Einflüsse auf Zellseneszenz. (Abbildung Ballard et al. [32])	7
1.3	Durch oxidativen Stress aktivierte Signalkaskaden. (Abbildung Finkel et al. [45])	12
1.4	Einwirkung einer jungen systemischen Umgebung verjüngt alte Satellitenzellen. A: aktivierte murine Satellitenzellen nach 24-stündiger Kultur mit altem oder jungem Serum in vitro. B: Satellitenzellen nach fünftägiger heterochromer Parabiose. (Abbildung Conboy et al. [64])	14
2.1	Modifizierte Boyden-Kammer. A: Schematische Darstellung einer Transwell-Kammer. B: Membran einer Transwell-Kammer mit DAPI-gefärbten Zellen im Fluoreszenzmikroskop, 10x Vergrößerung	26
2.2	Analogie der Molekülstruktur von BrdU und Thymidin. A: Bromodeoxyuridin (BrdU). B: Thymidin. Die Moleküle unterscheiden sich nur durch Methyl- bzw. Bromgruppe am Phenol-Ring.	28
2.3	Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). (Abbildung RayBio® Human SDF-1alpha ELISA Kit Manual [70])	29
2.4	Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten. (Abbildung Klein et al. [72])	31
3.1	Mesoangioblasten in vitro. A: MAB-Kolonie an Tag 10, am Bildrand vereinzelt EPC (10fache Vergrößerung). B: Mesoangioblasten, 1. Passage, Tag 15. . . .	34
3.2	Zahl zirkulierender MAB. Kinder vor CPB (n=20) und nach CPB (n=60), Erwachsene vor OP (n=7), Erwachsene nach OP (n=12), Buffycoats (n=15). . .	36

3.3	Proliferative Kapazität cMAB (child-derived mesoangioblasts) und aMAB (adult-derived mesoangioblasts). A: Population Doubling (n=12). gelb: Alter < 1 Monat, orange: < 1 Jahr, rot: < 6 Jahre, grün: < 18 Jahre, blau: > 18 Jahre. B: Population Doubling Time in Abhängigkeit vom Donoralter (n=68).	37
3.4	Einfluss von Patientencharakteristika auf PDT. A: Präoperative Sauerstoffsättigung. B: Gendefekte (n=60).	38
3.5	Zytokinlevel im Blutplasma vor und nach kardiopulmonalen Bypass. A: Cytokine Array Membran. HGF grün eingerahmt. B: semiquantitative Auswertung; hellgrau: vor OP; dunkelgrau: nach OP (n=4). Mit freudlicher Genehmigung von M. Iwasaki aus [73].	40
3.6	Migration von cMAB in vitro nach 4h. A: Plasma vor und nach CPB (n=6). B: HGF und TNF α (n=3). PBS: Phosphate Buffered Saline, EBM: Endothelial Basal Medium.	41
3.7	Migratorische Aktivität von cMAB und aMAB nach 4h. A: Plasma vor CPB (n=6). B: Plasma nach CPB (n=6).	42
3.8	Überleben von cMAB und aMAB. A: Überleben nach fünf Tagen mit Plasma vor CPB (n=6). B: Überleben mit Plasma nach CPB (n=6). Kontrolle (=100%): cMAB in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).	43
3.9	Proliferation von cMAB und aMAB nach drei Tagen. A: BrdU+ Zellen mit Plasma vor CPB (n=3). B: BrdU+ Zellen mit Plasma nach CPB (n=3).	44
3.10	Dosisabhängiges Survival von cMAB und aMAB. Survival an Tag 5 mit Plasma nach CPB (n=3). Kontrolle (=100%): cMAB in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).	45
3.11	Gonosomenfärbung in MAB mittels FISH. blau: Zellkern, grün: X-Chromosom, rot: Y-Chromosom. A: MAB eines männlichen Patienten nach gender-mismatch Knochenmark-Tx. B: MAB eines männlichen Patienten nach gender-mismatch Herz-Tx (40fache Vergrößerung). C: MAB eines männlichen Patienten ohne gender-mismatch-Tx (Kontrolle, 10fache Vergrößerung).	46
3.12	Absolute plasmatische SDF-1 α -Level bei Kindern und Erwachsenen, gemessen mittels ELISA. hellgrau: Plasma vor CPB, dunkelgrau: Plasma nach CPB (n=3).	48

3.13 Migration endothelialer Progenitorzellen. Plasma von Kindern und Erwachsenen vor und nach CPB (n=6).	48
3.14 Überleben endothelialer Progenitorzellen. Survival an Tag 7 (n=6). Kontrolle (=100%): EPC in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).	49
3.15 Dosisabhängiges Überleben endothelialer Progenitorzellen. Survival an Tag 7 (n=6). Kontrolle (=100%): EPC in Standard-Medium (EBM + 20% FCS).	49

Literaturverzeichnis

- [1] M.J. Evans and M.H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–6, Jul 1981.
- [2] A.M. Wobus, H. Holzhausen, P. Jäkel, and J. Schöneich. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res*, 152(1):212–9, May 1984.
- [3] J. Nichols, E.P. Evans, and A.G. Smith. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (es) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*, 110(4):1341–8, Dec 1990.
- [4] S. Dimmeler; A.M. Zeiher. *Stammzelltherapie in der Kardiologie - Stand und Perspektiven*. UNI-MED Verlag Bremen, 1. edition, 2005. ISBN 3-89599-800-1.
- [5] K. Takahashi and S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663–76, Aug 2006.
- [6] T. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5):861–72, Nov 2007.
- [7] J. Yu, K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, I.I. Slukvin, and J.A. Thomson. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324(5928):797–801, Mar 2009.
- [8] H. Zhou, S. Wu, J.Y. Joo, S. Zhu, D.W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H.R. Schöler, L. Duan, and S. Ding. Generation

- of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4(5):381–4, Apr 2009.
- [9] J.P. Lewis and F.E.Jr. Trobaugh. Haematopoietic stem cells. *Nature*, 204:589–90, Nov 1964.
- [10] T. Asahara, T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenzichler, G. Schatteman, and J.M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–7, Feb 1997.
- [11] A.P. Beltrami, L. Barlucchi, D. Torella, M. Baker, F. Limana, S. Chimenti, H. Kasahara, M. Rota, E. Musso, K. Urbanek, A. Leri, J. Kajstura, B. Nadal-Ginard, and P. Anversa. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114(6):763–76, Sep 2003.
- [12] A. Leri, J. Kajstura, and P. Anversa. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*, 85(4):1373–416, Oct 2005.
- [13] H. Ince, M. Petzsch, H.D. Kleine, H. Eckard, T. Rehders, D. Burska, S. Kische, M. Freund, and C.A. Nienaber. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (firstline-ami) trial. *Circulation*, 112(9 Suppl):I73–80, Aug 2005.
- [14] S. Rupp, J. Bauer, T. Tonn, V. Schächinger, S. Dimmeler, A.M. Zeiher, and D. Schranz. Intracoronary administration of autologous bone marrow-derived progenitor cells in a critically ill two-yr-old child with dilated cardiomyopathy. *Pediatr Transplant*, Epub ahead of print, Nov 2008.
- [15] B. Assmus, V. Schächinger, C. Teupe, M. Britten, R. Lehmann, N. Döbert, F. Grünwald, A. Aicher, C. Urbich, H. Martin, D. Hoelzer, S. Dimmeler, and A.M. Zeiher. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (topcare-ami). *Circulation*, 106(24):3009–17, Dec 2002.

- [16] K. Wollert, G. Meyer, J. Lotz, S. Ringes-Lichtenberg, P. Lippolt, C. Breidenbach, S. Fichtner, T. Korte, B. Hornig, and D. Messinger. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the boost randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 10-16;364(9429):141–8, Jul 2004.
- [17] M. Yousef, C.M. Schannwell, M. Köstering, T. Zeus, M. Brehm, and B.E. Strauer. The balance study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.*, 16;53(24):2262–9, Jun 2009.
- [18] T. Ziebart, C.-H. Yoon, T. Trepels, A. Wietelmann, T. Braun, F. Kiessling, S. Stein, M. Grez, C. Ihling, M. Muhly-Reinholz, G. Carmona, C. Urbich, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Sustained persistence of transplanted proangiogenic cells contributes to neovascularization and cardiac function after ischemia. *Circ Res*, 103(11):1327–34, Nov 2008.
- [19] H.J. Cho, N. Lee, J.Y. Lee, Y.J. Choi, M. Ii, A. Wecker, J.O. Jeong, C. Curry, G. Qin, and Y.S. Yoon. Role of host tissues for sustained humoral effects after endothelial progenitor cell transplantation into the ischemic heart. *J Exp Med*, 204(13):3257–69, Dec 2007.
- [20] S. Rupp, M. Koyanagi, M. Iwasaki, F. Diehl, P. Bushoven, D. Schranz, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Genetic proof-of-concept for cardiac gene expression in human circulating blood-derived progenitor cells. *J Am Coll Cardiol*, 51(23):2289–90, Jun 2008.
- [21] A.J. Wagers and I.L. Weissman. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, 116(5):639–48, Mar 2004.
- [22] A. Dellavalle, M. Sampaolesi, R. Tonlorenzi, E. Tagliafico, B. Sacchetti, L. Perani, A. Innocenzi, B.G. Galvez, G. Messina, R. Morosetti, S. Li, M. Belicchi, G. Peretti, J.S. Chamberlain, W.E. Wright, Y. Torrente, S. Ferrari, P. Bianco, and G. Cossu. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, 9(3):255–67, Mar 2007.

- [23] M.G. Minasi, M. Riminucci, L. De Angelis, U. Borello, B. Berarducci, A. Innocenzi, A. Caprioli, D. Sirabella, M. Baiocchi, R. De Maria, R. Boratto, T. Jaffredo, V. Broccoli, P. Bianco, and G. Cossu. The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 129(11):2773–83, Jun 2002.
- [24] G. Cossu and P. Bianco. Mesoangioblasts — vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues. *Curr Opin Genet Dev*, 13(5):537–42, Oct 2003.
- [25] M. Sampaolesi, Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D’Antona, M.A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin and M.G.C. De Angelis, K.P. Campbell, R. Bottinelli, and G. Cossu. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science*, 301:487–92, Jul 2003.
- [26] M. Koyanagi, M. Iwasaki, S. Rupp, F.S. Tedesco, C.-H. Yoon, J.-N. Boeckel, J. Trauth, C. Schütz, K. Ohtani, R. Goetz, K. Iekushi, P. Bushoven, S. Momma, C. Mummery, R. Passier, R. Henschler, H. Akintuerk, D. Schranz, C. Urbich, B.G. Galvez, G. Cossu, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Sox2 transduction enhances cardiovascular repair capacity of blood-derived mesoangioblasts. *Circulation Research*, 106(7):1290–302, Apr 2010.
- [27] T. Finkel. Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(12):971–6, Dec 2005.
- [28] S.J. Morrison, A.M. Wandycz, K. Akashi, A. Globerson, and I.L. Weissman. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 2(9):1011–6, Sep 1996.
- [29] V.D. Roobrouck, F. Ulloa-Montoya, and C.M. Verfaillie. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*, 314(9):1937–44, Jun 2008.
- [30] M.J. Reed, N. Karres, D. Eyman, and J.M. Edelberg. Endothelial precursor cells. *Stem Cell Rev*, 3:218–22, May 2007.

- [31] A. Rivard, J.E. Fabre, M. Silver, D. Chen, T. Murohara, M. Kearney, M. Maigner, T. Asahara, and J.M. Isner. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, 99(1):111–20, Jan 1999.
- [32] V.L.T. Ballard and J.M. Edelberg. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circ Res*, 100:1116–1127, Apr 2007.
- [33] D.J. Rossi, C.H.M. Jamieson, and I. L. Weissman. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*, 132(4):681–96, Feb 2008.
- [34] R.C. Allsopp, S. Cheshier, and I.L. Weissman. Telomerase activation and rejuvenation of telomere length in stimulated t cells derived from serially transplanted hematopoietic stem cells. *J Exp Med*, 196(11):1427–33, Dec 2002.
- [35] Y. Nakagami, M. Ito, T. Hara, and T. Inoue. Loss of trf2 by radiation-induced apoptosis in hl60 cells. *Radiat Med*, 20(3):121–9, May-Jun 2002.
- [36] M.A. Blasco. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6(8):611–22, Aug 2005.
- [37] T. Finkel, M. Serrano, and M.A. Blasco. The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155):767–74, Aug 2007.
- [38] I. Spyridopoulos, Y. Erben, T.H. Brummendorf, J. Haendeler, K. Dietz, F. Seeger, C.K. Kissel, H. Martin, J. Hoffmann, B. Assmus, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Telomere gap between granulocytes and lymphocytes is a determinant for hematopoietic progenitor cell impairment in patients with previous myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(5):968–74, May 2008.
- [39] P. van der Harst, G. van der Steege, R.A. de Boer, A.A. Voors, A.S. Hall, M.J. Mulder, W.H. van Gilst, D.J. van Veldhuisen, and MERIT-HF Study Group. Telomere length of circulating leukocytes is decreased in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 49(13):1459–64, Apr 2007.
- [40] D. Harman. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3):298–300, Jul 1956.

- [41] K. Parmar, P. Mauch, J.-A. Vergilio, R. Sackstein, and J.D. Down. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(13):5431–6, Mar 2007.
- [42] T. He, T.E. Peterson, E.L. Holmuhamedov, A. Terzic, N.M. Caplice, L.W. Oberley, and Z.S. Katusic. Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(11):2021–7, Nov 2004.
- [43] E. Dernbach, C. Urbich, R.P. Brandes, W.K. Hofmann, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood*, 104(12):3591–7, Dec 2004.
- [44] T. Lu and T. Finkel. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*, 314(9):1918–22, Jun 2008.
- [45] T. Finkel and N.J. Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809):239–47, Nov 2000.
- [46] S.M. Schieke and T. Finkel. Mitochondrial signaling, tor, and life span. *Biol Chem*, 387:1357–61, Oct-Nov 2006.
- [47] M.A. Kiebish, X. Han, H. Cheng, J.H. Chuang, and T.N. Seyfried. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the warburg theory of cancer. *J Lipid Res*, 49(12):2545–56, Dec 2008.
- [48] E.R. Stadtman. Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074):1220–4, Aug 1992.
- [49] J.W. Zmijewski, A. Landar, N. Watanabe and D.A. Dickinson, N. Noguchi, and V.M. Darley-Usmar. Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6):1385–9, Dec 2005.

- [50] N. Inoue, K. Hirata, M. Yamada, Y. Hamamori, Y. Matsuda, H. Akita, and M. Yokoyama. Lysophosphatidylcholine inhibits bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and calcium transients in cultured bovine aortic endothelial cells. *Circ Res*, 71(6):1410–21, Dec 1992.
- [51] S. Kawashima and M. Yokoyama. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(6):998–1005, Jun 2004.
- [52] J. Hoffmann, J. Haendeler, A. Aicher, L. Rössig, M. Vasa, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*, 89(8):709–15, Oct 2001.
- [53] P.W. Shaul. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol*, 64:749–74, 2002.
- [54] W.T. Arthur, R.B. Vernon, E.H. Sage, and M.J. Reed. Growth factors reverse the impaired sprouting of microvessels from aged mice. *Microvasc Res*, 55(3):260–70, May 1998.
- [55] M. Vasa, S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*, 89(1):1–7, Jul 2001.
- [56] S. Dimmeler and A. Leri. Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy. *Circ Res*, 102(11):1319–30, Jun 2008.
- [57] M. Vasa, S. Fichtlscherer, K. Adler, A. Aicher, H. Martin, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation*, 103(24):2885–90, Jun 2001.
- [58] A. Skaletz-Rorowskia, M. Lutchmana, Y. Kureishia, D.J. Leferd, J.R. Fauste, and K. Walsh. Hmg-coa reductase inhibitors promote cholesterol-dependent

- akt/pkb translocation to membrane domains in endothelial cells. *Cardiovasc Res*, 57(1):253–64, Jan 2003.
- [59] B.D. Manning and L.C. Cantley. Akt/pkb signaling: navigating downstream. *Cell*, 129(7):1261–74, Jun 2007.
- [60] J.M. Edelberg and V.L.T. Ballard. Stem cell review series: regulating highly potent stem cells in aging: environmental influences on plasticity. *Aging Cell*, 7(4):599–604, Aug 2008.
- [61] V.L.T. Ballard and J.M. Edelberg. Stem cells for cardiovascular repair — the challenges of the aging heart. *J Mol Cell Cardiol*, 45(4):582–92, Oct 2008.
- [62] E.I. Chang, S.A. Loh, D.J. Ceradini, E.I. Chang, S. Lin, N. Bastidas, S. Aarabi, D.A. Chan, M.L. Freedman, A.J. Giaccia, and G.C. Gurtner. Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia. *Circulation*, 116(24):2818–29, Dec 2007.
- [63] J.M. Edelberg, L. Tang, K. Hattori, D. Lyden, and S. Rafii. Young adult bone marrow-derived endothelial precursor cells restore aging-impaired cardiac angiogenic function. *Circ Res*, 90(10):89–93, May 2002.
- [64] I.M. Conboy, M.J. Conboy, A.J. Wagers, E.R. Girma, I.L. Weissman, and T.A. Rando. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433(7027):760–4, Feb 2005.
- [65] R.D. Ross, R.O. Bollinger, and W.W. Pinsky. Grading the severity of congestive heart failure in infants. *Pediatr Cardiol*, 13(2):72–5, Apr 1992.
- [66] S.A. Hunt. Acc/aha 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines (writing committee to update the 2001 guidelines for the evaluation and management of heart failure). *J Am Coll Cardiol*, 46:e1–e82, 2005.

- [67] C.-C. Liang, A.Y. Park, and J.-L. Guan. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*, 2(2):329–33, 2007.
- [68] S. Boyden. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med*, 115:453–66, Mar 1962.
- [69] E. Engvall and P. Perlmann. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8(9):871–4, Sep 1971.
- [70] *RayBio® Human SDF-1alpha ELISA Kit Manual*.
- [71] J.G. Gall and M.L. Pardue. Formation and detection of rna-dna hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 63(2):378–83, Mar 1969.
- [72] H.G. Klein and D. Rost. *Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosomenpräparaten*. Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Martinsried.
- [73] M. Iwasaki, M. Koyanagi, H. Kossmann, N. Monsefi, S. Rupp, J. Trauth, P. Paulus, R. Goetz, S. Momma, M. Tjwa, K. Ohtani, R. Henschler, D. Schranz, G. Cossu, K. Zacharowski, S. Martens, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. Hepatocyte growth factor mobilizes non-bone marrow-derived circulating mesoangioblasts. *Eur Heart J.*, 32(5):627–36, Mar 2011.
- [74] F. Pillekamp, M. Reppel, K. Brockmeier, and J. Hescheler. Stem cells and their potential relevance to paediatric cardiology. *Cardiol Young*, 16(2):117–24, Apr 2006.
- [75] Y. Jiang, B.N. Jahagirdar, R.L. Reinhardt, R.E. Schwartz, C.D. Keenek, X.R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W.C. Lowk, D.A. Largaespada, and C.M. Verfaillie. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893):41–9, Jul 2002.

- [76] Y. Jiang, B. Vaessen, T. Lenvik, M. Blackstad, M. Reyes, and C.M. Verfaillie. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol*, 30(8):896–904, Aug 2002.
- [77] M. Reyes, T. Lund, T. Lenvik, D. Aguiar, L. Koodie, and C.M. Verfaillie. –retraction– purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9):2615–25, Nov 2001.
- [78] N. Hida, N. Nishiyama, S. Miyoshi, S. Kira, K. Segawa, T. Uyama, T. Mori, K. Miyado, Y. Ikegami, C.H. Cui, T. Kiyono, S. Kyo, T. Shimizu, T. Okano, M. Sakamoto, S. Ogawa, and A. Umezawa. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 26(7):1695–704, Jul 2008.
- [79] S. Ohnishi and N. Nagaya. Prepare cells to repair the heart: mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Am J Nephrol*, 27(3):301–7, 2007.
- [80] E. Messina, L. De Angelis, G. Frati, S. Morrone, S. Chimenti, F. Fiordaliso, M. Salio, M. Battaglia, M.V.G. Latronico, M. Coletta, E. Vivarelli, L. Frati, G. Cossu, and A. Giacomello. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 95(9):911–21, Oct 2004.
- [81] P. Anversa, J. Kajstura, and A. Leri. If i can stop one heart from breaking. *Circulation*, 115(7):829–32, Feb 2007.
- [82] A.J. Boyle, S.P. Schulman, and J. M. Hare. Stem cell therapy for cardiac repair. ready for the next step. *Circulation*, 114(4):339–52, Jul 2006.
- [83] B.G. Gálvez, M. Sampaolesi, S. Brunelli, D. Covarello, M. Gavina, B. Rossi, G. Constantin, Y. Torrente, and G. Cossu. Complete repair of dystrophic skeletal muscle by mesoangioblasts with enhanced migration ability. *J Cell Biol*, 174(2):231–43, Jul 2006.
- [84] B.G. Gálvez, D. Covarello, R. Tolorenzi, S. Brunelli, A. Dellavalle, S. Crippa, S.A.A. Mohammed, L. Scialla, I. Cuccovillo, F. Molla, L. Staszewsky, F. Maisano, M. Sampaolesi, R. Latini, and G. Cossu. Human cardiac mesoangioblasts

- isolated from hypertrophic cardiomyopathies are greatly reduced in proliferation and differentiation potency. *Cardiovasc Res.*, 83(4):707–16, Sep 2009.
- [85] R.J. Scheubel, H. Zorn R.-E. Silber, O. Kuss, H. Morawietz, J. Holtz, and A. Simm. Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*, 42(12):2073–80, Dec 2003.
- [86] N. Roberts, Q. Xiao, G. Weir, Q. Xu, and M. Jahangiri. Endothelial progenitor cells are mobilized after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*, 83(2):598–605, Feb 2007.
- [87] S. Brunner, M.G. Engelmann, and W.M. Franz. Stem cell mobilisation for myocardial repair. *Expert Opin Biol Ther.*, 8(11):1675–90, Nov 2008.
- [88] T. Nakamura. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res*, 3(1):67–85, 1991.
- [89] Y. Uehara, O. Minowa, C. Mori, K. Shiota, J. Kuno, T. Noda, and N. Kitamura. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*, 373(6516):702–5, Feb 1995.
- [90] K. Ishizawa, H. Kubo, M. Yamada, S. Kobayashi, T. Suzuki, S. Mizuno, T. Nakamura, and H. Sasaki. Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324(1):276–80, Nov 2004.
- [91] A. Matsumori. Roles of hepatocyte growth factor and mast cells in thrombosis and angiogenesis. *Cardiovasc Drugs Ther*, 18(4):321–6, Jul 2004.
- [92] R. Morishita, M. Aoki, N. Hashiya, K. Yamasaki, H. Kurinami, S. Shimizu, H. Makino, Y. Takesya, J. Azuma, and T. Ogihara. Therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor. *Curr Gene Ther*, 4(2):199–206, Jun 2004.
- [93] T. Nakamura, K. Matsumoto, S. Mizuno, Y. Sawa, H. Matsuda, and T. Nakamura. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and

- dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(5):2131–9, May 2005.
- [94] A. Matsumori, K. Ono, M. Okada, T. Miyamoto, Y. Sato, and S. Sasayama. Immediate increase in circulating hepatocyte growth factor/scatter factor by heparin. *J Mol Cell Cardiol*, 30(10):2145–9, Oct 1998.
- [95] D.D. Metcalfe, D. Baram, and Y.A. Mekori. Mast cells. *Physiol Rev*, 77(4):1033–79, Oct 1997.
- [96] G.M. Ellison, D. Torella, S. Dellegrottaglie, C. Perez-Martinez, A. Perez de Prado, C. Vicinanza, S. Purushothaman, V. Galuppo, C. Iaconetti, C.D. Waring, A. Smith, M. Torella, C. Cuellas Ramon, J.M. Gonzalo-Orden, V. Agosti, C. Indolfi, M. Galiñanes, F. Fernandez-Vazquez, and B. Nadal-Ginard. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol*, 58(9):977–86, Aug 2011.
- [97] C. Nicoleau, O. Benzakour, F. Agasse, N. Thiriet, J. Petit, L. Prestoz, M. Roger, M. Jaber, and V. Coronas. Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *Stem Cells*, 27(2):408–19, Feb 2009.
- [98] G.H. Danet, Y. Pan, J.L. Luongo, D.A. Bonnet, and M.C. Simon. Expansion of human scid-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest*, 112(1):126–35, Jul 2003.
- [99] J.C. Vis, M.G. Duffels, M.M. Winter, M.E. Weijerman, J.M. Cobben, S.A. Huisman, and B.J. Mulder. Down syndrome: a cardiovascular perspective. *J Intellect Disabil Res*, 53(5):419–25, Feb 2009.
- [100] A. Schinzel, W. Schmid, M. Fraccaro, L. Tiepolo, O. Zuffardi, J.M. Opitz, J. Lindsten, P. Zetterqvist, H. Enell, C. Baccichetti, R. Tenconi, , and R.A. Pagon. The "cat eye syndrome": Dicentric small marker chromosome probably

- derived from a no. 22 (tetrasomy 22pter->q11) associated with a characteristic phenotype. *Hum Genet*, 57(2):148–58, 1981.
- [101] F.T Leong, L.J. Freeman, and B.D. Keavney. Fresh fields and pathways new: recent genetic insights into cardiac malformation. *Heart*, 95(6):442–7, Mar 2009.
- [102] C. A. Stevens and M.G. Bhakta. Cardiac abnormalities in the rubinstein-taybi syndrome. *Am J Med Genet*, 59(3):346–8, Nov 1995.
- [103] S.C. Menon, V.V. Michels, P.A. Pellikka, J.D. Ballew, M.L. Karst, K.J. Herron, S.M. Nelson, R.J. Rodeheffer, and T.M. Olson. Cardiac troponin t mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology. *Clin Genet*, 74(5):445–54, Nov 2008.
- [104] D.K. Holmes, N. Bates, M. Murray, E.J. Ladusans, A. Morabito, P.H.B. Bolton-Maggs, T. A. Johnston, S. Walkenshaw, R.F. Wynn, and I. Bellantuno. Hematopoietic progenitor cell deficiency in fetuses and children affected by down’s syndrome. *Exp Hematol*, 34(12):1611–5, Dec 2006.
- [105] I. Stalmans, D. Lambrechts, F. De smet, S. Jansen, J. Wang, S. Maity, P. Kneer, M. von der Ohe, A. Swillen, C. Maes, M. Gewillig, D.G.M. Molin, P. Hellings, T. Boetel, M. Haardt, V. Compernelle, M. Dewerchin, S. Plaisance, R. Vlietinck, B. Emanuel, A.C. Gittenberger de Groot, P. Scambler, B. Morrow, D.A. Driscoll, L. Moons, C.V. Esguerra, G. Carmeliet, A. Behn-Krappa, K. Devriendt, D. Collen, S.J. Conway, and P. Carmeliet. Vegf: a modifier of the del22q11 (digeorge) syndrome? *Nat Med*, 9(2):173–82, Feb 2003.
- [106] D. Lambrechts, K. Devriendt, D.A. Driscoll, E. Goldmuntz, M. Gewillig, R. Vlietinck, D. Collen, and P. Carmeliet. Low expression vegf haplotype increases the risk for tetralogy of fallot: a family based association study. *J Med Genet*, 42(6):519–22, Jun 2005.
- [107] Z. JunHui, W. XingXiang, F. GuoSheng, S. YunPeng, Z. FuRong, and C. JunZhu. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells

- in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*, 102(7):1073–9, Jul 2008.
- [108] A. Nir, A. Lindinger, M. Rauh, B. Bar-Oz, S. Laer, L. Schwachtgen, A. Koch, J. Falkenberg, and T.S. Mir. Nt-pro-b-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol*, 30(1):3–8, Jan 2009.
- [109] T.S. Mir, C. Haun, C. Lilje, S. Läer, and J. Weil. Utility of n-terminal brain natriuretic peptide plasma concentrations in comparison to lactate and troponin in children with congenital heart disease following open-heart surgery. *Pediatr Cardiol*, 27(2):209–16, Mar-Apr 2006.
- [110] N.R. Saraiya, L.S. Sun, A.E. Jonassen, M.A. Pesce, and J.M. Queagebeur. Serum cardiac troponin-i elevation in neonatal cardiac surgery is lesion-dependent. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 19(5):620–5, Oct 2005.
- [111] J. Siaplaouras, J. Thul, J.C. Will, J. Bauer, J. Kreuder, K. Valeske, H. Akin-türk, and D. Schranz. Kardiales troponin i nach kardiochirurgischer korrektur-operation im säuglings- und kindesalter [cardiac troponin i after heart surgery corrective operation in infancy and childhood]. *Z Kardiol*, 90(6):408–13, Jun 2001.
- [112] C.K. Kissel, R. Lehmann, B. Assmus, A. Aicher, J. Honold, U. Fischer-Rasokat, C. Heeschen, I. Spyridopoulos, S. Dimmeler, and A.M. Zeiher. Selective functional exhaustion of hematopoietic progenitor cells in the bone marrow of patients with postinfarction heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 49(24):2341–9, Jun 2007.
- [113] C. Schmidt-Lucke, L. Rössig, S. Fichtlscherer, M. Vasa, M. Britten, U. Kämper, S. Dimmeler, and A.M. Zeiher. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events - proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation*, 111(22):2981–7, Jun 2005.

- [114] S. Dimmeler. Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 30(6):1088–93., Jun 2010.
- [115] D. Tousoulis, I. Andreou, C. Antoniades, C. Tentolouris, and C. Stefanadis. Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, 201(2):236–47, Dec 2008.

Publikationsliste

Hepatocyte growth factor mobilizes non-bone marrow-derived circulating mesoangioblasts. Iwasaki M, Koyanagi M, Kossmann H, Monsefi N, Rupp S, Trauth J, Paulus P, Goetz R, Momma S, Tjwa M, Ohtani K, Henschler R, Schranz D, Cossu G, Zacharowski K, Martens S, Zeiher AM, Dimmeler S. *Eur Heart J.* 2011 Mar;32(5):627-36

Sox2 transduction enhances cardiovascular repair capacity of blood-derived mesoangioblasts. Koyanagi M, Iwasaki M, Rupp S, Tedesco FS, Yoon CH, Boeckel JN, Trauth J, Schütz C, Ohtani K, Goetz R, Iekushi K, Bushoven P, Momma S, Mummery C, Passier R, Henschler R, Akintuerk H, Schranz D, Urbich C, Galvez BG, Cossu G, Zeiher AM, Dimmeler S. *Circ Res.* 2010 Apr 16;106(7):1290-302

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Frankfurt a.M., 24.09.2012